

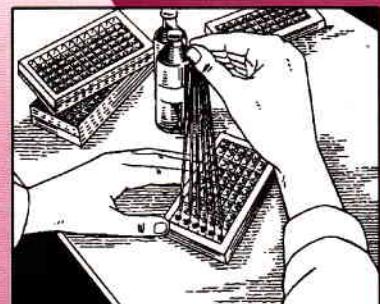
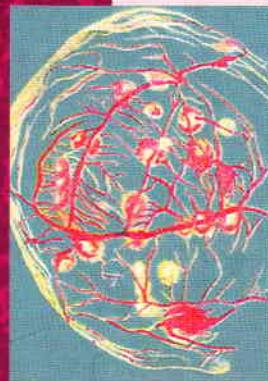
619.15-76(075)  
15 438



УЧЕБНИК

•  
Р. В. БЕЛОУСОВА  
Н. И. ТРОЦЕНКО  
Э. А. ПРЕОБРАЖЕНСКАЯ

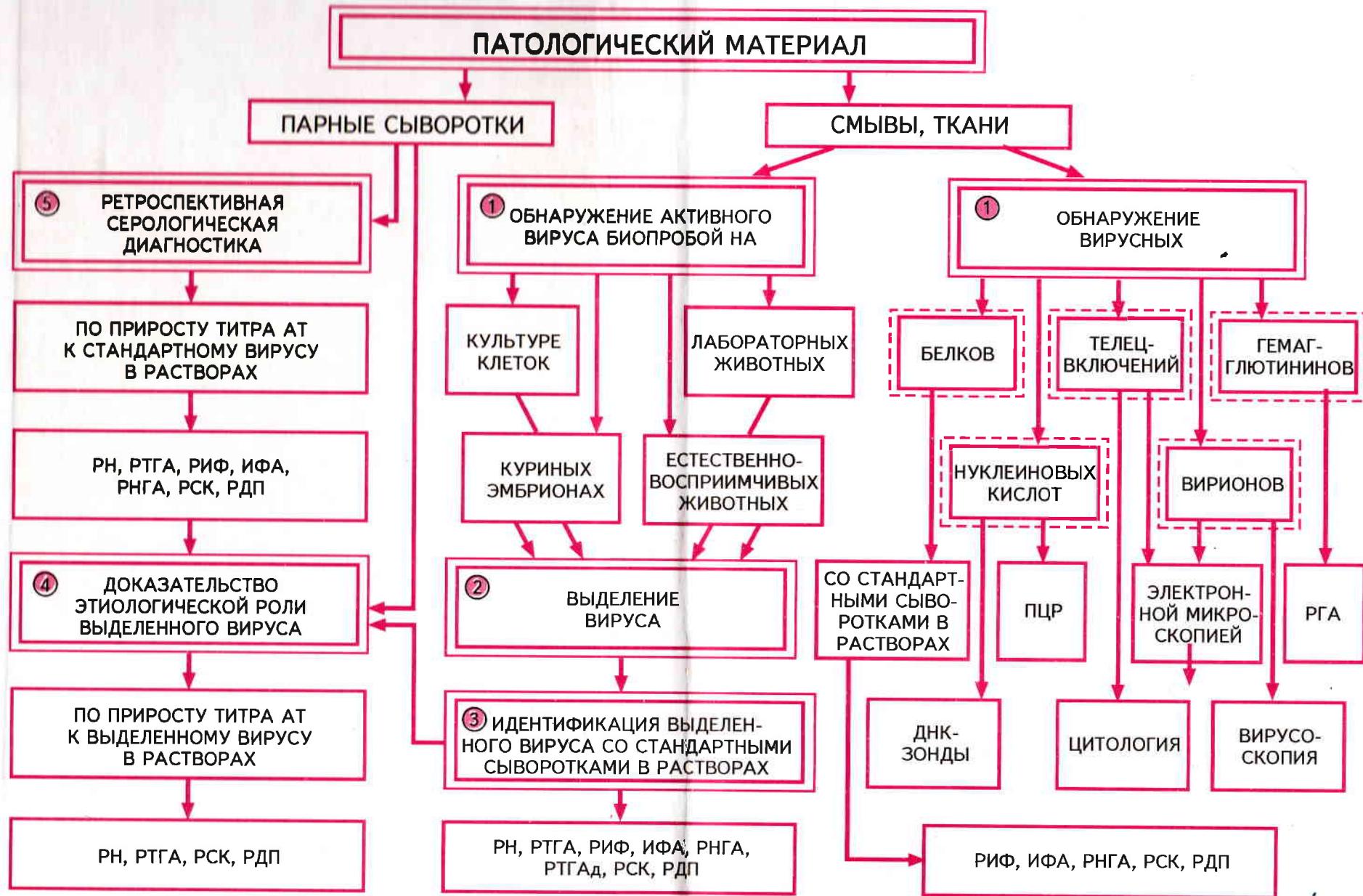
# ПРАКТИКУМ ПО ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ



«КолосС»

# 250

## СХЕМА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ



УДК 619:616—022.6(075.8)  
ББК 48  
Б43

Редактор В. Н. Сайтаниди

Рецензенты: зав. кафедрой ветеринарной патологии Российской университеты дружбы народов, член-корреспондент АН России доктор биологических наук, профессор В. В. Макаров; профессор кафедры микробиологии Московского государственного университета прикладной биотехнологии доктор биологических наук А. Ф. Валихов

**Белоусова Р. В., Троценко Н. И., Преображенская Э. А.**  
**Б43 Практикум по ветеринарной вирусологии.** — 3-е изд., перераб. и доп. — М.: КолосС, 2006. — 248 с.: ил. — (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений).  
ISBN 5—9532—0307—1

Изложены формы и методы лабораторных занятий по общей и частной вирусологии. Рассмотрены вопросы, имеющие значение при диагностике вирусных болезней животных, методы индикации и идентификации вирусов. Отражена специфика диагностики наиболее значимых вирусных болезней животных.

Для студентов вузов по специальности «Ветеринария».

УДК 619:616—022.6(075.8)  
ББК 48

Учебное издание

Белоусова Раиса Васильевна, Троценко Николай Иванович,  
Преображенская Элеонора Алексеевна

### ПРАКТИКУМ ПО ВЕТЕРИНАРНОЙ ВИРУСОЛОГИИ

Учебное пособие для вузов

Художественный редактор В. А. Чуракова

Корректор Л. И. Ключевская

Компьютерная верстка Т. В. Суриковой

Сдано в набор 02.06.05. Подписано в печать 15.11.05.  
Формат 60×88 1/16. Бумага писчая. Гарнитура Ньютон.  
Печать офсетная. Усл. печ. л. 15,19. Уч.-изд. л. 16,70.  
Изд. № 099. Тираж 1500 экз. Заказ № 2345

ООО «Издательство «КолосС»,  
101000, Москва, ул. Мясницкая, д. 17.  
Почтовый адрес: 129090, Москва, Астраханский пер., д. 8.  
Тел. (095) 680-99-86, тел./факс (095) 680-14-63,  
e-mail: koloss@koloss.ru, наш сайт: www.koloss.ru  
Отпечатано с готовых диапозитивов в ГУП РМЭ  
«Марийский полиграфическо-издательский комбинат»  
424000, г. Йошкар-Ола, ул. Комсомольская, 112

ISBN 5—9532—0307—1

© ВО «Агропромиздат», 1989,  
© Издательство «Колос», 1999  
© Издательство «КолосС»,  
2006, с дополнениями



## ОБЩАЯ ВИРУСОЛОГИЯ

### Тема 1 ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА ВИРУСОВ. ТЕХНИКА БЕЗОПАСНОСТИ И ПРАВИЛА РАБОТЫ С ВИРУССОДЕРЖАЩИМ МАТЕРИАЛОМ

Вирусы — возбудители болезней животных, растений, а также человека. Подобно другим инфекционным агентам они содержат генетическую информацию в форме последовательности нуклеотидов в молекулах нукleinовых кислот (ДНК или РНК), реализуют ее с помощью триплетного кода, обладают наследственностью и изменчивостью, поддаются естественному и искусственно отбору. Но в отличие от других инфекционных агентов вирусы не имеют своего обмена веществ, и поэтому они ничем не питаются, не дышат и ничего не выделяют, у них нет белоксинтезирующих и энергообразующих систем. Вирусы размножаются только в живых клетках, поэтому их можно рассматривать как биологические образования, несущие генетическую информацию, которую они реализуют только в живых клетках животных и растений.

В хозяйствах промышленного типа широко распространены острые респираторные и кишечные заболевания, вызываемые вирусами парагриппа (парамиксовирусы), инфекционного ринотрахеита (герпесвирусы), вирусной диареи (флавивирусы), адено-вирусами и др.

Вирусы могут быть причиной внутриутробной патологии животных. Так, парвовирус свиней, вирус чумы свиней часто вызывает мертворождение и мумификацию плодов, вирус инфекционного ринотрахеита — пороки развития, слепоту и т. д. Доказана роль вирусов в возникновении опухолевых болезней (лейкозов, болезни Марека и др.). Многие вирусные болезни животных опасны и для человека (бешенство, вирусные энцефалиты, грипп, геморрагические лихорадки и др.).

Среди рациональных мер борьбы с вирусными болезнями лабораторная диагностика занимает ведущее место.

**Вирусологические отделы.** Вирусологические отделы лабораторий и научно-исследовательских ветеринарных станций призваны осуществлять лабораторную диагностику вирусных инфекций, контролировать заболеваемость животных, вызываемую вирусами в межзоотический период, а также учитывать состояние и напряженность специфического постинфекционного и поствакцинального противовирусного иммунитета, участвовать в организа-

ции и проведении профилактических мероприятий в борьбе с вирусными и хламидийными заболеваниями животных в обслуживаемом регионе.

Структура вирусологической лаборатории определяется задачами и особенностями ее деятельности. Размещать лабораторию желательно в двухэтажном здании или в изолированном отсеке. На первом этаже располагаются гардероб с индивидуальными шкафами, санитарный пропускник, санитарные узлы, склад лабораторного оборудования, материалов и посуды, приемник канализационных вод с установкой для их обезвреживания, виварии для здоровых и подопытных животных с вытяжными шкафами, автоклавная и моечное помещение. Второй этаж отводят под лабораторные помещения: для культивирования культур клеток, для серологических и вирусологических исследований, для аппаратуры, под термостатную, комнаты для заведующего лабораторией и сотрудников.

Для организации даже небольшой диагностической лаборатории используют изолированный отсек здания, состоящий не менее чем из 5—6 комнат.

Под лабораторию отводят светлое помещение. Комнаты, где работают с вирусным материалом, должны быть хорошо освещены и состоять из двух отделений (предбоксника не менее 4 м<sup>2</sup> и бокса не менее 9 м<sup>2</sup>), разделенных стеклянной перегородкой с дверью. В боксах лаборатории размещают только столы, стулья и принадлежности для работы. Поверхность столов покрывают стеклом, пластиком или нержавеющей сталью, а над рабочим местом устанавливают бактерицидные лампы типа БУВ-30, у входа в бокс кладут резиновый губчатый дезковрик, пропитанный дезраствором. В предбокснике держат стерильные халаты, шапочки, косынки, маски и тапочки, которые надевают перед работой в боксе, и размещают оборудование, соответствующее назначению бокса (термостат, микроскоп и инвертированный микроскоп, ходильник, водянную баню, центрифугу и пр.). Полы в комнатах лаборатории делают из плотного влагонепроницаемого, устойчивого к дезинфицирующим средствам материала (метлахская плитка, пластик, линолеум), стены и потолки покрывают легкомоющимся материалом — масляной краской или кафельной плиткой, окна задельвают сетками для предупреждения проникновения мух и других насекомых.

Лабораторию (отдел) вирусологии обеспечивают холодной и горячей водой и вентиляцией с подачей стерильного воздуха.

Для регистрации поступающего на исследование патологического материала предназначена приемная, где размещают несколько столов, обитых оцинкованной жестью, и емкости с дезинфицирующими растворами (3%-ным хлорамина, гидроксида натрия или 5%-ным фенола).

В комнате для предварительной обработки материала (вскры-

вочной) вскрывают трупы и отбирают материал для дальнейшего исследования. Выполняют это на специальном столе. Здесь же должны быть сосуды с дезинфицирующими растворами, стеклянный шкаф для инструментария (ножницы, пинцеты, скальпели, корипанги и др.) и стерильная посуда для сбора материала, а также шкаф для спецодежды.

Комнаты-боксы, предназначенные для вирусологических исследований, оборудуют в зависимости от назначения. В боксе для получения культуры клеток работать с вирусодержащим материалом запрещается (рис. 1).

В автоклавной стерилизуют посуду, питательные среды, аппаратуру, приборы и обезвреживают инфекционный материал. Необходимо иметь два автоклава — для чистых материалов и для инфицированных, бак для сбора инфицированного материала, сушкильные шкафы, дистилляторы и шкафы для стерильной посуды.

Моечная предназначена для мытья посуды, аппаратуры и приборов. В ней должны быть машины для мытья посуды и белья, сушильные шкафы и т. д. Посуду, пипетки и инструменты, загрязненные инфицированным материалом, моют только после обезвреживания.

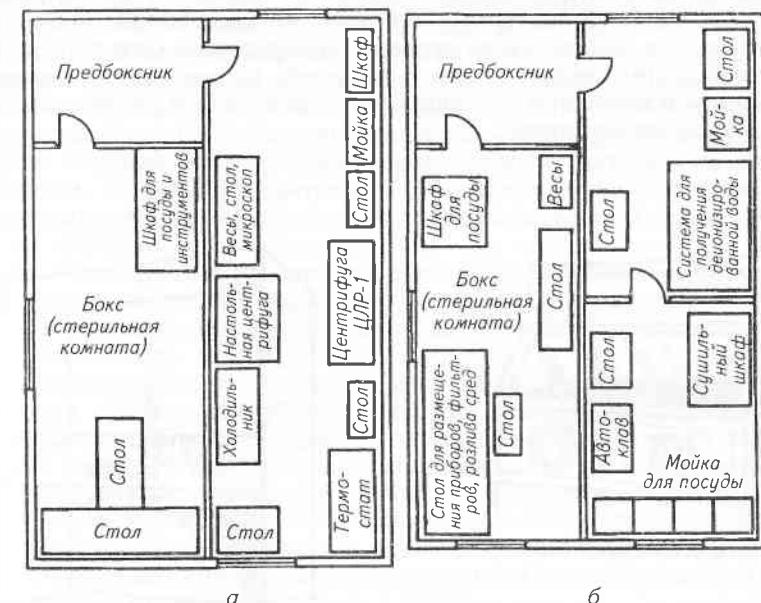


Рис. 1. Схема размещения оборудования

*a* — для работы с культурами клеток; *b* — для изготовления сред и растворов для культур клеток

Виварий (помещение для содержания лабораторных животных) должен иметь карантинное отделение, комнаты для здоровых и экспериментальных животных, для мытья и дезинфекции клеток, для инвентаря и спецодежды, для приготовления кормов, кладовой, фурожную, трупосжигательную печь и др. Помещения для здоровых и экспериментальных животных должны быть изолированы друг от друга и иметь самостоятельные выходы.

Лабораторные животные содержатся в клетках. На каждой клетке с животными вывешивают паспорт, где отмечают дату поступления их в виварий, массу. В паспорте на клетках с подопытными животными дополнительно отмечают дату заражения и вид вирусодержащего материала, номер экспертизы и число зараженных животных.

Для вирусологической лаборатории любого типа обязательной частью оборудования должен быть настольный бокс (рис. 2) или лучше бокс с ламинарной подачей воздуха (рис. 3). При выполнении несложных работ могут быть использованы стеклянные щиты, вмонтированные в столах так, чтобы отделить лицо работающего от материала, которым он манипулирует.

В планировке помещений лаборатории и в процессе проведения исследований важно предусмотреть следующие основные моменты: 1) обеспечить безопасность сотрудников; 2) предупредить контаминацию исследуемого материала микрофлорой; 3) предупредить вынос инфекции за пределы лаборатории. Этим три основных требования следует помнить каждому, кто работает с вирусодержащим материалом, и строго соблюдать режим работы вирусологической лаборатории.

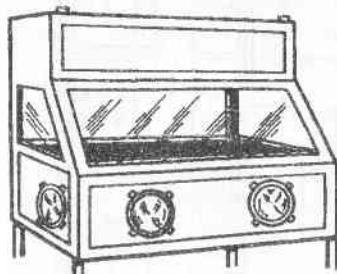


Рис. 2. Настольный бокс

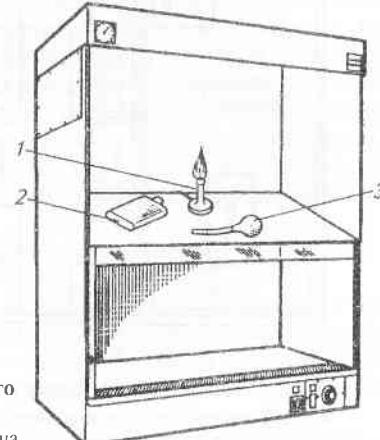


Рис. 3. Бокс с ламинарной подачей стерильного воздуха:

1 — газовая горелка; 2 — матрас; 3 — резиновая груша

**Режим работы вирусологической лаборатории.** Весь персонал лаборатории проходит инструктаж и обучение безопасным методам труда, обеспечивается спецодеждой, спецобувью, средствами санитарной защиты и защитными приспособлениями в соответствии с действующими нормами. Основные правила работы в вирусологической лаборатории следующие:

1) вход в производственные помещения посторонних лиц, а также вход сотрудников в лабораторию без халата и сменной обуви категорически запрещен;

2) запрещено выходить за пределы лаборатории в халатах и спецобуви или надевать верхнюю одежду на халат, курить, принимать пищу в производственных помещениях и хранить в них продукты питания. В боксе работают в стерильном халате, маске, шапочке, при необходимости надевают резиновые перчатки и очки. Обязательно меняют обувь. Не допускаются хождение, разговоры во время работы;

3) весь материал, поступающий в лабораторию на исследование, должен рассматриваться как инфицированный. С инфекционным материалом нужно обращаться крайне осторожно, при распаковке его банки следует обтирать снаружи дезинфицирующим раствором и ставить их на поднос или в кюветы. Рабочее место на столе покрывают несколькими слоями марли, увлажненной 5%-ным раствором хлорамина. Переливание жидкостей, содержащих вирусы, производят над кюветой с дезинфицирующим раствором. При работе с пипетками пользуются резиновыми грушами. Пипетки, предметные и покровные стекла и другую посуду, бывшую в употреблении, обеззараживают, погружая в 5%-ный раствор хлорамина, фенола, лизола или серной кислоты. Запрещено выносить из лаборатории оборудование, инвентарь, материалы и т. д. без предварительной дезинфекции их на месте;

4) по окончании работы рабочее место приводят в порядок и тщательно дезинфицируют. Вирусодержащий материал, необходимый для дальнейшей работы, ставят на хранение в холодильник и опечатывают;

5) очень важное значение имеет тщательная и прочная маркировка посуды, содержащей инфекционный материал. Руки в перчатках промывают 5%-ным раствором хлорамина, затем перчатки снимают и обеззараживают вторично, дезинфицируют и моют. В случае попадания заразного материала на халат, руки, стол, обувь и т. д. надо сообщить об этом заведующему лабораторией (в учебных заведениях — преподавателю) и немедленно произвести под его контролем дезинфекцию. При подозрении в заражении необходимо обратиться к врачу.

При работе в вирусологической лаборатории сотрудники должны строго соблюдать методы и правила асептики и антисептики.

**А септика** — система мероприятий и приемов работы, предупреждающих попадание микроорганизмов и вирусов из окружающей среды в организм человека, а также в исследуемый материал. Она предусматривает использование стерильных инструментов и материалов, обработку рук сотрудников, соблюдение особых санитарно-гигиенических правил и приемов работы.

**Антисептика** — комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов и вирусов, способных вызвать инфекционный процесс при попадании на поврежденные или интактные участки кожи и слизистых оболочек. В качестве антисептиков используют различные химические вещества: 70%-ный этиловый спирт, 5%-ный спиртовой раствор йода, 0,5—3%-ный раствор хлорамина, 0,1%-ный раствор перманганата калия, 0,5—1%-ный раствор формалина, 1—2%-ные спиртовые растворы метиленового синего или бриллиантового зеленого.

**Дезинфекция** — обеззараживание объектов окружающей среды путем уничтожения патогенных для человека и животных микроорганизмов и вирусов физическими способами и с помощью химических веществ: растворами кальция гипохлорита (0,1—10%-ным), формалина, хлорамина (0,5—5%-ным), фенола (3—5%-ным), лизола (3—5%-ным), натрия или калия гидроксида (2—3%-ным) и др. Выбор дезинфицирующего вещества и его концентрации зависят от материала, подлежащего дезинфекции.

В лабораториях для дезинфекции боксов чаще всего применяют пары формалина (30—35 мл 40%-ного раствора формальдегида на 1 м<sup>3</sup> помещения), бета-пропиолактон (1,1 л на 100 м<sup>3</sup> помещения) или испаряют карболовую кислоту (не реже одного раза в неделю) и ежедневно делают влажную уборку с применением растворов хлорамина, гидроксида натрия и др.

**Стерилизация** — обспложивание, т. е. полное уничтожение микроорганизмов и вирусов в различных материалах. Стерилизацию проводят физическими (воздействием высокой температуры, путем ультрафиолетового облучения, фильтрацией жидкостей через бактериальные фильтры) и химическими методами.

#### *Физические методы стерилизации:*

а) прокаливание в пламени спиртовки или горелки. Данный способ применяют для стерилизации препаровальных игл, петель из аппарата Такачи, пинцетов, горловин культуральных сосудов и т. д.;

б) стерилизация кипячением. Этим методом стерилизуют шприцы, мелкий хирургический инструмент, предметные и покровные стекла и другие предметы. Кипятят не менее 30 мин. Однако данный метод не обеспечивает полной стерилизации, так как некоторые вирусы, например вирус гепатита, и споры бактерий могут остаться при этом жизнеспособными;

в) стерилизация сухим жаром в сушильном шкафу. Метод основан на действии нагретого до 165—180 °C воздуха. Сухим жаром стерилизуют стеклянную посуду;

г) стерилизация в автоклаве паром под давлением. Это один из наиболее эффективных методов стерилизации, поэтому он широко применяется;

д) стерилизация в аппарате Коха или автоклаве текучим паром [давление 100—150 кПа (1—1,5 ат), экспозиция 30 мин]. Применяют для стерилизации материалов, не выдерживающих воздействия высокой температуры, например питательных сред с витаминами и углеводами;

е) стерилизация ультрафиолетовыми лучами. Метод основан на бактерицидном действии УФ-лучей с длиной волны 260—300 мкм. Для стерилизации воздуха в боксах используют лампы БУВ-15, БУВ-30. Обычно облучение проводят 1—2 ч;

ж) фильтрование жидкостей через бактериальные фильтры. Этим методом пользуются для освобождения питательных сред, сыворотки крови, витаминов и т. д. от бактерий, но не от вирусов.

**Химический метод стерилизации.** При этом методе используют различные химические вещества.

**Учет, этикетировка и хранение вирусов в лаборатории.** Для всех вирусологических лабораторий установлен единый порядок обращения с вирусами, предусматривающий правила их хранения, регистрации, передачи внутри лаборатории и за ее пределы.

Вирусодержащие материалы в пробирках, флаконах и других сосудах должны быть непременно снабжены этикеткой, на которой указаны вирус, штамм, дата получения, номер пассажа, объем и другие сведения. Данные этикеток должны полностью соответствовать записям в журнале штаммов лаборатории. Штаммы вирусов хранят в холодильнике под замком с пломбой или печатью. Вирусы выделенных штаммов, как и стандартных, необходимых для сравнения и серологических исследований, следует хранить в условиях, обеспечивающих их максимальную длительную жизнеспособность.

**Основные методы консервации вирусов.** Применяют следующие методы консервации вирусов:

1) при хранении вирусного материала (кусочки органов или тканей) часто используют глицерин (50%-ный раствор на физиологическом растворе), который обладает бактериостатическим действием и в то же время защищает вирусы. В этом случае вирус можно хранить при 4 °C несколько месяцев;

2) чаще всего вирусы хранят в холодильниках, обеспечивающих температуру минус 20, минус 30, минус 70 °C. При этой температуре некоторые вирусы без добавки защитных веществ сравнительно быстро теряют инфекционность. Известно, что чем меньше белка в вирусодержащей взвеси, тем меньше стабильность вирусов, поэтому очищенные вирусы быстро теряют свою биологическую активность.

Хорошее защитное действие при замораживании и хранении вирусов оказывает добавка одного из следующих компонентов:

инактивированной сыворотки крови, обезжиренного молока (от 10 до 30 %), желатина (0,5–1,5 %), ДМСО (10 %) и др.

При быстром замораживании вируса до минус 196 °С (жидкий азот) с последующим хранением при этой температуре титр вируса в течение нескольких месяцев не снижается.

Вирусы, чувствительные к низким значениям рН, следует замораживать в жидкостях, не содержащих однозамещенных фосфатов ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  или  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), которые обладают кислой реакцией и имеют более низкую точку замерзания, чем двузамещенные фосфаты ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  или  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) с щелочной реакцией.

Скорость оттаивания вируса существенно не влияет на его активность. Размораживать вирусы можно как при комнатной температуре, так и в водяной бане при температуре 37 °С. Во избежание частого замораживания и оттаивания одного и того же вируссодержащего материала необходимо хранить его маленькими порциями, достаточными для одноразового титрования или использования, например для реакции нейтрализации;

3) лиофилизация, т. е. высушивание в замороженном состоянии в условиях вакуума, — очень хороший способ консервирования вирусов. Для лиофилизации необходимы соответствующая аппаратура, определенный (в зависимости от вида вируса) наполнитель и тщательное выполнение процедуры сушки. На стойкость лиофилизированного вируса влияет не только выбор соответствующего наполнителя, но и состав газа в ампуле (уже 0,5 % кислорода вызывают быструю гибель вируса, в то время как влажность в границах 2–3 % существенно не влияет) и температура хранения лиофилизата — не выше 4 °С. Лиофилизацию лучше проводить в учреждениях, хорошо знакомых с этой методикой. В лиофилизированном виде вирусы могут храниться несколько лет.

Вирусологическая лаборатория должна иметь следующую документацию:

журнал вирусологических исследований (экспертиз, сельхозучета, формы № 13-вет);

журнал учета зараженных животных;

журнал учета выделенных вирусов и их уничтожения;

журнал учета движения производственных или музейных штаммов и другие книги учета согласно утвержденной инструкции.

**Правила работы с вируссодержащим материалом и техника безопасности (при работе студентов на кафедре).** При работе с вируссодержащим материалом необходимо выполнять следующие требования:

не допускать рассеивания вирусов во внешней среде;

предотвратить контаминацию (загрязнение) вируссодержащего материала посторонней микрофлорой;

обеспечить личную безопасность.

Для выполнения этих требований следует соблюдать следующие правила работы:

необходимо быть очень внимательным, собранным и аккуратным;

входить в помещение лаборатории и выходить из него только в халате, переодеваясь в гардеробе;

работать только в халате с застегнутыми манжетами, шапочке и марлевой маске;

в лаборатории строго соблюдать чистоту и порядок. На рабочем столе не должно быть никаких посторонних предметов. Запрещается курить и принимать пищу;

материалы и инструменты для работы дежурный по группе получает у лаборанта кафедры и раздает студентам;

пользоваться только стерильными инструментами и посудой;

открывать и закрывать сосуды (пробирки, флаконы, чашки и т. п.) у пламени горелки;

не брать пипеток в рот;

отработанные инструменты, включая шприцы (в разобранном виде), складывать в стерилизатор для последующего обезвреживания и кипячения;

отработанные пипетки собирать в сосуд с дезинфицирующим раствором;

твердые и жидкие отходы (вата, бумага и т. д.) сбрасывать в специально приспособленные контейнеры для последующей стерилизации;

запрещается выливать или сбрасывать отходы в унитазы и раковины;

если студент случайно разольет вируссодержащий материал, он обязан немедленно сообщить об этом преподавателю и вместе с ним обеззаразить рабочее место;

в конце занятия студент должен привести в порядок свое рабочее место, сдать дежурному весь материал и инструменты, вымыть руки с мылом.

## Задания

1. Ознакомиться с вирусологической лабораторией кафедры и ее основным оборудованием.

2. Изучить правила работы с вируссодержащим материалом.

**Материальное обеспечение:** помещение вирусологической лаборатории и лабораторное оборудование, необходимое для вирусологических исследований, — настольный бокс, люминесцентный и инвертированный микроскопы, центрифуги, холодильники, магнитные мешалки, термостаты, спиртовки, груши, стеклянная посуда (пробирки под резиновыми пробками, флаконы, пробирки, матрасы, чашки Петри, пипетки), аппараты Такачи и Титертек, одно- и многоканальные пипетки, основные реактивы и питательные среды; журнал регистрации студентов,

получавших инструктаж по технике безопасности при работе в вирусологической лаборатории; документация лаборатории и основные утвержденные инструкции по правилам работы в ветеринарных учреждениях.

### Примерный план занятия (2 ч)

1. Объяснение преподавателя.
2. Запись в тетради требований при работе с вирусным материалом и основных правил выполнения этих требований.
3. Расписка в журнале по технике безопасности.
4. Демонстрация: а) лаборатории и ее основного оборудования; б) организации рабочего места в боксе при работе с вирусами; в) халатов, масок, шапочек; г) работы у пламени горелки; д) работы с пипеткой, грушей и стерильными инструментами; е) пользования дезинфицирующим раствором и контейнерами для отходов.
5. Самостоятельная работа студентов: а) подготовка бокса для работы; б) отработка навыков работы с пипеткой и стерильными инструментами; в) изучение документации лаборатории.
6. Подведение итогов занятия.
7. Задание к следующему занятию.

### Контрольные вопросы

1. Какова роль вирусов в инфекционной патологии животных?
2. Что вы знаете о технике безопасности и правилах работы в вирусологической лаборатории?
3. Какие методы консервации вирусов вы знаете?
4. Какие способы уничтожения вирусов существуют в лабораторной практике?

**Методические указания.** Занятия можно организовать следующим образом. После объяснения и демонстрации преподавателем (по плану) студенты должны подготовить рабочее место для работы с вирусным материалом. Для этого они проводят дезинфекцию рабочего места раствором хлорамина; ставят на стол сосуд с дез раствором (2%-ным раствором хлорамина или 2%-ным раствором гидроксида натрия), контейнер для отходов, спиртовку (горелку), баночку со стерильными ватиками, баночку со спиртом, штатив для пробирок, чашку Петри с карандашами по стеклу, баночку со стерильной ватой. Затем готовят инструменты (шприц, иглы, пинцет) для стерилизации и кипятят в стерилизаторе. В это время студенты отрабатывают навык работы с пипеткой и грушей, работают парами и меняются на выполнении операций. Затем отрабатывают приемы работы со стерильными инструментами.

Для ознакомления с документацией лаборатории можно использовать Ветеринарное законодательство, инструкции о правилах работы в лабораториях и порядке хранения, обращения с микроорганизмами.

## Тема 2

### ПОЛУЧЕНИЕ И ОБРАБОТКА ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Патологическим материалом называется материал, полученный от больных или павших животных, в котором предположительно находится вирус, вызвавший заболевание, или антитела как результат иммунного ответа на него.

В лабораторной диагностике вирусных болезней точность диагноза прежде всего зависит от правильности взятия патологического материала, его транспортировки, качества приготовления и технологии исследования вирусодержащего материала, которые имеют свои особенности.

Материал для исследований от заболевших, павших или вынужденно убитых животных следует брать как можно быстрее после появления четких признаков болезни или не позднее 1–2 ч после клинической смерти или убоя. Это связано с тем, что сразу после заболевания или в первые 1–2 дня значительно ослабевает барьерная роль кишечника, что наряду с повышенной проницаемостью кровеносных сосудов способствует диссеминации кишечной флоры. Кроме того, по мере продолжения и даже углубления инфекционного процесса количество вируса может уменьшаться в результате воздействия защитных механизмов организма.

При взятии материала для выделения вируса следует исходить из патогенеза изучаемой инфекции (входные ворота, пути распространения вируса в организме, места его размножения и пути выделения). Так, при респираторных инфекциях для выделения вирусов берут носоглоточные смывы, мазки из носа и глотки, соскобы трахеи и кусочки легкого трупов; при энтеровирусных — кал; при нейротропных — кусочки головного или спинного мозга; при дермоторпных инфекциях — свежие поражения кожи и т. п. (табл. 1), т. е. отбирают тот материал, в котором предполагается наибольшая концентрация вируса. Материалом для выделения вируса могут служить различные экскреты и секреты, кусочки органов, кровь, лимфа и пр.

Кровь берут из яремной вены, у свиней — из кончика хвоста или уха. Лучше кровь у свиней брать из венозного сплетения глаз. При этом пользуются шприцем «Рекорд» (на 20 мл) и иглой № 12–30, которую вводят по внутреннему углу костной орбиты (скосом иглы к костной орбите) к противоположному уху до упора, затем оттягивают на 1–1,5 см и набирают кровь.

Для выделения вируса может быть использована либо цельная дефибринированная, либо «лаковая» кровь (смесь крови с дистиллированной водой в соотношении 1 : 1), либо отдельные элементы крови (эритроциты, лейкоциты, плазма, сыворотка). Обнаружить вирус в крови удается в период вирусемии, в основном в случаях

**1. Отбор патологического материала для диагностики некоторых вирусных болезней сельскохозяйственных животных**

| Болезнь                               | Содержимое слюны | Носоглотка | Кровь | Фекалии | Кожные поражения | Поражение конъюнктивы | Мозг | Легкие | Печень | Лимфоузлы | Спинномозговая жидкость | Селезенка | Почки | Слизистая оболочка кишечника | Куриные яйца | Кусок бронхов; трахеи |
|---------------------------------------|------------------|------------|-------|---------|------------------|-----------------------|------|--------|--------|-----------|-------------------------|-----------|-------|------------------------------|--------------|-----------------------|
| Бешенство                             | —                | —          | —     | —       | —                | —                     | +    | —      | —      | —         | —                       | —         | —     | —                            | —            | —                     |
| Ящур                                  | —                | +          | —     | —       | —                | +                     | —    | —      | —      | —         | —                       | —         | —     | —                            | —            | —                     |
| Везикулярный стоматит                 | —                | +          | —     | —       | —                | +                     | —    | —      | —      | —         | —                       | —         | —     | —                            | —            | —                     |
| Болезнь Аусекки Ротавирусная инфекция | +                | —          | —     | —       | +                | —                     | —    | +      | +      | —         | —                       | +         | —     | —                            | —            | —                     |
| Парвовирусная инфекция                | —                | —          | —     | —       | +                | —                     | —    | —      | —      | —         | —                       | +         | —     | —                            | —            | —                     |
| Инфекционный ринотрахеит КРС          | +                | —          | +     | —       | —                | +                     | —    | —      | —      | —         | —                       | —         | —     | —                            | +            | —                     |
| Вирусная диарея КРС                   | +                | —          | +     | +       | —                | —                     | +    | +      | +      | —         | —                       | +         | —     | —                            | —            | —                     |
| Параатипп КРС                         | +                | —          | +     | —       | —                | —                     | —    | —      | —      | —         | —                       | —         | —     | —                            | —            | —                     |
| Аденовирусная инфекция КРС            | +                | —          | —     | +       | —                | —                     | —    | —      | —      | —         | —                       | +         | —     | —                            | —            | +                     |
| Ринотневмомия лошадей                 | +                | —          | —     | +       | —                | —                     | —    | —      | —      | —         | —                       | —         | —     | —                            | +            | —                     |
| Чума свиней                           | —                | —          | +     | —       | —                | —                     | —    | —      | —      | —         | —                       | +         | +     | +                            | —            | —                     |

|   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Африканская чума свиней                       | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Болезнь Тешена                                | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Инфекционный гастроэнтерит свиней             | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Грипп свиней                                  | + | — | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Везикулярная болезнь свиней                   | — | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Везикулярная энцефалитическая инфекция свиней | — | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Контагиозная экзита овец и коз                | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Осла овец                                     | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Грипп уток                                    | + | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Инфекционный ларинготрахеит кур               | + | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Инфекционный бронхит кур                      | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Вирусный гепатит утят                         | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Лейкоз птиц                                   | — | — | — | — | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Болезнь Марка                                 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Ньюкаслская болезнь                           | + | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Осла птиц                                     | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — | — |

заражения животного вирусом, поражающим клетки многих или всех органов (чума КРС, классическая чума свиней, катаральная лихорадка овец, аденовирусная инфекция и др.). Для обнаружения в сыворотках крови противовирусных антител и прироста их титров исследуют парные сыворотки. Для этого кровь берут у одного и того же животного дважды с интервалом 2–3 нед в объеме не менее 5,0 мл каждой.

С мывы с конъюнктивы, со слизистой оболочки носа, с задней стенки глотки, прямой кишки и клоаки у птиц берут стерильными ватными тампонами и погружают их в пенициллиновые флаконы или пробирки, содержащие 3–5 мл соответствующей жидкости. Наиболее часто для этого используют раствор Хенкса или среды для культур клеток (ГЛА, 199, Игла) с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин по 500 ЕД и нистатин по 20 ЕД на 1 мл среды) и белковым стабилизатором, например 0,5%-ным раствором желатины или 0,5–1%-ным раствором альбумина бычьей сыворотки. Присутствие стабилизаторов необходимо для предотвращения быстрой инактивации некоторых вирусов (например, парагриппа).

При взятии материала из носоглотки можно пользоваться прибором, сконструированным Томасом и Стоком. Он состоит из трубки диаметром 9 мм и длиной 30 см, внутри которой помещается вторая тонкая трубка с нержавеющим стержнем, оканчивающимся нейлоновой щеткой (диаметр 9 мм). Прибор вводят глубоко в носовые ходы (хонахи) или в горло через носовой ход, выдвигая щеточку, а затем вновь задвигая ее в трубку, перед тем как вынуть прибор из органа. Щеточку тщательно отмывают от слизи и клеток в 2 мл жидкости.

Слюну имеет смысл брать при наличии признаков поражения ротовой полости или слюнных желез. Вытекающую изо рта слюну можно собрать прямо в пробирку. Если ее выделяется мало или она не вытекает, необходимо пропитать слюной стерильный тампон из ваты на палочке, а затем поместить в пробирку с небольшим количеством физиологического раствора и закрыть резиновой пробкой. Для усиления слюноотделения животному можно ввести пилокарпин из расчета 0,02–0,05 г на 1 кг массы.

Мочу собирают при помощи катетера в стерильную посуду.

Фекалии берут из прямой кишки шпателем или палочкой и помещают в стерильную пробирку или пенициллиновый флакон.

Везикулярную жидкость можно собрать шприцем или пастеровской пипеткой в стерильную пробирку.

Стенки афт, корочки с поверхности кожи снимают пинцетом.

Спинномозговую жидкость используют редко. Ее берут асептично путем обычной пункции.

После смерти животного важно как можно быстрее взять кусочки органов, так как при многих вирусных инфекциях на-

блодается феномен посмертной аутостерилизации, в результате чего вирус может быть вообще не обнаружен или его количество окажется столь незначительным, что обычными рутинными методами исследования выделить его не удается. Вторая причина необходимости экстренного взятия материала заключается в том, что в трупе быстро развивается бактериальное обсеменение, взять пробу стерильно становится невозможным.

В экспериментальных условиях инфекционный материал берут главным образом у животных, убитых в агональный период болезни.

Применение антибиотиков эффективно лишь при условии незначительного бактериального загрязнения проб. Однако при значительных посмертных изменениях тканей, если даже при помощи антибиотиков удается затормозить рост бактерий, нельзя нейтрализовать продукты их метаболизма и токсические субстанции поврежденной ткани. Такой материал не пригоден для проведения исследований ни на животных, ни тем более на куриных эмбрионах и культурах клеток. По тем же причинам пробы должны быть взяты по возможности в стерильных условиях. Особенно тщательно следует избегать загрязнения проб содержимым пищеварительного тракта, так как в нем могут находиться непатогенные сибирские вирусы, которые вызывают деструкцию клеточных культур, осложняя тем самым диагностические исследования.

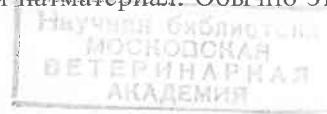
В качестве патматериала берут кусочки органов размером в несколько кубических сантиметров и массой 10–20 г, которые:

имеют видимые отклонения от нормы (по форме, размеру, цвету, консистенции, наличию необычных образований);

могут быть поражены и содержать вирус на основании клинической картины болезни перед смертью.

Наиболее часто содержат вирус печень, селезенка, легкие, головной мозг, лимфатические узлы, почки.

**Транспортировка и хранение проб.** Пробы рекомендуется как можно быстрее поместить в условия, обеспечивающие замедление процессов инактивации вируса. Такие условия обеспечивают низкие температуры. Для этого пробирки (флакончики) с патматериалом, закрытые резиновыми пробками, надо поместить в термос с охлаждающей смесью. В качестве охлаждающей смеси можно взять смесь равных частей сухого льда (твердой углекислоты) и этилового спирта (температура минус 71 °С держится несколько дней). Можно использовать смесь, состоящую из трех частей льда или снега и одной части поваренной соли. В последнем случае удается получить температуру минус 15 – минус 20 °С. Вместо замораживания можно использовать для консервирования химические средства (менее эффективно). Лучшим из последних считается смесь равных объемов стерильных глицерина и 0,85%-ного раствора натрия хлорида (изотонический раствор), в которую и помещается патматериал. Обычно эту смесь использу-



ют для консервирования кусочков паренхиматозных органов и тканей. Растворы глицерина менее пригодны для вируссодержащих жидкостей, особенно в тех случаях, когда этот материал нужно вводить животным, эмбрионам и в культуру клеток в неразведенном виде. Употребление глицерина делает невозможным исследование патологического материала методом иммунофлуоресценции. Поэтому одновременно с пробой патматериала необходимо направлять мазки-отпечатки, приготовленные и фиксированные на предметном стекле, для исследования в люминесцентном микроскопе. Для гистологических исследований кусочки органов чаще консервируют в 10%-ном растворе формалина.

Патматериал должен быть снабжен надежной и четкой этикеткой, недопустимо делать надписи карандашом по стеклу. На пробирке или флакончике достаточно надежна этикетка из лейкопластыря, на которой написано простым (графитным) карандашом, какой материал и от какого животного получен. На термос с пробами патматериала навешивают бирку из картона или фанеры, на которой указывают хозяйство, вид животного, вид материала и дату. Термос должен быть опечатан. Взятый материал с сопроводительным документом, содержащим полную информацию о животном, от которого взяты пробы, эпизоотологические данные хозяйства, предположительный диагноз и меры, принятые для ликвидации болезни (лечение, вакцинации и т. д.), а также дату и фамилию врача, направляют с нарочным. Этими данными руководствуются при выборе направления лабораторных исследований. Доставленные в лабораторию пробы рекомендуется немедленно использовать для выделения вируса. Если по каким-то причинам (отсутствие экспериментальных животных, куриных эмбрионов, культур клеток) исследование откладывается, материал необходимо хранить при температуре минус 40 — минус 70 °С. Большинство вирусов быстро разрушается в крови, спинномозговой жидкости, моче, соскобах и смывах носоглотки, а вирус парагриппа крупного рогатого скота и респираторно-синцитиальный вирус быстро погибают при замораживании, поэтому успех выделения их зависит от быстроты исследований. Если нет уверенности в том, что исследуемое инфекционное заболевание было вызвано только вирусом, часть материала следует отдать для бактериологического и микологического исследований.

**Подготовка вируссодержащего материала для исследования.** В лаборатории полученный патматериал освобождают от консерванта, оттаивают, отмывают от глицерина, взвешивают или измеряют. Часть материала берут для вирусологических исследований, оставшуюся часть хранят в холодильнике на случай дополнительных исследований. Затем составляют план исследований присланного материала.

**Подготовка органов и тканей.** Вирус необходимо высвободить из клеток органов и тканей и перевести в фосфатный

буфер или раствор Хенкса. Для этого материал тщательно измельчают ножницами и растирают в ступке со стерильным кварцевым песком. Добавлять толченое стекло менее желательно, так как оно обладает щелочными свойствами и может инактивировать часть вирусных частиц. Но и на тонко растертых песчинках или частичках стекла, обладающих большой поверхностью, часть вируса может адсорбироваться и уйти затем в удаляемый осадок. Из растертого материала обычно готовят 10%-ную суспензию на фосфатном буфере или растворе Хенкса. Полученную суспензию центрифигируют при 1500—3000 мин<sup>-1</sup>, надосадочную жидкость отсасывают в стерильные флаконы и освобождают от микрофлоры, либо пропускают через бактериальные фильтры (это делают редко, так как теряется много вируса за счет адсорбции на фильтре), либо обрабатывая антибиотиками широкого спектра действия (пенициллин, стрептомицин, нистатин, тетрациклин, кристалломицин и т. д.). Дозы антибиотиков, применяемых для этой цели, могут колебаться в довольно широких пределах: от 100 до 1—2 тыс. ЕД и более на 1 мл в зависимости от характера исследуемого материала. Следует избегать излишне больших доз антибиотиков, так как их избыток при дальнейшем внесении в культуру клеток может вызвать неспецифическую дегенерацию последних. Предпочтительность тех или иных доз антибиотиков и оптимальный режим центрифугирования в каждом конкретном случае указываются в инструкции по диагностике соответствующих вирусных болезней.

Экспозиция суспензии с антибиотиками не менее 30—60 мин при комнатной температуре, затем материал подвергают бактериологическому контролю на наличие бактерий, грибов путем посева на МПА, МПБ, МППБ и среду Сабуро. После получения отрицательного результата бактериологического контроля вируссодержащий материал используют для заражения лабораторных животных, куриных эмбрионов или культур клеток. В случае положительного бактериологического контроля суспензию вируса подвергают дополнительной обработке антибиотиками и повторно ставят контроль. Суспензию хранят при минус 20 — минус 70 °С.

Подготовка выделий из носа, глаз. Тампоны, погруженные в соответствующий раствор, встрихивают 10—15 мин, тщательно отжимают, полученную жидкость центрифигируют 20 мин при 2—3 тыс. мин<sup>-1</sup>. Надосадочную жидкость отсасывают в стерильные пробирки и в них добавляют пенициллин по 1 тыс. ЕД на 1 мл и стрептомицин по 1 мг на 1 мл, выдерживают 60 мин при комнатной температуре и после бактериологического контроля используют для заражения. Из осадка клеток готовят мазки для РИФ.

Подготовка фекалий. Пробу кала (приблизительно 1 г) помещают в баночку с бусами, содержащую 10 мл раствора Хенкса или фосфатно-буферного раствора. После гемогенизации материала встрихиванием и последующего центрифугирования при

2–3 тыс. мин<sup>-1</sup> в течение 30 мин надосадочную жидкость отсасывают, добавляют пенициллин по 2–3 тыс. ЕД, стрептомицин по 2–3 мг и нистатин по 30 ЕД на 1 мл. После 60-минутного контакта производят посев на стерильность, замораживают и хранят при минус 10–минус 20 °C. В день заражения исследуемый материал оттаивают и повторно центрифугируют для удаления вновь образующегося после замораживания осадка. Неиспользованный материал хранят в замороженном состоянии до конца исследования.

Исследование кала может быть заменено ректальными мазками, обработка которых требует меньше времени, а частота выделения вируса при этом не только не меньше, но иногда выше, чем при исследовании кала.

Мочу обрабатывают антибиотиками (500–1000 ЕД/мл) и используют для заражения.

Содержимое папул, пузырьков и пустул, чешуйки и корки исследуют при кожных высыпаниях. Содержимое папул и пузырьков разводят физиологическим раствором 1 : 5, а корки, чешуйки после растирания супензируют в солевом растворе 1 : 5–1 : 10 и центрифугируют при 2–3 тыс. мин<sup>-1</sup> в течение 10–15 мин. После обработки пенициллином и стрептомицином (соответственно 1–3 тыс. ЕД и 1–3 мг на 1 мл) материал используют для заражения.

Подготовка крови. Для выделения вируса может быть использована либо цельная дефибринированная, либо «лаковая» кровь, либо кровь с антикоагулянтом. В последнем случае берут 5 мл крови в пробирку с 5–6 каплями гепарина и замораживают. После оттаивания гемолизированную кровь центрифугируют при 2–3 тыс. мин<sup>-1</sup> в течение 15 мин, добавляют пенициллин и стрептомицин из расчета 100–200 ЕД/мл и после проверки на стерильность используют для заражения. Для этих целей пригодна и свернувшаяся кровь. Ее растирают в ступке и добавляют небольшое количество раствора Хенкса (1 : 1 или 1 : 2).

Отбор крови для серологических исследований. Для серологической диагностики необходимо иметь сыворотки двух проб крови (парные сыворотки), взятых в начале и в конце болезни. Первую пробу берут как можно раньше — в инкубационный период или в начале проявления клинических симптомов болезни, вторую — во время выздоровления или через 2–3 нед после заболевания. Брать кровь и готовить сыворотку необходимо стерильно, нельзя применять антикоагулянты или консерванты, которые могут сделать сыворотку антитокомлементарной, а в реакции нейтрализации окказионировать инактивирующее действие на вирус или оказаться токсичными для культур клеток либо просто нестерильными. Кровь в объеме 10–15 мл берут в стерильные пробирки с резиновыми пробками, выдерживают при комнатной температуре до образования сгустка, обводят стеклянной палочкой (или другим инструментом) и переносят в холодильник при 4 °C на 18–20 ч. После

максимальной ретракции сгустка сыворотку отсасывают, добавляют антибиотики — пенициллин и стрептомицин по 100 ЕД/мл, проводят высеяны на бактериологические среды. Вместо отстаивания в холодильнике можно после обведения кровь центрифугировать.

Серологические методы вирусологической диагностики требуют исследования парных сывороток, поэтому необходимо правильно сохранять первые пробы, пока не будут получены вторые. Хранить сыворотки необходимо в холодильнике при 4 °C или в замороженном состоянии, строго соблюдая порядок нумерации и соответствия записей в журнале и пробах.

## Задания

1. Ознакомить студентов с правилами взятия и транспортировки патологического материала для лабораторных исследований.
2. Приготовить вируссодержащую супензию из органов павших или вынужденно убитых животных.
3. Подготовить смывы, полученные от больных животных, для вирусологического исследования.

**Материальное обеспечение:** стерилизаторы со стерильными ножницами и пинцетами; спиртовки; стерильные ватные тампоны; вата; спирт-реактификат; пеницилловые флаконы с 3–4 мл раствора Хенкса; термос с охлаждающей смесью; лейкопластырь; графитные карандаши; кюветы; пеницилловые флаконы с кусочками паренхиматозных органов; стерильные ступки с пестиками; стерильный пессок; пипетки на 5 и 10 мл; стерильные центрифужные пробирки; антибиотики (пенициллин и стрептомицин); МПА; МПБ; раствор Хенкса или Эрла; центрифуга.

## Примерный план занятия (2 ч)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Демонстрация: а) набора посуды и инструментов, необходимых для взятия материала от больных животных и трупов; б) приемов взятия смылов со слизистой оболочки носа, конъюнктивы, прямой кишки у телят или других животных; в) этикетирования и транспортировки взятого материала.
4. Самостоятельная работа студентов: а) получение смылов слизистых оболочек дыхательных путей телят, овец или других животных; б) получение фекес; в) консервация полученных материалов; г) этикетирование; д) приготовление из вируссодержащей ткани супензии вируса; е) подготовка смылов, полученных от животных, для вирусологического исследования.
5. Подведение итогов занятия.
6. Задание к следующему занятию.

## Контрольные вопросы

1. Каковы общие правила взятия материала от больных животных и трупов?
2. Как консервируют и транспортируют патологический материал?
3. Что вы знаете о подготовке патологического материала к исследованию?

**Методические указания.** Данное занятие можно провести следующим образом. Первый час посвятить объяснению и демонстрации взятия материала от животных, находящихся в клинике института. Во второй час студенты проводят работу по подготовке материала к исследованию (получение вируссодержащего материала и обработка смыков).

В качестве органов от павших животных можно использовать органы и ткани от любого лабораторного животного. После убоя этого животного кусочки органов помещают в пеницилловые фляконы, закрывают резиновыми пробками, наклеивают этикетки, замораживают или заливают раствором 50%-ного глицерина, кладут в полиэтиленовый пакет и помещают в термос с охлаждающей смесью. На занятии студенты получают этот материал и готовят вируссодержащую суспензию. Смывы, полученные при демонстрации, будут использованы в работе.

На данном занятии ограничиваются только демонстрацией взятия материала от животных, так как сам процесс студенты будут отрабатывать при прохождении учебно-производственной практики.

### Тема 3

## ИНДИКАЦИЯ ВИРУСОВ В ПАТОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ПУТЕМ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРИОНОВ И ТЕЛЕЦ-ВКЛЮЧЕНИЙ

Обычно вирусы находятся в живых клетках одно- и многоклеточных организмов. В клетках вирусы представлены чаще всего в виде скоплений не связанных между собой молекул РНК или ДНК, в которых закодирована генетическая информация о вирусных белках. В результате реализации этой информации в тех же клетках синтезируются и накапливаются молекулы вирусных белков. Внутри клеток все вирусные молекулы (ДНК, РНК, белки) защищены от разрушительного действия внеклеточных факторов (ферментов, кислот, температуры, излучений и др.). Если же вирусы оказываются вне клеток, то быстро разрушаются.

Многие вирусные белки, которые называются структурными, обладают свойством самопроизвольно под действием межмолекулярных сил собираться в комочки, агрегаты (процесс самосборки). В каждый такой агрегат включается обычно по одной молекуле вирусных ДНК или РНК. Иногда в них могут включаться еще и липиды клеточного происхождения. Образующиеся таким путем частицы называются *вироидами*. В вироидах молекулы белков так взаимно ориентированы, что на них не могут действовать протеолитические ферменты, а молекулы вирусных ДНК или РНК оказываются недоступными для нуклеаз и защищенными от действия физических факторов среды. Формирова-

ние вироидов каждого отдельного вируса возможно только в клетках определенного типа.

Вироиды можно рассматривать как покоящуюся неактивную форму существования вирусов. Поэтому в форме вироидов вирусы могут определенное время находиться и вне клеток без потери биологической активности. Именно в этой форме вирусы мигрируют из клетки в клетку и из одного организма в другой. Такая форма существования вирусов изучена значительно лучше, чем внутриклеточная, что связано с техническими трудностями изучения.

Вироидам каждого вируса присущи свои особенности формы, размеров, структуры и свойств. Но есть и общие черты, свойственные вироидам всех (или почти всех) вирусов. Каждый вироид содержит одну полную или неполную молекулу ДНК или РНК, плотно одетую капсомерами — морфологическими единицами различной формы, состоящими из одной или нескольких белковых молекул. Совокупность всех капсомеров, уложенных в определенном порядке, составляет капсид, а вместе с нукleinовой кислотой — нуклеокапсид (с химической точки зрения — нуклеопротеид). Вироиды некоторых вирусов (в основном вирусов животных) кроме нуклеокапсида имеют еще внешнюю, или суперкапсидную, оболочку, возникающую путем захвата части оболочки клетки при выходе из нее вироидов. Встречаются вирусы, в вироидах которых образуется еще одна, промежуточная, оболочка (M-оболочка), состоящая в основном из липидов и белков (вирусы гриппа) (рис. 4).

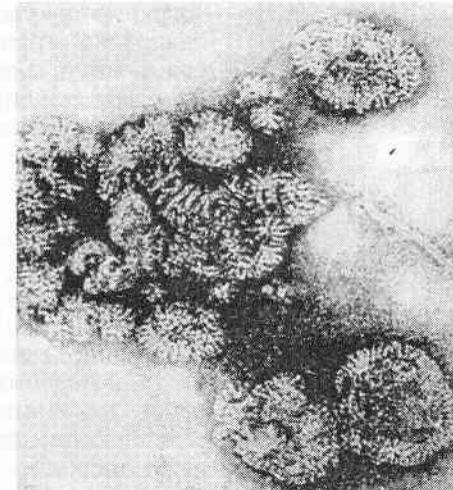


Рис. 4. Вироиды вируса гриппа кур  
(по Ю. В. Пантелейеву)

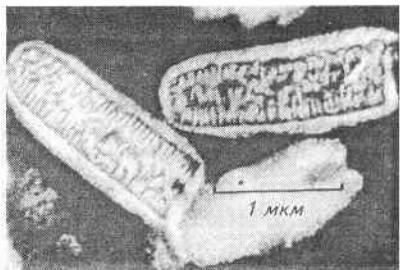


Рис. 5. Вирионы вируса везикулярного стоматита (по Хаутсоу и Уитмору)

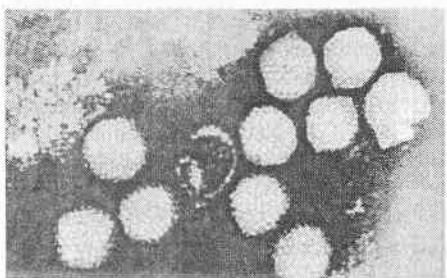


Рис. 6. Вирионы адено-вируса крупного рогатого скота (по Ю. В. Пантелееву)

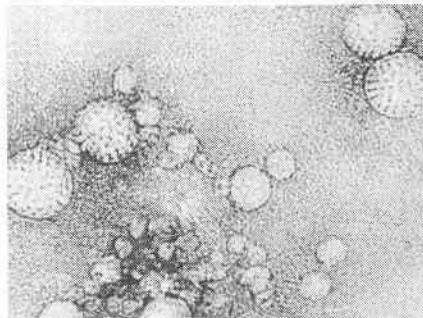


Рис. 7. Вирионы ротавируса телят (по Ю. В. Пантелееву)

Различают два способа укладки капсомеров вокруг молекулы нуклеиновой кислоты: по спиральному и кубическому типам симметрии. В первом случае капсомеры уложены вокруг нуклеиновой кислоты по спирали и образуют с ней единый нуклеопротеидный тяж. Такие вирионы имеют палочковидную, пулевидную (и даже нитевидную) формы (рис. 5). Но встречаются вирусы, например ортомиксовирусы животных, в вирионах которых спиральный нуклеопротеидный тяж свернут в клубок, одетый оболочками, форма вирионов у них округлая или овальная (см. рис. 4).

Большинство же вирусов животных имеет вирионы, в которых капсомеры уложены по кубическому типу симметрии и образуют фигуру многогранника, чаще всего икосаэдра (20-гранник). Каждая грань многогранника образована определенным для каждого вируса количеством капсомеров (рис. 6—8). У некоторых вирусов вирионы не имеют четко выраженной симметрии (Т-четные фаги, оспенные вирусы) (рис. 9). Размеры их колеблются от 10 до 350 нм, что меньше половины длины волны видимого света, и поэтому вирионы вирусов не видны в световом микроскопе, предельная разрешающая способность которого около 300—400 нм.

Обычно удается рассмотреть вирионы вирусов и уста-

новить их структуру с помощью электронной микроскопии, позволяющей различать объекты размерами до 0,2—0,4 нм. Обнаружение с помощью электронной микроскопии в материале от больных животных вирионов может служить доказательством наличия вирусов в этом материале и в некоторых случаях используется для диагностики вирусных болезней животных. Однако этот метод, будучи технически сложным и дорогостоящим, не позволяет точно идентифицировать обнаруженный вирус (от этого недостатка свободен метод иммуноэлектронной микроскопии), поэтому он пока не нашел широкого практического применения в диагностике вирусных болезней животных.

Только вирионы оспенных вирусов удается увидеть в световой микроскоп (хотя и на пределе видимости), поскольку они являются гигантами среди вирионов других вирусов, достигая в размере 300—390 нм. Метод обнаружения вирионов оспенных вирусов с помощью световой микроскопии называется вирусоскопией.

При репродукции многих вирусов в клетках образуются внутриклеточные вирусные тельца-включения. Они могут быть цитоплазматическими (рис. 10) и внутриядерными (рис. 11). По природе это или скопление многих тысяч вирионов, оставшихся в клетке, или клеточный материал, изменившийся под действием репродукции вирионов, или избыток вирусных

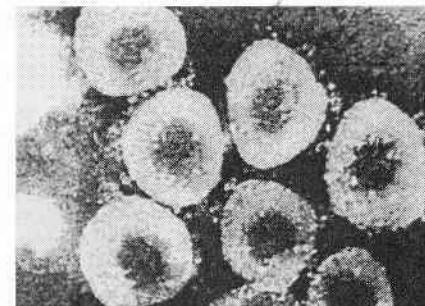


Рис. 8. Вирионы коронавируса кур (по Ю. В. Пантелееву)

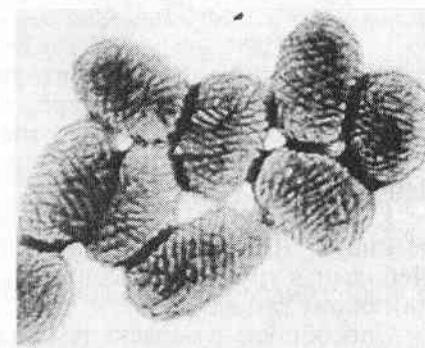


Рис. 9. Вирионы вируса оспы верблюдов (по Ю. В. Пантелееву)

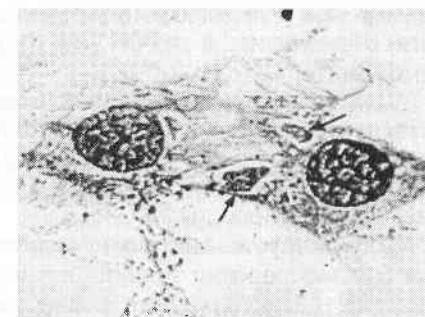


Рис. 10. Цитоплазматические тельца-включения, образованные вирусом PG-3 в клетках почки эмбриона коровы (по Майру и др.)

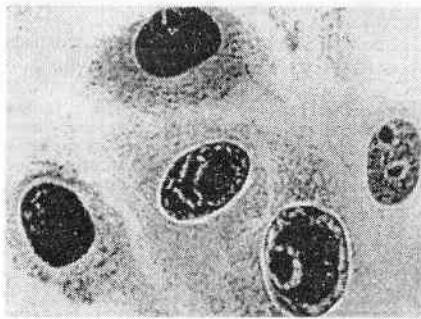


Рис. 11. Внутриядерные тельца-включения, образованные парвовирусом свиней в клетках ПК-15 (по Майру)

разуемые в цитоплазме эпителиальных клеток вирусами оспы птиц — тельцами Боллингера, а оспы млекопитающих — тельцами Гварниери, вирусом чумы плотоядных — тельцами Лентца, вирусом инфекционного ларинготрахеита кур — тельцами Зейфреда.

Как правило, РНК-содержащие вирусы образуют цитоплазматические, а ДНК-содержащие — внутриядерные тельца-включения. Небольшая группа вирусов вызывает образование телец-включений обоих типов.

Способность к окраске теми или иными красителями, размеры, форма, структура и местоположение в клетке телец-включений, образованных разными вирусами, неодинаковые и специфичные для каждого вируса. Поэтому обнаружение в материале от больших животных внутриклеточных телец-включений с определенными характеристиками позволяет судить о том, каким вирусом они образованы, а значит, и о присутствии этого вируса в исследуемом материале.

Для некоторых вирусных болезней (бешенство) обнаружение телец-включений настолько специфично (патогномонично), что позволяет судить о виде инфекции. В большинстве же случаев обнаружение вирусных телец-включений — лишь вспомогательный метод диагностики.

Для обнаружения телец-включений готовят мазки или отпечатки (посмертно или прижизненно), которые подвергают специальным методам окраски с последующей микроскопией. Для телец-включений, образуемых разными вирусами, методы окраски различны. Разработано много рецептов окраски. Среди них есть и универсальные (обзорные), к которым относится окраска гематоксилином-эозином.

белков, не вошедших в состав вирионов, или комбинация этих элементов (чаще всего). Размер телец-включений колеблется от едва заметных до размеров клеточного ядра, а количество — от одиночных до 10—12 на одну клетку. Тельца-включения, образуемые в клетках некоторыми вирусами, получили специальные названия. Так, тельца-включения, образуемые вирусом бешенства в цитоплазме нервных клеток, называются тельцами Бабеша—Негри, об-

## Задания

1. Найти под световым микроскопом в препаратах и зарисовать:
  - цитоплазматические тельца-включения;
  - внутриядерные тельца-включения;
  - вирионы вируса оспы в окраске по Морозову.
2. Ознакомиться с устройством и принципом работы электронного микроскопа.
3. Изучить электронные микрофотографии вирионов разных вирусов (дать их схематический рисунок).

**Материальное обеспечение:** окрашенные препараты, содержащие цитоплазматические тельца-включения; окрашенные препараты, содержащие внутриядерные тельца-включения; мазки оспенных везикул (или фолликул), окрашенные по Морозову; микроскопы с осветителями, иммерсионное масло, бензин, электронный микроскоп, электронные микрофотографии вирионов разных вирусов.

### Примерный план занятия (2 ч)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Самостоятельная работа студентов: а) нахождение в препаратах цитоплазматических и ядерных телец-включений, их схематическая зарисовка; б) нахождение в препаратах элементарных телец вируса оспы и их схематическая зарисовка.
4. Демонстрация устройства, принципа работы и возможностей электронного микроскопа.
5. Схематическая зарисовка вирионов с готовых электронных микрофотографий.
6. Подведение итогов занятия.
7. Задание к следующему занятию.

### Контрольные вопросы

1. Что такое вирионы и как их обнаружить?
2. Каковы структура и форма вирионов разных вирусов?
3. Что такое вирусные тельца-включения и как их обнаружить?
4. Какое диагностическое значение имеет обнаружение вирусных телец-включений и вирионов?

**Методические указания.** 1. Препаратами с цитоплазматическими тельцами-включениями могут служить гистологические срезы головного мозга животного, содержащие тельца Бабеша—Негри (окраска по любому методу). Такие препараты можно получить в вирусологических отделах ветеринарных лабораторий из числа уже использованных в работе. Еще лучше получить парафиновый блок с кусочком мозга павшего от бешенства животного и из него

изготовить гистологические срезы, окрашенные на тельца Бабе-ша—Негри.

Заменить препараты можно культурами любых эпителиоидных клеток, выращенных на покровных стеклах и зараженных оспой соответствующего вида в окраске гематоксилин-эозином (но включения в таких препаратах искать трудно).

2. Препаратами, содержащими внутриядерные включения, могут служить эпителиоидные культуры клеток (например, перевиваемые культуры клеток L или FL) на покровных стеклах, зараженные вирусом болезни Ауески (вирусакциной ВГНКИ или вакциной из штамма ВУК) и окрашенные гематоксилин-эозином.

Возможны и другие варианты подбора культур клеток и ДНК-содержащих вирусов.

3. Мазки, окрашенные на оспу по Морозову, нужно специально получать только в первый год преподавания вирусологии (можно ограничиться демонстрационным показом 1—2 препаратов). В дальнейшем эти препараты будут в большом количестве получаться на лабораторных занятиях по диагностике оспы (их надо только сохранять до следующего учебного года).

4. При отсутствии на кафедре электронного микроскопа необходимо иметь хотя бы хорошо выполненную схему устройства и работы электронного микроскопа.

5. На занятии надо иметь набор электронных микрофотографий разных вирионов (на каждого студента не менее одной). Такие фотографии можно заказать в учреждении, занимающемся электронной микроскопией вирусов. На первый случай можно воспользоваться фотопрепродукциями из хорошо изданных книг.

#### Тема 4

### ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

**Цели использования лабораторных животных в вирусологии.** В связи с тем что вирусы могут размножаться только в живых клетках, на самых ранних этапах развития вирусологии широко применяли культивирование вирусов в организме лабораторных животных, специально выращиваемых для проведения на них исследований. В настоящее время лабораторных животных используют в вирусологии для:

- обнаружения вируса в патматериале;
- первичного выделения вируса из патматериала;
- накопления вирусной массы;
- поддержания вируса в лаборатории в активном состоянии;
- типования вируса;
- получения гипериммунных сывороток;
- в качестве тест-объекта в реакции нейтрализации.

Издавна лабораторных животных применяют для индикации вирусов в патматериале, т. е. для постановки биопробы. С этой целью суспензией патматериала заражают лабораторных животных и учитывают реакцию на заражение. В вирусологической лабораторной практике для диагностики бешенства ставят биопробу на мышатах, инфекционный бронхит кур диагностируют на цыплятах и т. д. (табл. 2).

#### 2. Использование лабораторных животных для биопробы на вирусные болезни

| Вид животного  | Восприимчивость к вирусу      | Метод заражения                       | Признаки размножения вируса   |
|----------------|-------------------------------|---------------------------------------|---|
| Белые мыши     | Бешенства                     | Интрацеребрально, подкожно            | Параличи, гибель  |
|                | Ящура (новорожденные)         | Интрацеребрально, подкожно            | Спастическая параплегия, параличи, гибель   |
|                | Болезни Ауески                | Подкожно, интраперебрально            | Параличи, гибель  |
|                | Везикулярного стоматита       | Внутрибрюшинно, интраперебрально      | Симптомы энцефалита, гибель   |
|                | Гриппа лошадей                | Инtranазально                         | Конъюнктивит, симптомы пневмонии, гибель  |
|                | Гриппа свиней                 | »                                     | То же   |
|                | Африканской чумы однокопытных | Интрацеребрально                      | Симптомы энцефалита, гибель   |
|                | Гриппа свиней                 | Инtranазально                         | Симптомы поражения органов дыхания, гибель  |
| Белые крысы    | Болезни Ауески                | Подкожно интраназально                | Параличи, гибель  |
|                | Бешенства                     | Интрацеребрально                      | То же   |
|                | Ящура (новорожденные)         | Внутрикожно                           | Афты на месте введения  |
|                | Везикулярного стоматита       | »                                     | Везикулы, поражение почек, печени   |
| Морские свинки | Ринопневмонии лошадей         | Внутрибрюшинно                        | АбORTы  |
|                | Чумы плотоядных               | Подкожно, перорально                  | Подъем температуры  |
|                | Бешенства                     | Интрацеребрально, внутримышечно       | Параличи, гибель  |
|                | Ящура (новорожденные)         | Подкожно                              | То же   |
|                | Болезни Ауески                | Внутримышечно, подкожно               | Клинические симптомы в формах: энцефалитической, зудневой, менингитальной, гибель |
|                | Контагиозной экзитомии овец   | Скарификация кожи, слизистых оболочек | Оспенные поражения на месте введения  |
| Кролики        | Миксомы кроликов              | Внутрикожно, подкожно                 | Отек в области головы, гениталий  |
|                |                               |                                       |   |

Чаще признаки присутствия вируса в организме животного бывают малоспецифичны и не позволяют сделать вывод о том, какой именно это вирус. Вид его устанавливают дальнейшими исследованиями. Однако бывают случаи, когда биопроба сопровождается характерной клинической картиной, специфичной для определенного заболевания. Тогда положительная биопроба позволяет сделать вывод не только о присутствии вируса в патологическом материале, но и о его видовой принадлежности. Так, например, если внутримышечное введение кролику суспензии паренхиматозных органов павшего поросенка приводит к появлению нестерпимого зуда на месте введения, расчесов вплоть до разгрызания животным кожи и мышечных тканей и гибели, то это свидетельствует о заражении вирусом болезни Ауески. В этом случае положительная биопроба позволяет установить не только наличие, но и вид вируса.

Другим примером очень немногочисленных случаев биопробы со специфическими признаками являются характерные оспенные поражения у кур, зараженных вирусом оспы кур или оспы голубей, у ягнят — вирусом оспы овец, т. е. у естественно восприимчивых животных.

Полученный от зараженного животного вирусодержащий материал считают выделенным вирусом.

В организме экспериментально зараженных животных обычно вирус накапливается, что может быть использовано для его изучения (например, идентификации) или для получения противовирусных вакцин. Так, противоящурную гидроокисалюминиевую лапинизированную сапонинформолвакцину получают с использованием в качестве живой системы для накопления вируса новорожденных крольчат.

В лабораториях нередко требуется поддержание вирусов на протяжении многих лет в активном состоянии. Поддержание вирусов состоит в чередовании пассажей вирусов на живых системах (в том числе на лабораторных животных) и хранении их в консервирующих условиях. При любом способе консервации вирусы с той или иной скоростью теряют свою активность. Новый пассаж вируса позволяет ее восстановить. Под *пассажем* понимают заражение чувствительной живой системы с целью получения от нее новой популяции вируса. Такой вирус снова хранят в консервирующих условиях.

При работе с вирусом часто требуется знать его инфекционный титр, т. е. его концентрацию в материале. Ее можно определить заражением разными разведениями вирусодержащего материала чувствительных к исследуемому вирусу живых систем, в том числе лабораторных животных. (Вопросы титрования вирусов разбираются в теме 7.)

Лабораторных животных используют также в качестве индикатора свободного вируса в смеси с антителом при постановке реак-

ции нейтрализации и для получения гипериммунных сывороток, применяемых в диагностике вирусных инфекций.

**Виды лабораторных животных.** В вирусологии используют кроликов, морских свинок, белых крыс, золотистых хомячков. Однако только некоторые вирусы удается культивировать на животных перечисленных видов. Во многих случаях для тех же целей используют других чувствительных к данному вирусу животных: кур, голубей, котят, щенков и т. д. Так, биопробу при диагностике ослы птиц ставят на курах, оспы овец — на овцах, чумы свиней — на подсвинках.

**Требования к лабораторным животным.** Комплектуя группы животных для вирусологических исследований, необходимо выполнить следующие требования:

животное должно быть чувствительным к данному вирусу; возраст его имеет большое значение для культивирования многих вирусов. Большинство вирусов лучше размножается в организме молодых и даже новорожденных животных. Например, для биопробы на бешенство и ящур используют мышей-сосунов, на ларинготрахеит птиц — цыплят. Но в то же время заражение взрослых кроликов вирусом болезни Ауески ведет к появлению ярких и специфичных клинических признаков заболевания;

стандартная чувствительность достигается подбором животных определенного возраста и одинаковых по массе. По чувствительности наибольшей стандартностью обладают так называемые линейные животные. Это животные, полученные в результате близкородственного скрещивания в течение ряда поколений. Такие животные становятся настолько генетически однородными, что и их реакция на то или иное воздействие будет одинаковой. Различные линии животных обладают разной чувствительностью к тем или другим группам вирусов и используются целенаправленно. В настоящее время линейных лабораторных животных используют пока большей частью в научно-исследовательской работе;

лабораторные животные должны быть здоровы. Животные, поступающие в виварий вирусологической лаборатории, должны быть привезены из благополучного по инфекционным заболеваниям хозяйства. Их содержат изолированно, т. е. в карантине (белых мышей и крыс 14 дней, а остальных животных 21 день). В этот период за животными ведут ежедневное клиническое наблюдение. При подозрении на наличие инфекционной болезни животных подвергают лабораторному исследованию. В случае установления инфекционного заболевания среди карантинируемых животных всю поступившую партию уничтожают.

Однако для получения полной уверенности в том, что животные действительно здоровы, и такого контроля может оказаться недостаточно. Среди лабораторных животных могут быть распространены латентные инфекции, многие из которых имеют вирусную этиологию. Как известно, латентная инфекция характеризу-

ется тем, что возбудитель постоянно находится в организме, но не проявляет себя клинически. В случае же неблагоприятных воздействий на организм его резистентность снижается, возбудитель бурно размножается и вызывает клиническое проявление заболевания. Таким обостряющим заболевание фактором при вирусологических исследованиях является заражение лабораторных животных, которое, вызвав переход латентной инфекции в острую, приводит к появлению клинической картины и делает невозможным учет реакции на экспериментальное заражение.

Из латентных инфекций лабораторных животных вирусной этиологии значительное распространение имеет эктромелия белых мышей. Ее возбудитель относится к семейству оспенных вирусов. Болезнь проявляется некротическим воспалением лап, а при генерализации инфекции — очагами некроза в печени и селезенке.

Около десяти видов вирусов вызывают у лабораторных животных вирусные пневмонии. Чаще других возбудителем их является вирус Сендай.

И, наконец, третья группа вирусных латентных инфекций — это нейроинфекции, проявляющиеся судорогами, парезами, параличами. Это лимфоцитарный хориоменингит белых мышей, энцефаломиелит белых мышей и латентные вирусные энцефалиты других видов лабораторных животных. Существует метод контроля животных отдельных питомников на носительство возбудителей латентных инфекций. Суть его в приготовлении суспензий из отдельных органов животных, специально убитых для этой цели, и введении их соответствующими методами (например, суспензию из мозга вводят интракраниально) животным того же хозяйства. При наличии латентной инфекции проведенный таким образом пассаж вируса приведет к острому течению болезни.

**Уход за животными и их содержание.** Лабораторных животных размещают так, чтобы, с одной стороны, было обеспечено функционирование всех систем организма в пределах физиологической нормы, с другой — исключено взаимное перезаражение и распространение инфекции за пределы вивария. Животных содержат в виварии с учетом их физиологической потребности в освещенности и температуре. Так, мышам, крысам нужны полумрак и температура воздуха около 20 °С, морским свинкам, кроликам и курам — дневной свет и температура в пределах 16—23, 14—18 и не ниже 0 °С соответственно. Плотность посадки должна составлять примерно 1 г массы лабораторных животных на 1 см<sup>2</sup> дна клетки. Животных обеспечивают регулярным и полноценным кормлением и постоянно питьевой водой.

Если виварий один, зараженных животных содержат изолированно от здоровых и с последних начинают уборку помещения и кормление. Для ухода за зараженными животными используют отдельный инвентарь и кормушки. Лучше иметь два вивария: для содержания здоровых и зараженных животных.

Обслуживающий персонал при работе в виварии пользуется спецодеждой: халатом, резиновыми перчатками, фартуком, непромокаемой обувью. В виварии ежедневно дезинфицируют инвентарь и проводят влажную уборку с применением дезинфицирующих веществ. По окончании эксперимента клетки дезинфицируют, погибших животных обезвреживают сжиганием в печах или автоклавированием.

**Техника безопасности при работе с лабораторными животными.** Прежде всего сотрудники должны быть защищены от естественных инфекционных болезней животных и от воспроизводимых на них экспериментальных инфекций, возбудители которых патогенны для человека.

Наиболее часто встречается среди лабораторных животных такая естественная инфекция, как сальмонеллез. Заразившиеся люди переносят заболевание в гастроинтестинальной или тифоподобной (генерализованной) форме. Опасность для людей представляют также листериоз, псевдотуберкулез, туберкулез, туляремия.

Поскольку многие инфекционные болезни животных протекают в бессимптомной персистирующей форме, животных необходимо периодически обследовать.

Источником инфицирования людей могут служить экспериментально зараженные животные и их эктопаразиты. Профилактика заражения людей от животных проводится с учетом возможного пути передачи данного возбудителя. Состояние здоровья сотрудников лаборатории находится под медицинским контролем с учетом особенностей инфекции, с возбудителем которой работают сотрудники.

При работе в лаборатории с вирусами бешенства, клещевого энцефалита, инфекционного гепатита и некоторыми другими инфекциями сотрудникам делают прививки против этих болезней. В случае необходимости проводят экстренную профилактику специфическим иммуноглобулином или сывороткой реконвалесцентов. Одновременно осуществляют весь комплекс противоэпидемических мероприятий, необходимый при данной инфекционной болезни.

**Метка лабораторных животных.** Метка — непременное условие использования животных в эксперименте. На клетке, в которой помещены зараженные животные, укрепляют бирку с надписью, отражающей использованный для заражения вирус (или номер экспертизы исследуемого патологического материала), количество зараженных животных, дату заражения и, если надо, другие сведения.

Для животных разных видов применяют разные способы индивидуальной метки. Для крупных животных и кур используют металлические бирки со штампованным номером. Бирки надевают на корень уха (кроликам), вставляют в ушную раковину по типу серьги (морским свинкам), надевают на ногу — окольцовывают (курам).

При использовании в эксперименте небольшой группы животных и при непродолжительном сроке его можно выстригать шерсть знаками на спине, бедрах (у кроликов). Морских свинок можно различать по окраске, которую регистрируют в рабочем журнале.

Метка белых мышей, белых крыс может быть проведена ампутацией отдельных пальцев на передних или задних конечностях, каждый из которых соответствует тому или другому порядковому номеру: на передних лапах — единицам, на задних — десяткам. Однако чаще пользуются методом нанесения цветных пятен на непигментированную шерсть. Насыщенный раствор пикриновой кислоты лучше других красителей (растворов фуксина, бриллиантовой зелени) удерживается на шерсти и коже животных. Цветные метки ставятся в местах, соответствующих определенному порядковому номеру животного. Так, если тело животного мысленно разделить на три продольные части (левый бок, спина, правый бок), то нанесение цветных пятен начинают с левого верхнего угла, т. е. лопатки, и это будет соответствовать 1 (рис. 12). Тогда, двигаясь назад, левый бок соответствует 2, а левое бедро — 3, далее затылок — 4, спина — 5, область репицы — 6, правое плечо — 7, правый бок — 8, правое бедро — 9. Используя два цвета красителей, можно дать обозначения одним из них — единиц, другим — десятков.

**Методы экспериментального заражения лабораторных животных.** Вируссодержащий материал может быть введен лабораторным животным различными методами. Наиболее часто используются заражения: подкожное (п/к), внутрикожное (в/к), внутримышечное (в/м), внутрибрюшинное (в/б), внутривенное (в/в), интраназальное (и/н), интрацеребральное (и/ц). Однако в каждом конкретном случае исследователь стоит перед выбором введения материала каким-то одним способом.

Выбор метода заражения определяется тропизмом вируса. Под тропизмом вируса понимают способность его размножаться в определенных типах клеток организма. Вирусы, размножающиеся в нервных клетках, называются *нейротропными* (например, вирус бешенства), размножающиеся в клетках кожи — *дермотропными* (например, вирус оспы), в клетках легких — *пневмоторпными* (вирус гриппа). Вирусы, способные размножаться в нескольких типах клеток, называются *политропными* (вирус инфекционного ри-

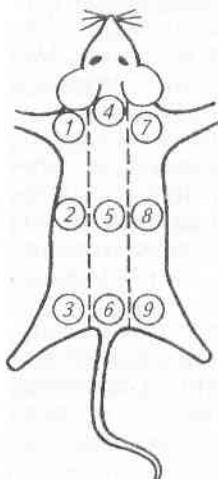


Рис. 12. Вариант нумерации мышей путем нанесения пятен на теле

потрахеита крупного рогатого скота в клетках органов дыхания и размножения), а во всех типах клеток — *пантропными* (вирус чумы собак).

Зная тропизм вируса, материал вводят в органы, содержащие чувствительные к этому вирусу клетки. Например, вирус гриппа вводят интраназально, вирус оспы — внутрикожно, вирус бешенства — интрацеребрально. Пантропные вирусы лучше разносятся по организму при введении их внутривенно или внутривенно.

Если же исследователь не имеет данных о тропизме находящегося в материале вируса, то заражают животных нескольких групп разными методами.

Объем заражающей дозы материала значительно варьирует в зависимости от метода внесения и вида животных (табл. 3).

### 3. Максимальные объемы вводимого материала для лабораторных животных, мл

| Метод заражения   | Кролики | Морские свинки | Белые крысы | Белые мыши |
|-------------------|---------|----------------|-------------|------------|
| Внутрикожный      | 0,1     | 0,1            | 0,05        | 0,02       |
| Подкожный         | 5,0     | 3,0            | 3,0         | 0,5        |
| Внутримышечный    | 5,0     | 2,0            | 1,0         | 0,3        |
| Внутрибрюшинный   | 10,0    | 5,0            | 2,0         | 1,0        |
| Внутривенный      | 5,0     | 2,0            | 2,0         | 1,0        |
| Интраназальный    | 1,0     | 0,3            | 0,1         | 0,03       |
| Интрацеребральный | 0,3     | 0,05           | 0,03        | 0,02       |

Способы фиксации и техника заражения тем или другим методом также различны для животных разных видов. Кроликов удерживают за кожу спины ближе к лопаткам, а другой рукой придерживают заднюю часть тела. Такая фиксация предотвращает получение царапин. Морских свинок держат одной рукой за грудь, а другой — за задние лапы. Крыс и мышей берут за хвост, дают им возможность уцепиться передними конечностями за металлическую сетку (например, клетки), захватывают двумя пальцами левой руки кожу на затылке и слегка растягивают животное. При этом крыс прочнее и безопаснее фиксировать корнцангами, а для большей надежности голову животного можно удерживать двумя корнцангами за щечные кожные складки. Оба этих корнцанга помощник держит в левой руке, а корнцанг, фиксирующий хвост, — в правой.

Белых мышей без помощника фиксируют, захватывая складку кожи между ушами пинцетом Пеано, который, в свою очередь, укрепляют, набрасывая его кольца на держатели штатива Бунзена или, что еще проще, на стоящую в обычном штативе пробирку. Возможна фиксация мышей и одной рукой.

Перед заражением место введения материала тщательно обрабатывают 3%-ным спиртовым раствором йода.

**Под кожное заражение.** Кожную складку, захваченную большим и указательным пальцами левой руки, приподнимают и в ее основание параллельно поверхности тела вводят иглу со шприцем. Местом инъекции, как правило, у большинства животных является область спины, бока, плеча, лопатки и реже боковой стенки грудной клетки (собака), коленной складки (морская свинка), шеи (куры).

**Внутрикожное заражение.** Для заражения этим методом у кроликов на боку или животе выстригают, а затем выбирают шерсть на участке кожи. Подготовленное поле протирают спиртом и физраствором. Иглу шприца скосом наружу вводят под острым углом в толщу поверхностного слоя кожи на несколько миллиметров. Материал инъецируют до приподнимания слоя кожи в виде бугорка.

Мелким лабораторным животным внутрикожно вводят материал в плантарную поверхность задней конечности, которую фиксируют, отводя ее назад и помещая на указательный палец левой руки. Правой рукой иглу со шприцем вводят в кожу в направлении от пальцев к голеностопному суставу.

Для размножения в организме дермотропных вирусов (например, возбудителей оспы) содержащий их материал *втирают в скарифицированную кожу*. На коже, подготовленной как и для внутрикожного заражения, делают несколько поверхностных царапин иглой или обломленной пастеровской пипеткой до появления капелек лимфы. Затем наносят материал и втирают его шпателем, стеклянной палочкой или остриженной зубной щеткой. Заражение в скарифицированную кожу у крупных животных проводят на боку или животе, у морской свинки — на плантарной поверхности ступни, у мелких животных — в области спины, у петухов — в гребень и сережки, а также в перьевые фолликулы голени сразу же после удаления перьев.

**Внутримышечное заражение.** Для этого способа заражения чаще всего выбирают мышцы бедра, а у кур — большую мышцу груди. Иглу после дезинфекции места инъекции вводят через кожу и подкожную клетчатку в мышцы, направляя перпендикулярно к поверхности тела. После инъекции материала иглу извлекают, место введения повторно дезинфицируют.

**Внутрибрюшинное заражение.** Животное при данном способе заражения фиксируют вертикально вниз головой, для того чтобы органы брюшной полости сместились к диафрагме и при введении материала игла не травмировала кишечник (рис. 13). В области паха, а у кур на середине расстояния между верхушкой грудной кости и клоаки короткую иглу вводят сквозь кожу и брюшную стенку, направляя под углом 45° к продольной оси тела. При этом левой рукой слегка оттягивают лапу животного, созда-

ваяя натяжение кожи и мышц брюшной стенки со стороны инъекции. Проникновение иглы ощущается по исчезнувшему сопротивлению брюшной стенки.

**Внутривенное заражение.** Важно контролировать, чтобы в вену из шприца не попали пузырьки воздуха или частицы материала, которые могут вызвать эмболию и гибель животного.

Белых мышей и крыс заражают в боковые вены хвоста, предварительно расширив их, растирая тампоном, смоченным ксилолом или горячей водой. Помощник левой рукой сдавливает хвост у корня, а правой фиксирует животное за кожу затылка. Иглу скосом наружу вводят под острым углом в вену нижней трети хвоста, где кожа тоньше, и направляют к корню хвоста (рис. 14). Если игла попала в сосуд, то жидкость легко поступает из шприца, а сосуд на всем протяжении бледнеет.

Освободив вену у корня хвоста, медленно вводят материал. Затем вену передавливают ниже места вкola, иглу извлекают и место инъекции прижимают сухой ватой.

Морским свинкам можно ввести вирус в ток крови, только проникнув иглой в сердце. Для этого определяют место сердечно-го толчка, в межреберный промежуток слева и на 1 см выше мечевидного отростка вводят иглу без шприца. Если в игле покажется кровь, значит, игла попала в сердце, и тогда, присоединив шприц, инъецируют материал.

Кроликам внутривенно материал вводят в краевую вену уха, предварительно удалив волосы на месте инъекции и пережав сосуд ниже вкola иглы. Игла должна быть направлена по ходу тока крови, т.е. к голове. Птице вируссодержащий материал вводят в подкрыльцовую вену.

**ИнTRANАЗАЛЬНОЕ заражение.** Большинство лабораторных животных (за исключением кроликов) при закапывании материала в ноздри чихают и разбрзгивают вируссодержащую суспензию. Поэтому перед интраназальным заражением животным делают глубокий эфирный наркоз. Для этого помещают их в банку с крышкой и кусочком смоченной эфиром ваты. Заснувших животных извлекают, фиксируют вверх ноздрями. Материал по каплям вводят в ноздри, и с вдыхаемым воздухом он втягивается внутрь.

Кроликам же вируссодержащую суспензию можно закапывать в ноздри по каплям при запрокинутой на спину голове без наркоза.

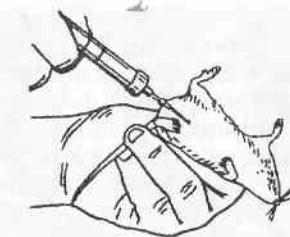


Рис. 13. Внутрибрюшинное заражение мыши

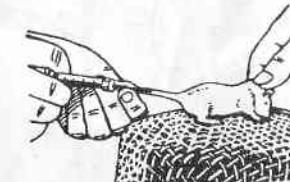


Рис. 14. Внутривенное заражение мыши

**Интрацеребральное заражение.** Кожу головы мышат большим и указательным пальцами левой руки оттягивают к затылку. Иглой шприца с ограничителем прокалывают кожу и череп на глубину 1—2 мм в точке, лежащей в центре квадрата, образованного средней сагиттальной линией и перпендикуляром к ней, проходящим по наружному краю глазниц (рис. 15).

Белых крыс интрацеребрально заражают через трепанационное отверстие, а молодых кроликов и морских свинок — прокалывая кости черепа в надглазничной борозде, где кость довольно тонкая. Иглы используют с ограничителем, обеспечивающим проникновение иглы не более чем на 4—5 мм. Старых животных интрацеребрально заражают через трепанационное отверстие (рис. 16).

После заражения животные должны быть помещены в клетки, на которые навешивают этикетки с указанием вируса или номера экспертизы исследуемого материала, количества и номеров зараженных животных, даты заражения. В рабочем журнале записывают название вируса или номер экспертизы исследуемого материала, количество и характеристику зараженных животных, их маркировку, метод введения и дозу вируса.

За животными устанавливают наблюдение, обращая внимание на их внешний вид, подвижность, прием пищи и т. п. Следует отметить, что гибель животных в первые дни после заражения может быть связана с травмой или токсическим действием исследуемого материала.

**Признаки размножения вируса в организме лабораторного животного.** В последующие за заражением дни ведут ежедневные наблюдения за животными, контролируя их клиническое состояние. В случае размножения вируса в чувствительных к нему клетках организма последние повреждаются или гибнут. При значительном количестве поврежденных вирусом клеток нарушается функциони-



Рис. 15. Интрацеребральное заражение мыши

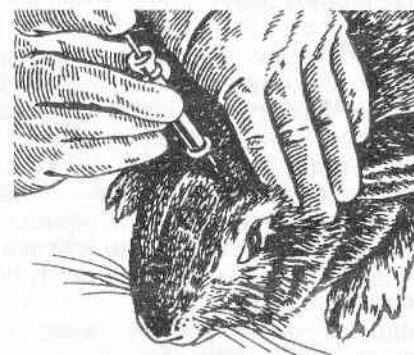


Рис. 16. Интрацеребральное заражение кролика

рование части или всего органа. Это проявляется соответствующими изменениями в состоянии и поведении животного. Так, при размножении вируса в клетках респираторного тракта наблюдаются кашель, хрипы, одышка, при размножении вируса в клетках мозга — судороги, парезы, параличи и т. д.

Видимые изменения в состоянии и функционировании организма называют клиническими признаками болезни, а появление их после экспериментального заражения считают косвенным доказательством размножения вируса (рис. 17). При этом учитывают не только сам факт и характер появившихся изменений, но и продолжительность инкубационного периода, которая характерна для определенной болезни. Инкубационный период зависит не только от свойств возбудителя, но и от дозы вируса, пути его проникновения в организм и состояния самого организма.

Клинические признаки, появившиеся у лабораторных животных, зараженных с целью биопробы (обнаружения вируса), указывают на то, что в исследуемом патматериале содержался вирус. Эти признаки большей частью носят неспецифический характер (например, угнетение, снижение аппетита, одышка и т. п.), и на этом этапе исследований еще нет возможности прийти к заключению, какой именно вид вируса вызвал заболевание. Для этого необходимо идентифицировать обнаруженный вирус с помощью серологических реакций (см. тему 13). При этом неизвестным антигеном является выделенный вирус, содержащийся в материале, полученном при вскрытии использованного для биопробы животного.

Нередко заболевание заканчивается гибелю, что также бывает через определенное время после заражения и служит одним из признаков размножения вируса в организме.

На размножение вируса в организме указывают не только клинические признаки и гибель животного, но и видимые изменения самих органов и тканей, которые, как говорилось выше, возникают в связи с гибелю зараженных вирусом клеток. Патологоанатомические признаки выражаются изменением цвета, размера, формы и консистенции органов, а также в появлении образований, в норме не встречающихся.

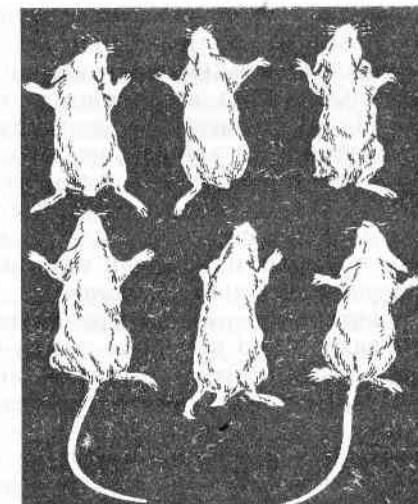


Рис. 17. Эктромелия у мышей (отпадание конечностей и хвоста)

Итак, три признака указывают на наличие вируса в материале, которым заражали лабораторных животных: симптомы болезни, патологоанатомические изменения и гибель. Однако не всегда названные признаки сопровождают размножение вируса в организме. Например, вирус, содержащийся в патологическом материале, полученном от лошади, не может легко и с клиническими проявлениями размножаться в организме белых мышей. В первом пассаже лишь единичные вирусные частицы найдут для себя чувствительные клетки, но их будет так мало относительно целого органа, что видимых изменений организма не возникнет. Такой пассаж получил название «слепого».

Заряженное, но не проявившее признаков болезни животное убивают через интервал времени, равный двум инкубационным периодам, и берут при вскрытии патологический материал, предположительно содержащий размножившийся и накопившийся вирус.

Суспензией из материала от первого пассажа заражают других животных того же вида. При этом в организм попадает большее, чем в первом пассаже, количество вирусных частиц, способных размножаться в таких условиях. Однако при втором пассаже вирус может также не накопиться до уровня инфекционной дозы и не вызвать видимых изменений. Тогда и второй пассаж окажется «слепым».

По тому же принципу делают третий пассаж и в случае появления признаков заболевания приходят к заключению о присутствии вируса в исследуемом материале. Полученный от реагировавшего животного вирусодержащий материал считают *выделенным вирусом*.

При биопробе с целью обнаружения вируса на других лабораторных живых системах поступают по тому же принципу.

Вирусы же, для обнаружения и выделения которых используют естественно восприимчивых животных, не нуждаются в предварительной адаптации и проявляют себя в биопробе определенными признаками уже на первом пассаже.

**Вскрытие лабораторных животных.** Для изучения патологоанатомических изменений и получения вирусодержащего материала экспериментально зараженных животных вскрывают. Делают это сразу же после гибели их, что предотвращает обсеменение органов и тканей микрофлорой, находящейся при жизни животного на поверхности слизистых оболочек, особенно в кишечнике. Если зараженное животное не погибло, его убивают в момент максимального проявления симптомов болезни или при их отсутствии на 8—10-й день после заражения.

Убить животное можно избыточной дозой наркоза, а также (мелких животных) путем разрыва спинного мозга. Для этого тело животного, удерживая правой рукой за затылок, а левой за хвост, быстрым коротким движением растягивают до ощущения обрыва

нити. Менее гуманный метод умерщвления — декапитация (отрезание головы).

Для удобства вскрытия труп животного фиксируют. Более крупных животных укрепляют на специальных вскрывочных столиках или на доске с приспособлением для фиксации конечностей и головы. Мелких животных целесообразно фиксировать в кювете с залитым воском (парафином) и покрытым бумажной салфеткой дном. Для фиксации используют инъекционные иглы или одностержневые булавки (портновские). Вскрытие выполняют стерильными инструментами.

Брюшную и грудную полости вскрывают при фиксации животного в спинном положении с направленными в стороны и укрепленными передними и задними конечностями (рис. 18).

Шерсть животного по линии разреза обрабатывают дезинфицирующим раствором. Мелких животных перед вскрытием можно опускать полностью в дезинфицирующий раствор, держа за хвост.

Разрез кожи делают по белой линии от лонной кости (симфиза) до шеи. Чтобы при этом не прорезать брюшную стенку, пинцетом, находящимся в левой руке, приподнимают кожу и делают сначала поперечный надрез складки кожи, удерживаемой пинцетом у симфиза, а затем, вставив одну браншу ножниц в образовавшееся отверстие, разрезают кожу до шеи животного, после чего кожу разрезают по направлению к каждой из четырех конечностей. Тупым путем кожу отпрепаровывают, открывая ее лоскуты вправо и влево наподобие дверок шкафа. Лоскуты кожи фиксируют булавками за верхние и нижние углы.

Заменив инструменты, вскрывают брюшную полость. Для этого разрез брюшной стенки делают под линией диафрагмы и по бе-

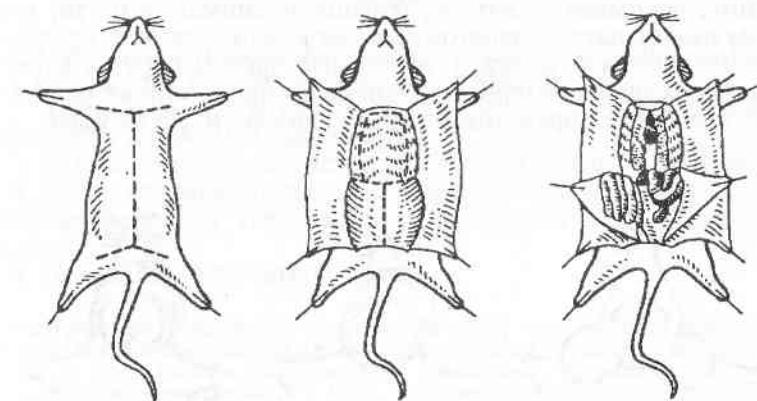


Рис. 18. Порядок вскрытия брюшной и грудной полостей

лой линии до лонной кости. Треугольники брюшной стенки отводят в стороны и фиксируют.

В качестве вируссодержащего материала из брюшной полости берут кусочки (или целый орган у мелких животных) печени, селезенки, почки, брыжеечные лимфатические узлы, участок кишечника при наличии патологоанатомических изменений или симптомов болезни, наблюдавшихся перед смертью.

Грудную полость вскрывают с учетом того, что она имеет твердые стенки. Для получения доступа к находящимся в ней органам с нее надо как бы снять «крышку». Для этого разрезают ребра по-перек сзади вперед, удаляя их вместе с груднойостью.

Череп вскрывают, укрепив животное в брюшном положении путем фиксации передних конечностей и головы (рис. 19). Кожу головы и шеи обрабатывают дезинфицирующим раствором. Разрез кожи делают перпендикулярно оси тела за ушами, продолжают слева и справа вперед к глазницам. Кожу вместе с ушами отпрепаровывают и отбрасывают вперед, оголяя черепную коробку. Одну браншу ножниц вставляют в большое черепное отверстие и режут кости черепа влево и вправо по направлению к глазницам. Затем разрезают кости черепа между глазницами и удаляют весь вырезанный участок. Если кости черепа толстые, их распиливают по тем же направлениям. Можно разрезы черепа вести от глазниц назад.

Мозг животных, имеющий мажущуюся мягкую консистенцию, извлекают из основания черепа, подняв его слегка раздвинутыми браншами ножниц и подрезав черепно-мозговые нервы.

Основное требование к вируссодержащему материалу — максимальное содержание в нем вируса, что определяется тропизмом вируса, т.е. способностью его размножаться в определенном типе клеток, а следовательно, и в соответствующих органах животного. Поэтому, вскрывая животное, обращают внимание на то, какие органы имеют патологоанатомические изменения, т.е. предположительно содержат вирус. Измененные органы берут в качестве вируссодержащего материала. Одновременно с той же целью берут регионарные пораженному органу лимфатические узлы.



Рис. 19. Порядок вскрытия черепной полости

При заражении животных пневмоторпными вирусами в качестве вируссодержащего материала берут легкие, средостенные лимфатические узлы, трахею. Висцеротропные вирусы содержатся в паренхиматозных органах брюшной полости (в печени, селезенке), брыжеечных лимфатических узлах и стенке кишечника. Для исследований нейротропных вирусов берут головной, а если надо, то и спинной мозг.

Каждую пробу материала, разделив на две части, помещают отдельно в две стерильные пробирки, закрытые резиновыми пробками. Ткань одной пробирки предназначается для вирусологических исследований, поэтому ее сразу же заливают соответствующим фиксатором. В тех случаях, когда в комплексе диагностических исследований на определенную инфекцию предполагаются микроскопические методы обнаружения вируса (световая, люминесцентная микроскопия), из вируссодержащих органов делают мазки или отпечатки.

Учитывая, что специфические для вируса изменения могут быть локализованы в различных отделах органа (например, в мозге при бешенстве), отпечатки готовят следующим образом: мозг мелкого животного из вскрытой черепной полости, не повреждая структуры, переносят на лист ( $10 \times 10$  см) фильтровальной бумаги, где он достаточно прочно фиксируется. Браншами глазных ножниц отрезают по вертикальной плоскости небольшой кусочек его и кладут на бумагу рядом. Затем отрезают следующий слой мозга и также кладут рядом и т. д. Взяв в левую руку лист бумаги с фиксированными на нем кусочками мозга, правой рукой прикладывают сверху к каждому поочередно предметное обезжиренное стекло, получая отпечатки.

### Задания

1. Отработка приемов фиксации и экспериментального заражения лабораторных животных всеми методами.
2. Заражение внутрикожно белых мышей вирусом эктромелии и кроликов вирусом осповакцины.
3. Установление у зараженных животных симптомов болезни.
4. Вскрытие зараженных животных с целью обнаружения патологоанатомических изменений и получения вируссодержащего материала.
5. Получение отпечатков мозга.

**Материальное обеспечение:** суспензии вирусов эктромелии и осповакцины; кролики; белые мыши; клетки для животных; кюветы с восковым дном; стерилизаторы со стерильными инструментами (шприцами, инъекционными иглами, пинцетами анатомическими 14 и 10 см, ножницами глазными); вата; спирт; эфир для наркоза; банка вместимостью 0,5 л с крышкой; стериллизованные ватные тампоны в бумажной упаковке (ватики); стерильный физиологический раствор; фильтровальная бумага; стекла предметные; раствор пикриновой кислоты.

## Примерный план занятий

### Первое занятие (2 ч).

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Демонстрация: а) приемов обращения со стерилизованными инструментами, подготовки шприца и его наполнения инфекционным материалом; б) приемов фиксации животных; в) методов экспериментального заражения кроликов и белых мышей.

4. Самостоятельная работа студентов: а) отработка приемов фиксации и экспериментального заражения белых мышей и кроликов (вводят физраствор); б) внутрикожное заражение белых мышей вирусом эктромелии (или кролика вирусом осповакцины) и их метка раствором пикриновой кислоты; в) размещение зараженных животных в отдельной клетке и укрепление на ней соответствующей этикетки с указанием использованного при заражении вируса, количества животных, номера учебной группы и даты заражения.

5. Подведение итогов занятия.
6. Задание к следующему занятию.

### Второе занятие (2 ч).

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.

3. Демонстрация: а) клинических признаков заболевания у зараженных лабораторных животных; б) методов умерщвления лабораторных животных; в) техники вскрытия (обращают внимание студентов на состояние внутренних органов) и приемов получения вируссодержащего материала; г) техники изготовления отпечатков мозга; д) действий по обеззараживанию рабочего места и трупа после вскрытия зараженного животного.

4. Самостоятельная работа студентов: а) распознавание по цветной метке зараженных каждым из студентов мышей, анализ их клинического состояния, умерщвление, фиксация в кювете с восковым (парафиновым) дном, вскрытие; б) анализ патологоанатомических изменений, получение вируссодержащего материала (паренхиматозных органов), приготовление послойных отпечатков мозга; в) при наличии у животных поражений конечностей (отек, некроз кожи), характерных для эктромелии мышей, берут ступню задней конечности в качестве вируссодержащего материала для последующего пассажа и помещают в стерильную пробирку под резиновой пробкой.

5. Подведение итогов занятия.
6. Задание к следующему занятию.

## Контрольные вопросы

1. Какие виды лабораторных животных и в каких целях используют в вирусологии?
2. Какие наиболее употребимые методы экспериментального заражения лабораторных животных вы знаете?
3. Каковы признаки размножения вируса в организме лабораторного животного?
4. В чем диагностическое значение положительных результатов биопробы?
5. Что такое «слепой» пассаж?
6. На чем основан выбор органа, извлекаемого в качестве вируссодержащего материала при вскрытии?

**Методические указания.** Изучение темы целесообразно провести на двух занятиях по 2 ч с интервалом в 5—7 дней. Из лабораторных животных удобнее использовать для отработки темы кроликов и белых мышей, которые по сравнению с морскими свинками более выносливы, а в противоположность белым крысам неагрессивны. Заражение же петухов входит в план занятия по изучению лабораторной диагностики оспы кур.

Из двух рекомендованных к занятию животных одно используют только для отработки методов его экспериментального заражения и применяют при этом стерильный физиологический раствор, а другое заражают вирусом, вызывающим развитие оспенного процесса при внутрикожном введении. Желательно дать по две мыши каждому студенту. В этом случае одну мышь используют для отработки всех методов заражения, а другую заражают внутрикожно вирусом эктромелии мышей и метят. Кроликов обычно дают по одному на группу из нескольких студентов. Вирус эктромелии иногда можно выделить от естественно-больных мышей в питомниках или вивариях и поддерживать пассажами на мышах или куриных эмбрионах. Его также можно получить из исследовательских учреждений, имеющих музеи вирусных штаммов.

При интрацеребральном заражении мышей используют иглы с ограничителем, предупреждающим глубокое проникновение в черепную полость и травмирование мозга. В качестве ограничителя на иглу можно надеть кусочек резины. С этой целью при заражении кроликов используют иглу для туберкулинизации крупного рогатого скота. Такая игла, как известно, состоит из двух продолжающихся друг друга частей разной толщины. При этом часть, несущая острие иглы, имеет меньший диаметр и длину около 0,5 см, тогда как верхняя, более толстая часть служит преградой для проникновения иглы в черепную полость.

Для мышей ограничитель на игле монтируют до стерилизации путем пронизывания продолговатого (примерно 2x20 мм) бруска, вырезанного из резиновой трубки, так, чтобы острие иглы выступало на 1—2 мм. Учитывая, что кости черепа мыши довольно тонкие, иглу со шприцем ставят на точку вкولا, а затем, держа шприц только за цилиндр и вращая его между большим и средним паль-

циами, вводят иглу интрацеребрально, не надавливая на шприц, а лишь под действием его тяжести. Затем легким касанием поршня шприца указательным пальцем вводят минимальный (около 0,01 мл) объем вирусодержащего материала.

Смонтировав шприц и укрепив на нем инъекционную иглу, набирают вирусодержащий материал так, чтобы во флакон или пробирку была введена только игла, но не цилиндр шприца.

От попавшего с набирайемым в шприц материалом воздуха освобождаются, повернув шприц вертикально вверх иглой, которая предварительно воткнута в толщу стерильного комочка ваты, упакованного в сложенный по типу конверта небольшой лист пергаментной бумаги. Иглу вкалывают в толщу ватника через складки бумаги, где ее не касались руками. Ватники предотвращают потерю капель вирусодержащего материала из шприца, т. е. распространение вируса в окружающей среде. Кроме того, игла, находясь в ватнике, до момента инъекции остается стерильной.

При вскрытии белых мышей поступают следующим образом: в кювету на слой воска (парафина) кладут лист бумаги того же размера, что и площадь кюветы, поверх бумаги прикрепляют труп мыши, который по окончании вскрытия заворачивают в эту бумагу и сбрасывают в контейнер для трупов. По мере надобности воск (парафин) в кювете перетапливают.

Метку животных путем нанесения цветных пятен целесообразно проводить после их заражения.

## Тема 5

### КУРИНЫЕ ЭМБРИОНЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

Куриные эмбрионы как живая система вошли в вирусологическую практику в 30-х годах XX в. Их использование расширило спектр культивируемых в лабораторных условиях вирусов, позволило более успешно решать стоящие перед вирусологией задачи в связи с тем, что куриные эмбрионы имеют ряд преимуществ перед лабораторными животными.

Так, скорлупа и подскорлупная оболочка надежно защищают эмбрион от бактериального заражения со стороны внешней среды. Важным преимуществом эмбрионов является также их высокая чувствительность к широкому спектру вирусов, что объясняется недостаточным развитием защитных механизмов. Куриные эмбрионы — легкодоступный объект в связи с развитием широкой сети птицефабрик и инкубаториев. Кроме того, куриные эмбрионы экономичны, не требуют ухода и кормления.

Однако нельзя полностью гарантировать стерильность этой живой системы, так как эмбрионы могут нести в своем содер-

жении вирусы и другие патогенные агенты (вирусы инфекционного бронхита кур, ньюкаслской болезни, гриппа, лейкоза, хламидии и микоплазмы). Их присутствие может искажать результаты исследования.

Используют куриные эмбрионы в вирусологии в основном для тех же целей, что и лабораторных животных, а именно:

обнаружения в патматериале активного вируса биопробой;

первичного выделения вируса. Эффективно выделяют и культивируют на куриных эмбрионах вирусы, вызывающие заболевания у птиц, а также некоторые вирусы млекопитающих;

поддержания вирусов в лаборатории;

титрования вирусов;

накопления вируса для лабораторных исследований и получения вакцин;

как тест-объект в реакции нейтрализации.

При отборе куриных эмбрионов для заражения вирусодержащим материалом к ним предъявляют следующие требования:

эмбрионы должны быть получены из хозяйств, благополучных по инфекционным болезням, скорлупа яиц должна быть непигментированной, чистой (мыть нельзя). Возраст эмбриона должен соответствовать изранному методу заражения.

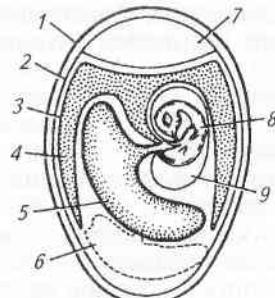
**Строение куриного эмбриона.** Обычно курица откладывает оплодотворенное яйцо, в котором зародыш находится на стадии бластулы или ранней гаструлы. При нагревании яйца до температуры, близкой к температуре тела курицы, происходит дальнейшее развитие зародыша (рис. 20). В период с 5-го по 12-й день инкубации куриные эмбрионы могут быть использованы для заражения вирусами.

Яйцо с развивающимся куринным эмбрионом покрыто снаружи твердой пористой скорлупой, к которой плотно прилегает подскорлупная оболочка. Последняя в тупом конце яйца разделяется на два листка, между которыми образуется воздушная камера. Тело зародыша лежит в яйце эксцентрично, спиной ближе к скорлупе, голова направлена в сторону воздушной камеры. Зародыш погружен в околоплодную жидкость, заполняющую амниотическую полость, и пуповиной связан с желтком. Желток также располагается эксцентрично и относительно зародыша как бы по другой стороне продольной оси.

Непосредственно под подскорлупной оболочкой находится аллантоисная по-

Рис. 20. Схематический разрез куриного эмбриона на 8-й день инкубации:

1 — скорлупа; 2 — подскорлупная оболочка; 3 — хорион-аллантоисная оболочка; 4 — аллантоисная полость; 5 — желточный мешок; 6 — белок; 7 — воздушная камера; 8 — тело зародыша; 9 — амниотическая полость



лость, покрывающая амнион и желточный мешок, а к 10—11-му дню замыкающаяся в остром конце яйца. В процессе развития аллантоисная оболочка срастается с хорионом, образуя единую хорионаллантоисную оболочку (ХАО). В остром конце яйца находится остаток белка.

Размножение вирусов возможно во всех структурах эмбриона, имеющих клеточное строение, к которым относятся зародыш, ХАО и желточный мешок. Накопление вирусов происходит в тех же структурах, но ряд вирусов может накапливаться в аллантоисной и в амниотической жидкостях, образуя практически готовую суспензию вирусов.

Заражение в ту или другую часть эмбриона проводится в период ее максимального развития, когда количество чувствительных клеток будет наибольшим.

В процессе инкубации меняются размеры зародышевых структур, что во многом объясняется их функциональным назначением и определяет оптимальный для заражения возраст эмбриона. Так, желточный мешок как резервуар питательных веществ имеет наибольший объем в начале инкубации, а затем (после 12-го дня) по мере развития зародыша он уменьшается. Заражают в желточный мешок с 5-го по 7-й день инкубации.

Амниотическая полость, являясь буферной средой развития зародыша, покрывает его уже на 5-й день инкубации. Среднее количество жидкости к середине периода инкубации составляет около 1 мл.

Для заражения в амниотическую полость используют эмбрионы в возрасте 6—10 дней.

Аллантоисная полость служит для сбора продуктов обмена, в ней скапливаются мочекислые соли, фосфорные и азотистые соединения. В процессе роста и развития зародыша аллантоисная жидкость приобретает кислую реакцию. Максимальных размеров аллантоисная полость достигает на 9—12-й день развития эмбриона, поэтому заражение в аллантоисную полость проводят преимущественно на 9—11-й день инкубации.

Хорионаллантоисная оболочка богата кровеносными сосудами, которые, тесно прилегая к внутренней поверхности пористой скорлупы, насыщаются кислородом и снабжают им тело зародыша, выполняя функцию органа дыхания эмбриона. Максимально-го развития ХАО достигает на 11—13-й день. Заражение на хорионаллантоисную оболочку проводят на 10—12-й день инкубации.

**Подготовка куриных эмбрионов к заражению.** Эмбрионы доставляют из инкубатория, не допуская их охлаждения в пути. В лаборатории эмбрионы инкубируют в термостате при температуре 37 °С и влажности 60—70 %, что достигается установлением в термостате открытых широкогорлых сосудов с водой. Вентиляционные отверстия термостата должны быть открыты. Эмбрионы размещают воздушной камерой вверх в специальных штативах. Рекомендуется до-

момента заражения дать возможность эмбрионам в течение суток адаптироваться к новым условиям и нормализовать свои функции после транспортного стресса. Если лаборатория располагает собственным инкубаторием, то снесенные курицей оплодотворенные яйца пригодны для закладки в него в течение 10 дней.

Подготовка куриных эмбрионов к заражению включает овоскопирование и дезинфекцию скорлупы, а также соответствующую подготовку рабочего места. Овоскопирование представляет собой просмотр яиц против достаточно яркого источника света (овоскоп), в результате чего на неосвещенной стороне скорлупы образуются тени от внутренних структур (рис. 21). Овоскопирование проводят в затемненном помещении. При этом на скорлупе графитным карандашом отмечают границу воздушной камеры, место расположения зародыша и участок бессосудистой зоны размером 0,5 x 0,5 см. Эти отметки служат ориентиром при выборе места введения вирусодержащего материала. При овоскопировании также определяют, жив зародыш или погиб. Зародышей, проявляющих активные движения при хорошей кровенаполненности сосудов ХАО, считают живыми.

Куриные эмбрионы заражают в асептических условиях (лучше в боксе). В предбокснике скорлупу эмбрионов обрабатывают йодированным спиртом, затем уже в боксе повторно протирают, а иногда еще и фламбируют — обрабатывают пламенем смоченного спиртом тампона.

Эмбрионы фиксируют в специальных подставках, установленных в эмалированной кювете на 3—4-слойной марлевой салфетке, смоченной дезинфицирующим раствором.

В работе используют инструменты, стерилизованные кипячением. Их ставят в баночку со спиртом и обжигают пламенем горелки перед каждым повторным использованием.

**Методы экспериментального заражения куриных эмбрионов.** Существует шесть методов заражения эмбрионов. Наиболее часто используют заражение в аллантоисную полость и на хорионаллантоисную оболочку, реже — в амниотическую полость и в желточный мешочек и совсем редко — в тело зародыша и в кровеносные сосуды ХАО. Выбор метода определяется тропизмом вируса, а также целью заражения. При любом методе заражения вводят 0,1—0,2 мл инфекционного материала.

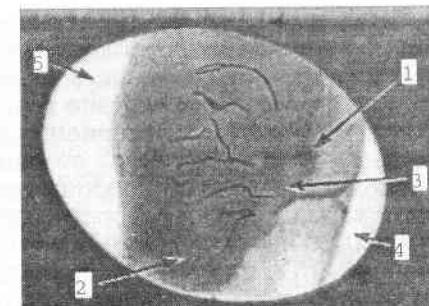


Рис. 21. Овоскопирование 10-дневного куриного эмбриона. Видны тени:

1 — зародыша; 2 — желточного мешка; 3 — кровеносных сосудов ХАО; 4 — воздушной камеры; 5 — белка

**Заражение в аллантоисную полость.** При заражении этим методом хорошо размножаются вирусы гриппа, ньюкаслской болезни, ринопневмонии лошадей, везикулярного стоматита и др. Существует несколько вариантов метода.

**Первый вариант.** Эмбрион фиксируют вертикально тупым концом вверх. В скорлупе на стороне зародыша, а иногда с противоположной зародышу стороны на 5—6 мм выше границы воздушной камеры делают отверстие диаметром около 1 мм. Иглу вводят параллельно продольной оси на глубину 10—12 мм (рис. 22 и 23). После инъекции вирусодержащего материала иглу извлекают, а отверстие в скорлупе закрывают каплей расплавленного стерильного парафина.

**Второй вариант.** Сделанное в скорлупе над воздушной камерой отверстие используют лишь для выхода части воздуха. Отверстие же для самого заражения делают на участке бессосудистой зоны хорион-аллантоисной оболочки (ХАО) со стороны зародыша. Иглу вводят на глубину не более 2—3 мм. Инъцируют инфицирующую жидкость в объеме 0,1—0,2 мл и закрывают отверстие парафином (рис. 23).

**Заражение на хорион-аллантоисную оболочку.** Этот метод заражения куринных эмбрионов чаще используют для культивирования эпителиотропных и пантропных вирусов оспы, инфекционного ларинготрахеита птиц, чумы плотоядных, болезни Ауески, катаральной лихорадки овец и др.

Такое заражение может быть выполнено через естественную или искусственную воздушную камеру.

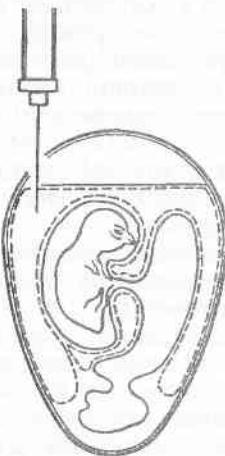


Рис. 22. Заражение куриного эмбриона в аллантоисную полость (по Николау и др.)

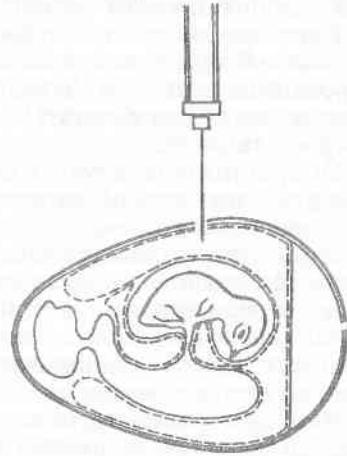


Рис. 23. Заражение куриного эмбриона в аллантоисную полость (по Николау и др.)

Для заражения *через естественную воздушную камеру* эмбрион помещают в штатив вертикально тупым концом вверх и в скорлупе против центра воздушной камеры вырезают круглое окно диаметром 15—20 мм. Через это окно пинцетом снимают подскорлупную оболочку. На обнажившийся участок ХАО наносят 0,2 мм вирусодержащей суспензии (рис. 24), отверстие закрывают лейкопластырем или реже покровным стеклом, укрепив его расплавленным парафином.

Заражение *через искусственную воздушную камеру* применяют чаще первого, так как оно обеспечивает контакт вирусодержащего материала с большей поверхностью ХАО и, следовательно, ведет к образованию большего количества вируса. Для заражения эмбриона этим методом его помещают в штатив горизонтально зародышем вверх. В скорлупе делают два отверстия: одно небольшое над центром воздушной камеры (предназначено для отсасывания из нее воздуха), а другое диаметром 0,2—0,5 см сбоку, со стороны зародыша. Сложность метода в том, что делая второе отверстие, необходимо осторожно снять вначале кусочек скорлупы, затем скользящим движением, не повреждая ХАО, сдвинуть подскорлупную оболочку в сторону так, чтобы через образовавшийся дефект мог пройти воздух. После этого резиновой грушей через первое отверстие отсасывают воздух из естественной воздушной камеры (рис. 25, а). В результате через боковое отверстие наружный воздух устремляется внутрь, образуя искусственную воздушную камеру, дном которой является ХАО (рис. 25, б).

Через боковое отверстие на поверхность ХАО наносят инфекционную жидкость и отверстие закрывают кусочком лейкопластиря. Закрывать первое отверстие нет необходимости, так как внутренний листок подскорлупной оболочки при этом методе заражения не нарушается и продолжает выполнять роль барьера для микрофлоры окружающей среды.

Дальнейшую инкубацию эмбрионов, зараженных этим методом, проводят в горизонтальном положении боковым отверстием вверх.

**Заражение в желточный мешок.** Большей частью им пользуются для размножения хламидий, а также вирусов болезни Марека, ринопневмонии лошадей, катаральной лихорадки овец и

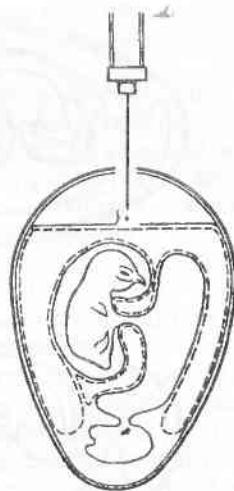


Рис. 24. Заражение куриного эмбриона на ХАО через естественную воздушную камеру (по Николау и др.)

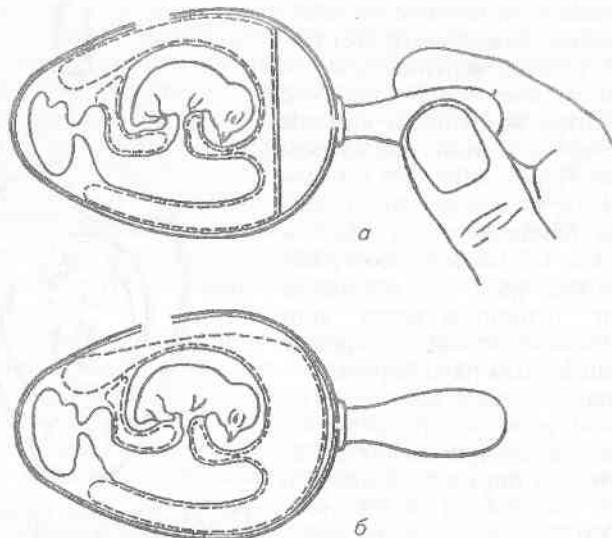


Рис. 25. Заражение куриного эмбриона на ХАО через искусственную воздушную камеру (по Николау и др.)

др. Заражают эмбрионы 5—7-дневного, а иногда и 2—3-дневного возраста (вирус лихорадки долины РИФ). Используют два варианта заражения.

*Первый вариант.* Эмбрионы помещают в штатив в вертикальном положении. Делают отверстие в скорлупе над центром воздушной камеры и вводят иглу на глубину 3,5—4 см под углом 45° к вертикальной оси в направлении, противоположном месту нахождения зародыша (рис. 26).

*Второй вариант.* Иногда аналогичный путь заражения осуществляется на горизонтально укрепленном в штативе эмбрионе; при этом зародыш находится внизу, а желток — над ним. Отверстие в скорлупе закрывают каплей расплавленного парафина.

Заражение в амниотическую полость. Для этой цели используют эмбрионы 6—10-дневного возраста. Метод ис-

пользуется при культивировании вирусов гриппа, мьюкаслской болезни, ринопневмонии лошадей и др. Есть два способа заражения.

*Закрытый способ.* Заражение проводят в затемненном боксе. Яйцо помещают на овоскопе в горизонтальном положении зародышем вверх. Через отверстие в скорлупе над воздушной камерой вводят иглу с затупленным концом по направлению к зародышу. Доказательством того, что игла проникла в амнион, служит движение тела зародыша в направлении передвижения.

*Открытый способ.* Скорлупу над воздушной камерой срезают так, чтобы образовалось окно диаметром 1,5—2,5 см. Через него пинцетом под контролем глаза снимают подскорлупную оболочку. Затем анатомический (14 см) пинцет с сомкнутыми браншами ведут, продавливая хорионаплантонисную оболочку по направлению к зародышу. Когда пинцет достигнет его, бранши размыкают, захватывают амниотическую оболочку вместе с ХАО и подтягивают к окну. Удерживая левой рукой пинцет с фиксированной в нем оболочкой амниона, вводят вирусодержащий материал (рис. 27). Далее все оболочки опускают, окно закрывают лейкопластырем и эмбрион инкубируют в вертикальном положении.

Заражение в тело зародыша. Для заражения используют эмбрионы 7—12-дневного возраста. Известно два варианта метода.

*Первый вариант.* Заражают так же, как в амнион закрытым способом, с той лишь разницей, что берут острую иглу и на овоскопе показателем попадания иглы в тело считают подчинение зародыша движениям иглы.

*Второй вариант.* Заражают так же, как в амнион открытым способом: через окно в скорлупе подтягивают пинцетом тело зародыша. Материал вводят в головной мозг или определенные участки тела. При таких методах заражения бывает значительный процент неспецифической гибели эмбрионов.

Заражение в кровеносные сосуды ХАО. При овоскопировании 11—13-дневных эмбрионов отмечают крупный кровеносный сосуд. По его ходу удаляют участок скорлупы, наносят 1—2 капли спирта, что делает на некоторое время подскорлупную оболочку прозрачной. Под контролем глаза на овоскопе иглу вводят в сосуд, что подтверждается его подвижностью при небольших боковых дви-

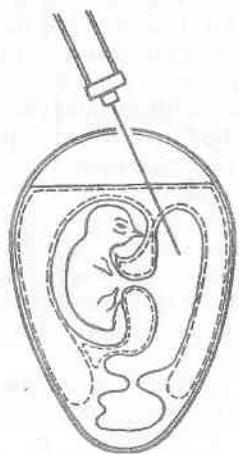


Рис. 26. Заражение куриного эмбриона в желточный мешок (по Николау и др.)

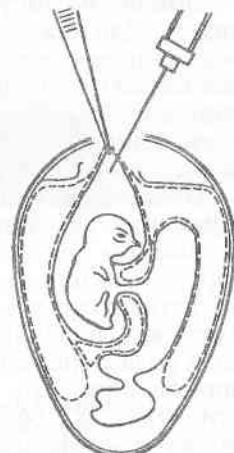


Рис. 27. Заражение куриного эмбриона в амнион открытым способом (по Николау и др.)

жениях иглы. Обнаженный участок подскорлупной оболочки закрывают кусочком лейкопластиря.

Можно материал в сосуды ввести и несколько отличающимся способом: срезают скорлупу над воздушной камерой, подскорлупную оболочку смачивают спиртом и в ставшие видными сосуды ХАО вводят материал. Отверстие закрывают кусочком стерильного лейкопластиря.

Описанные технические приемы экспериментального заражения куриных эмбрионов не единственные, а имеют различные варианты.

Перед дальнейшей инкубацией на скорлупе зараженных любым методом куриных эмбрионов простым (графитным) карандашом пишут, чем заражен эмбрион и когда, а если нужно, то и другие сведения. Зараженные куриные эмбрионы помещают в термостат для дальнейшей инкубации, в процессе которой происходят репродукция внесенных вирусов и их накопление в соответствующих структурах. Температура инкубации эмбрионов варьирует от 33 до 38 °С в зависимости от свойств вируса, которым проведено заражение.

За эмбрионами ведут постоянное наблюдение, просматривают на овоскопе, отбирая павшие.

Гибель эмбрионов в первые 24 ч после заражения чаще всего обусловлена размножением грибов, бактериальной микрофлоры, внесенных в эмбрион вместе с инокулятом, или травмированием при заражении. Эта гибель считается неспецифической. В более поздние сроки эмбрионы гибнут в результате, как правило, размножения в эмбрионах вируса. Обнаружив погибшие эмбрионы, их сразу же переносят в холодильник с температурой 4 °С. Такие условия, с одной стороны, способствуют сохранению активности накопившегося в эмбрионе вируса, с другой — уплотнению тканей и запустению сосудов, что значительно облегчает последующее вскрытие.

Эмбрионы инкубируют до момента максимального накопления вируса. Для каждого вируса и даже штамма этот срок является определенным и варьирует в пределах от 2 до 7—8 сут. Так, для вируса ньюкаслской болезни штамма Н он составляет 2—3 дня, для того же вируса штамма В<sub>1</sub> — 5 дней, для вируса инфекционного ларинготрахеита птиц — 5 дней и т. д. Затем все эмбрионы умерщвляют охлаждением при 4 °С в течение не менее 3—4 ч и вскрывают.

**Признаки размножения вируса в курином эмбрионе.** Показателем заражения эмбриона вирусом может служить его гибель в характерные для данного вируса сроки. Другой признак размножения вируса — патологоанатомические изменения, появляющиеся в различных структурах эмбриона. Так, ХАО может быть отечной, иметь кровоизлияния, узелки, или, как их называют, оспины. Такого рода поражения наблюдаются при заражении куриных эмбрионов вирусами оспы птиц, инфекционного ларинготрахеита птиц (рис. 28), болезни Ауески и некоторыми другими. При этом размер и морфология оспин заметно различаются при размноже-

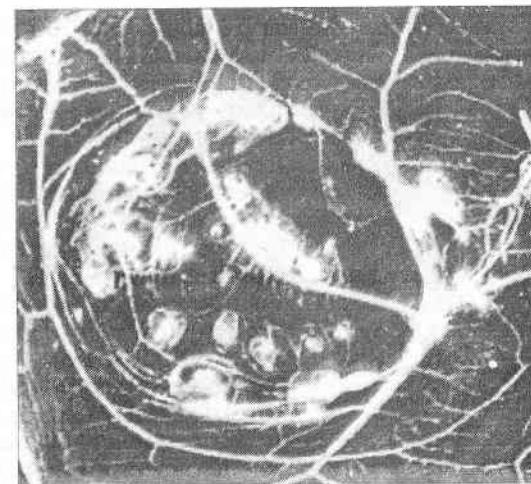


Рис. 28. Узелки на ХАО куриного эмбриона, зараженного вирусом инфекционного ларинготрахеита птиц

нии разных вирусов. Сам зародыш может отставать в росте и развитии от незараженных, т. е. проявлять феномен карликовости. Тело его может быть в разной степени обезвожено или мумифицировано, шея характерно перекручена. Названные признаки характерны для инфекционного бронхита кур (рис. 29). Кожа

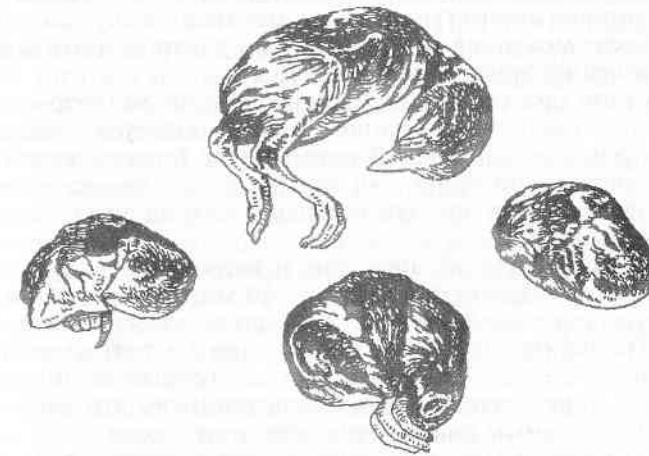


Рис. 29. Инфекционный бронхит птиц. Карликовость и мумификация куриных эмбрионов. Посередине вверху незараженный эмбрион того же возраста (по Майру и др.)

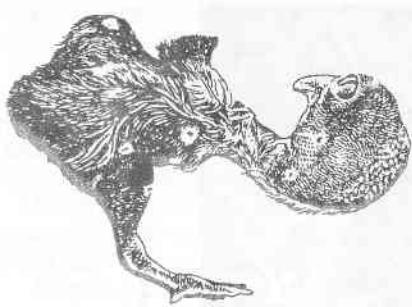


Рис. 30. Генерализованная оспа на теле куриного эмбриона, зараженного вирусом осповакцины (по Майру и др.)

изменений. Обнаружить такой вирус можно лишь в том случае, если он обладает способностью агглютинировать эритроциты, т. е. с помощью реакции гемагглютинации (РГА). Явление гемагглютинации представляет собой соединение эритроцитов в хлопья при добавлении к ним суспензии гемагглютинирующего вируса. Гемагглютинирующими свойствами обладают те вирусы, вирионы которых имеют на поверхности рецепторы, способные взаимодействовать с рецепторами оболочек эритроцитов. Такие вирионы адсорбируются на поверхности эритроцитов. Адсорбция одного вириона одновременно на двух эритроцитах ведет к тому, что последние оказываются соединенными между собой, а адсорбировавшийся вирион играет роль мостика между ними. Образованием таких мостиков между многими эритроцитами объясняется склеивание эритроцитов в хлопья.

Образование хлопьев, видимых невооруженным глазом, можно наблюдать при смешивании капли суспензии вируса с каплей отмытых эритроцитов на плоской поверхности (стекла, керамики и др.). При смешивании суспензии эритроцитов и вируса в пробирке хлопья эритроцитов оседают ровным слоем на дно в форме так называемого зонтика.

РГА используют для обнаружения и титрования вирусов. Хлопья эритроцитов появляются через 5–10 мин после смешивания капли вируссодержащей жидкости и капли взвеси эритроцитов (рис. 31). Положительная гемагглютинация не только указывает на присутствие вируса, но и выявляет его гемагглютинирующую активность с определенным видом эритроцитов, что может служить вспомогательным диагностическим признаком.

Нередко при вскрытии эмбриона не удается обнаружить ни одного признака размножения вируса, хотя он и находится в исследуемом материале. Такой пассаж, как уже говорилось, называется «слепым».

зародыша может быть гипермирована, с кровоизлияниями (рис. 30). Внутренние органы также могут иметь признаки размножения вируса. Например, набухшая желто-зеленого или темно-зеленого цвета печень куриного эмбриона — признак размножения в нем вируса гепатита утят.

Встречаются вирусы (например, штамм В<sub>1</sub> вируса ньюкаслской болезни), которые, размножаясь в куриных эмбрионах, не вызывают ни их гибели, ни патологоанатомических

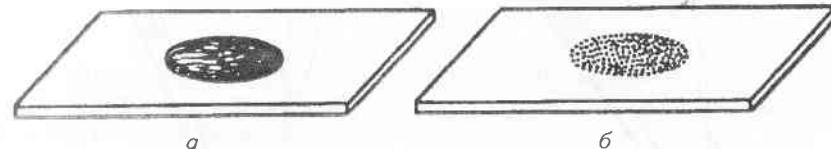


Рис. 31. Капельная реакция гемагглютинации:  
а — гомогенная взвесь эритроцитов сразу после смешивания их с вируссодержащей жидкостью; б — хлопья агглютинированных эритроцитов в той же смеси через 10 мин

**Вскрытие куриного эмбриона и получение вируссодержащего материала.** Вскрывают куриные эмбрионы с целью обнаружения признаков размножения в них вирусов и получения вируссодержащего материала. Последнее требует соблюдения правил асептики при вскрытии.

В зависимости от того, каким вирусом был заражен эмбрион (а значит, в какой структуре он накопился соответственно тропизму), вируссодержащим материалом могут служить ХАО, ткани зародыша, желточный мешок (его стенки), а также аллантоисная и амниотическая жидкости. В последнем случае выделение вируса наиболее удобно, так как экстрафетальные (аллантоисная, амниотическая) жидкости представляют, по существу, готовую суспензию вируса.

Перед вскрытием скорлупу эмбриона обрабатывают йодированным спиртом (иногда еще фламбируют). Вскрытие производят в боксе, пользуясь стерильными инструментами и посудой. Скорлупу срезают над той воздушной камерой (естественной или искусственной), через которую заражали. При этом яйцо держат под некоторым углом, чтобы скорлупа не упала внутрь. Ножницы не должны касаться и повреждать лежащую под воздушной камерой оболочку, для этого срез должен проходить несколько выше границы воздушной камеры.

Обнажившуюся ХАО осматривают, приподнимая ее пинцетом с целью установления в ней патологоанатомических изменений. Часть ХАО, на которую был нанесен вируссодержащий материал, имеет обычно наиболее выраженные изменения. Для более тщательного осмотра ее и взятия этой части приподнимают пинцетом ХАО в этом месте и срезают ножницами возможно большее. Для осмотра и взятия всей ХАО удаляют зародыш, желточный мешок и белок, а хорионаллантоисную оболочку отслаивают от внутренней поверхности скорлупы, извлекают и переносят в стерильную чашку Петри с физраствором. Оболочку отполаскивают, а затем двумя пинцетами расправляют так, чтобы она лежала в один слой и могла быть осмотрена по всей поверхности. Для того чтобы патологоанатомические изменения оболочки были видны более отчетливо, под чашку Петри подкладывают лист черной бумаги.

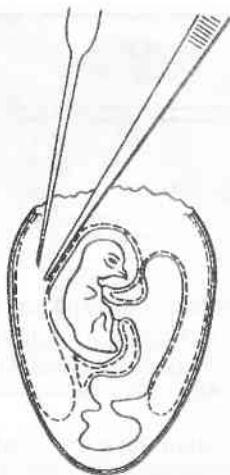


Рис. 32. Отсасывание аллантоисной жидкости (по Николау и др.)

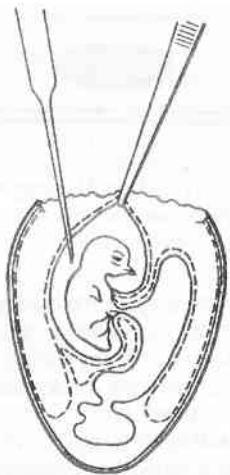


Рис. 33. Отсасывание амниотической жидкости (по Николау и др.)

Аллантоисную жидкость в количестве до 10 мл отсасывают пипеткой, которой прокалывают подскорлупную оболочку и ХАО над телом зародыша (рис. 32). Такое направление пипетки предотвращает случайный разрыв стенки желточного мешка и смешивание его содержимого с набираемой аллантоисной жидкостью.

Амниотической жидкости удается отсосать до 1 мл. Для этого после удаления аллантоисной жидкости пипетку вводят в амнион между головой и телом зародыша под его шеей (рис. 33).

Для получения стенки желточного мешка как вируссодержащего материала желток извлекают на чашку Петри, стенку его разрезают ножницами и отполаскивают от содержимого в физиологическом растворе. Тело зародыша извлекают, удерживая его за шею (рис. 34).

При вскрытии куриных эмбрионов ставят бактериологический контроль вируссодержащего материала посевом на МПБ, МПА, МППБ и среду Сабуро. Вируссодержащий материал хранят при минус 25 °С и ниже.

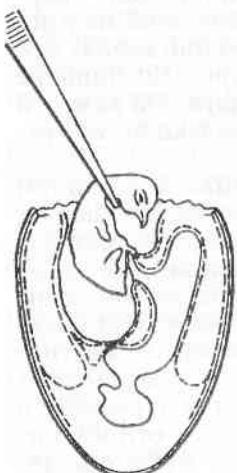


Рис. 34. Извлечение тела зародыша (по Николау и др.)

## Задания

- Подготовить куриные эмбрионы к заражению.
- Заразить куриные эмбрионы вирусами ньюкаслской болезни и оспы голубей (кур).
- Вскрыть зараженные куриные эмбрионы, получить ХАО и аллантоисную жидкость.
- Поставить капельную РГА с аллантоисной жидкостью.
- Сосчитать и зарисовать осины на ХАО.

**Материальное обеспечение:** куриные эмбрионы 9- и 11-дневные; вирус ньюкаслской болезни, штамм В<sub>1</sub>; вирус оспы голубей, штамм Нью-Джерси; овоскопы; кюветы эмалированные размером 24x36 см с марлевыми салфетками; штативы для пробирок; штативы для фиксации эмбрионов; горелки спиртовые или газовые; груши резиновые; тампоны ватные на палочках; спирт йодированный; кусочки ваты в бумажных упаковках стерилизованные (ватики); пробирки под резиновыми пробками; чашки Петри; пипетки на 2–5 мл; стерилизаторы со стерильными инструментами (шприцы на 1 мл, пинцеты анатомические, прорубники, иглы инъекционные, ножницы глазные); физиологический раствор; дезинфицирующий раствор; 5%-ная взвесь эритроцитов кур; стекло или белая керамическая плитка для капельной гемагглютинации; марлевые маски; карандаши по стеклу; парафиновые палочки; карандаши графитные; листы (10x10 см) черной бумаги; медицинский лейкопластирь; плакаты со схемой куриного эмбриона и методов его заражения.

## Примерный план занятий (4 ч)

### Первое занятие.

- Контрольные вопросы.
- Объяснение преподавателя.
- Демонстрация: а) организации рабочего места; б) овоскопирования и дезинфекции куриных эмбрионов; в) технических приемов заражения куриных эмбрионов всеми способами; г) на вскрытом эмбрионе — его строения.
- Самостоятельная работа студентов: а) овоскопирование трех куриных эмбрионов; б) дезинфекция этих же куриных эмбрионов; в) подготовка рабочих мест и спецодежды к заражению эмбрионов; г) тренировка в заражении всеми методами на одном курином эмбрионе; д) заражение 9-дневного куриного эмбриона вирусом ньюкаслской болезни (штамм В<sub>1</sub>, или Н) в аллантоисную полость, подписывание его; е) заражение 11-дневного куриного эмбриона вирусом оспы голубей (кур) на ХАО через искусственную воздушную камеру, подписывание его; ж) укладка зараженных куриных эмбрионов и их размещение в термостате для инкубирования.
- Подведение итогов занятия.
- Задание к следующему занятию.

### Второе занятие (через 5–7 дней).

- Контрольные вопросы.
- Объяснение преподавателя.

3. Демонстрация: а) на овоскопе мертвого куриного эмбриона; б) организации рабочего места для вскрытия эмбриона; в) приемов вскрытия зараженных куринных эмбрионов и получения от них вирусодержащего материала; г) признаков размножения вирусов в куриных эмбрионах: патологоанатомических изменений, капельной РГА; д) способов обезвреживания использованных в работе с вирусом керамических пластинок, утилизации вскрытых эмбрионов и подготовки инструментов к стерилизации кипячением; е) этикетирования полученного вирусодержащего материала.

4. Самостоятельная работа студентов: а) подготовка рабочих мест и спецодежды к вскрытию куринных эмбрионов, зараженных на предыдущем занятии; б) вскрытие куринных эмбрионов, зараженных вирусом ньюкаслской болезни, отсасывание аллантоисной и амниотической жидкостей, постановка капельной РГА; в) вскрытие куринных эмбрионов, зараженных вирусом оспы, извлечение ХАО, подсчет и зарисовка оспин; г) подготовка к обеззараживанию инструментов, эмбрионов, посуды.

5. Подведение итогов занятия.

6. Задание к следующему занятию.

#### Контрольные вопросы

1. Для чего используют куриные эмбрионы в вирусологии?
2. Каково строение развивающегося куриного эмбриона?
3. Какие методы можно использовать для заражения куриных эмбрионов вирусами?
4. Что вы знаете о методах индикации вирусов в куриных эмбрионах?
5. Какие способы получения вирусодержащего материала от куриных эмбрионов вы знаете?
6. Каковы гемагглютинирующие свойства вирусов и их использование? Каков механизм гемагглютинации?

**Методические указания.** По теме целесообразно провести два занятия с интервалом в несколько дней, с тем чтобы студенты могли вскрыть зараженные ими эмбрионы.

Рекомендуется использовать для заражения вирус ньюкаслской болезни, штамм  $B_1$ , который в максимальных титрах накапливается к 5-му дню инкубации, не вызывая гибели эмбриона. Получаемая от него в качестве вирусодержащего материала аллантоисная жидкость может быть отсосана в количестве до 10 мл. Она прозрачная, чуть желтоватая. Содержащийся в ней вирус в капельной РГА образует крупные хлопья эритроцитов. Вирус является вакциным и может быть приобретен в птицеводческих хозяйствах. Его пассируют на куриных эмбрионах; на занятиях используют в разведениях  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ , т. е. в дозе около  $10^5$ – $10^6$  ЭИД<sub>50</sub>.

Для отработки метода заражения на ХАО удобно использовать вирус оспы голубей, штамм Нью-Джерси, размножение которого

в эмбрионе не вызывает его гибели, но приводит к образованию на ХАО белых, довольно крупных (2–3 мм в диаметре) оспин. Демонстративные результаты от заражения эмбрионов вирусом в разведении  $10^{-2}$ , т. е. в дозе около  $10^4$  ООЕ, когда имеется возможность наблюдать отдельные оспины, их размер, морфологию. Рекомендуемый оспенный вирус также вакцинный и широко используется для специфической профилактики оспы кур.

Овоскопы для занятий можно изготовить из посыльочных ящиков, смонтировав в них патрон электрической лампы и задвинув в специально изготовленные пазы фанерную крышку. В крышке делают овальное отверстие, несколько меньше размеров яйца. Такие овоскопы могут быть заменены осветителями для микроскопов. Овоскопирование удобно проводить в затемненной комнате, которой пользуются для работы с люминесцентным микроскопом, или в учебной комнате при закрытых на некоторое время шторах.

Рабочее место студента организуют следующим образом. Перед каждым студентом ставят эмалированную кювету, дно которой застлано марлевой 3–4-слойной салфеткой, смоченной дезинфицирующим раствором. В кювете располагают ближе к себе штатив для эмбрионов, а сразу за ним горелку. Справа держат баночку с йодированным спиртом, в которую ставят стерильизованные инструменты. Перед использованием извлеченные из баночки инструменты обжигают пламенем, а после использования вновь помещают в баночку. Студенты работают в марлевых масках, которые после каждой группы стирают и стерилизуют.

Для пробивания в скорлупе отверстий могут быть изготовлены пробойники, лучше стержни диаметром 0,4–0,5 см и длиной 9–10 см из нержавеющей стали. Если их нет, скорлупу можно пробивать инъекционной иглой № 18–20, вколотой в резиновую пробку. После каждого раза использования такие иглы опускают в баночку со спиртом. Можно рекомендовать для пробивания отверстий в скорлупе и раздвинутые бранши остроконечных глазных ножниц.

Парафин для закрывания отверстий в скорлупе удобно использовать в форме парафиновых палочек. Их можно изготовить следующим образом: парафин растапливают в какой-либо емкости, разливают в пробирки примерно по 10 мл. Установив пробирки в вертикальном положении, дают возможность парафина полностью застыть. Затем пробирки до верхнего края на несколько секунд погружают в горячую воду и быстро вытряхивают на бумагу парафиновую палочку. Такие палочки могут служить для закрывания отверстий в скорлупе довольно долго. В момент пользования палочкой, пронесенной над пламенем, прикасаются к отверстию в скорлупе. На яйце остается небольшая, моментально застывающая капля парафина.

## КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

**Культура клеток.** Культура клеток — это клетки многоклеточного организма, живущие и размножающиеся в искусственных условиях вне организма (*in vitro*).

Методика культивирования клеток особенно успешно стала развиваться после 40-х годов XX столетия. Этому способствовали следующие обстоятельства: открытие антибиотиков, предотвращающих бактериальное заражение культур клеток, открытие Хуангом (1943) и Эндерсоном (1949) способности вирусов вызывать специфическую деструкцию клеток (цитопатический эффект) — удобный метод индикации вирусов в культурах клеток, и, наконец, Дульбекко и Фогт (1952) предложили методику трипсинизации тканей и получения однослойных культур клеток.

В вирусологической практике применяют следующие культуры клеток.

Первично-трипсиированные культуры клеток — клетки, полученные непосредственно из органов или тканей организма, растущие *in vitro* в один слой. Культуру клеток можно получить практически из любого органа или ткани человека или животного (взрослого или эмбриона). Однако лучше это удается сделать из эмбриональных органов, так как клетки эмбрионов обладают более высокой потенцией роста. Чаще всего для этих целей используют почки, легкие, кожу, тимус, testikuлы эмбрионов или молодых животных.

Для получения первичных клеток от здорового животного не позднее 2—3 ч после убоя берут соответствующие органы или ткани, измельчают их на кусочки (1—4 мм) и обрабатывают ферментами: трипсином, панкреатином, коллагеназой и другими (чаще трипсином). Ферменты разрушают межклеточные вещества, полученные при этом отдельные клетки сuspendируют в питательной среде и культивируют на внутренней поверхности пробирок или матрасов в терmostате при 37 °C.

Клетки прикрепляются к стеклу и начинают делиться. В развитии культур клеток различают несколько фаз: адаптации, логарифмического роста, стационарную и старения (гибель клеток). Размножаясь, клетки размещаются на поверхности стекла и при полном покрытии его в один слой контактируют друг с другом и прекращают делиться (контактная ингибиция). На стекле формируется слой толщиной в одну клетку (поэтому эти культуры клеток называют однослойными или монослоинными) (рис. 35—37).

Обычно монослой формируется через 3—5 дней. Скорость его формирования зависит от вида ткани, возраста животного, каче-

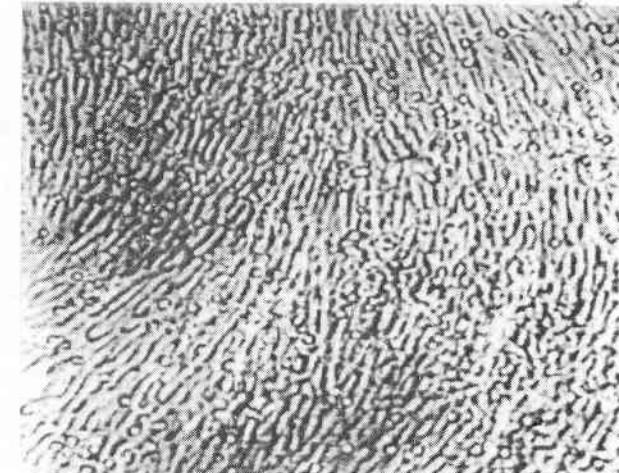


Рис. 35. Первичная культура клеток легких эмбриона овцы

ства питательной среды, посевной концентрации клеток и других факторов.

Питательную среду меняют по мере загрязнения ее продуктами жизнедеятельности клеток. Монослой сохраняет жизнеспособность в течение 7—21 дня (в зависимости от вида клеток и состава питательной среды).

Интенсивность размножения клеток и состояние монослоя

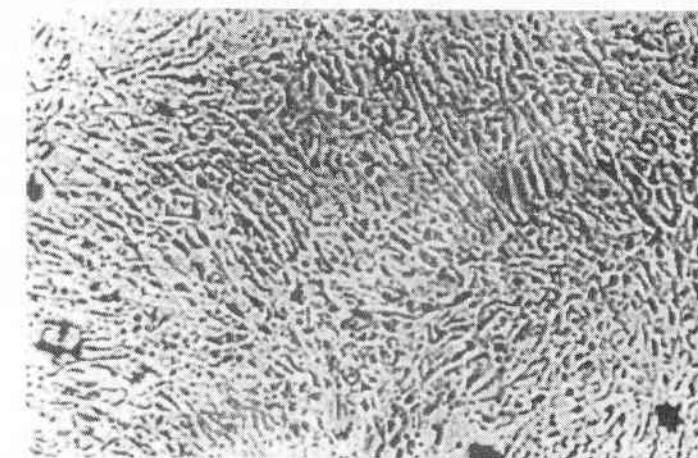


Рис. 36. Первичная культура клеток testikuлов бычка

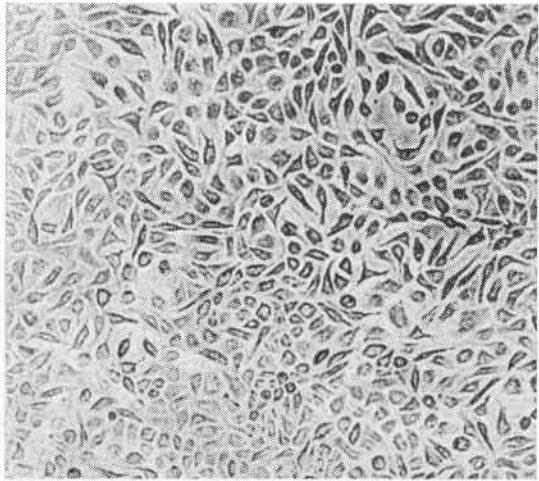


Рис. 37. Культура клеток почки обезьяны. 3-й день роста

контролируют визуально под малым увеличением микроскопа (объектив  $\times 10$ ). Лучше для этой цели использовать инвертированный микроскоп.

Для культивирования вирусов используют молодые культуры клеток (как только сформировался монослой).

**Субкультуры.** В вирусологической практике часто используют субкультуры, которые получают из первичных клеток, выращенных в матрасах, путем снятия их со стекла раствором версена или трипсина, ресуспензирования в новой питательной среде и пересева на новые матрасы или пробирки. Через 2–3 сут формируется монослой.

Практически субкультуру можно получить из всех первичных культур клеток. (Хуже субкультивируются куриные фибробlastы.) Субкультуры по чувствительности к вирусам не уступают первичным культурам клеток, кроме того, они более экономичны, и есть возможность выявления контаминации клеток вирусами. Субкультуры получают от 2–5 пассажей (перевивок) и очень редко до 8–10. Последующие пассажи приводят к изменению морфологии клеток и их гибели. Если клеточные культуры прошли более 10 пассажей, они уже на стадии перехода к перевиваемым культурам клеток.

Перевиваемые культуры клеток — это клетки, способные к размножению вне организма неопределенно длительное время. В лабораториях их поддерживают путем пересевов из одного сосуда в другой (при условии замены питательной среды).

Получают перевиваемые клетки из первичных культур клеток с повышенной активностью роста путем длительных пересевов в определенном режиме культивирования. Обычно работа по получению новых клеточных линий продолжается несколько месяцев. Полагают, что механизм происхождения перевиваемых культур клеток — результат генетической изменчивости клеток или селекции единичных клеток, присутствующих в первичной исходной культуре.

Клетки перевиваемых культур имеют одинаковую форму, гетеропloidный набор хромосом (у первичных клеток он диплоидный), стабильны в условиях роста *in vitro*, некоторые из них обладают онкогенной активностью. Последнее свойство ограничивает использование перевиваемых культур клеток для культивирования вирусов при производстве вакцин.

Перевиваемые культуры клеток можно получать как из здоровых тканей животных, так и из опухолевых. Среди них наиболее широко используют следующие линии клеток: HeLa (из раковой опухоли шейки матки женщины); Нер-2 (из карциномы гортани человека); KB (из раковой опухоли полости рта); ВНК-21 (почка новорожденного хомячка); ППЭС (перевиваемая почка эмбриона свиньи); ППТ (перевиваемая почка теленка); ППО (перевиваемая почка овцы); TR (из слизистой трахеи коровы); L (мышиные фибробласты); СОЦ (из сердца обезьяны циномольгус) и др. Характеристика основных клеточных линий, рекомендуемых для использования в ветеринарных лабораториях, представлена в таблице 4.

Перевиваемые клетки имеют преимущества перед первичными: их приготовление значительно проще, экономится труд и материальные средства; эти культуры заранее можно проверить на наличие латентных вирусов и микрофлоры; клональные линии обеспечивают более стандартные условия для размножения вирусов, чем первичные, представляющие смешанную популяцию клеток. Большинство перевиваемых клеток обладает более широким спектром чувствительности к вирусам, чем соответствующие первичные культуры.

Однако перевиваемые клетки имеют и недостатки: они склонны к малигнизации, т. е. злокачественное перерождение независимо от происхождения и снижения чувствительности к вирусам у них происходит быстрее, чем у первичных, поэтому необходимо применять клональные линии перевиваемых клеток.

Поддерживают перевиваемые клетки путем периодических пересевов. Чаще используют бесцентрифужный метод. Для очередного пересева отбирают 2–3-дневную культуру с хорошим монослоем, сливают питательную среду, а клеточный монослой покрывают подогретым до 35–37 °C 0,02%-ным раствором версена или смесью версена с 0,25%-ным раствором трипсина (9 : 1). [Диспергирующее действие версена объясняется связыванием им двухвалентных катионов ( $Mg^{++}$ ,  $Ca^{++}$ ), которые способствуют при-

#### 4. Характеристика основных свойств перевиваемых линий клеток

| Культура   | Среда выращивания                                 | Посевная доза (кл/мл)  | Формирова-<br>ние монолитов<br>(дни) | Коэффициент<br>пересева | Пассажей<br>в пасаж | Чувствительность к вирусам  |
|--|---|------------------------|--------------------------------------|-------------------------|---------------------|---|
| СПЭВ — почка 199 + 10 % сыво-<br>ротки КРС                                   | 199 + 10 % сыво-<br>ротки КРС                     | (1 - 2)10 <sup>5</sup> | 3-4                                  | 1 : 4 — 1 : 6           | 2                   | Ячуша, гастроэнтерита свиней,<br>ротавируса свиней, болезни Аусс-<br>ки, болезни Тешена               |
| ППЭС — пере- 60 % ГЛА + 30 %<br>виваемая почка 199 + 10 % сыво-<br>ротки КРС | 199 + 10 % сыво-<br>ротки КРС                     | (1 - 2)10 <sup>5</sup> | 3-4                                  | 1 : 2 — 1 : 3           | 2                   | Болезни Ауссии, ящура, ротови-<br>руса свиней, коронавирусу сви-<br>ней, парвовирусу свиней           |
| Пг-80 — почка<br>теленка   | 50 % ГЛА + 40 %<br>Игла + 10 % сыво-<br>ротки КРС | (1 - 2)10 <sup>5</sup> | 3-4                                  | 1 : 2 — 1 : 3           | 2                   | ИРТ, ПГ-3, рота- и парвовирусам<br>КРС, диареи КРС, болезни Ауссии,<br>ячура, везикулярного стоматита |
| ПГ — почка те- 90 % Игла + 10 %<br>ленька                                    | 199 + 10 % сыво-<br>ротки КРС                     | (1 - 2)10 <sup>5</sup> | 4-5                                  | 1 : 2 — 1 : 3           | 2                   | Ячуша, ИРТ, ПГ-3, диареи КРС,<br>болезни Ауссии, везикулярного сто-<br>матита, ринопневмонии лошадей  |
| МДБК — почка 40 % Игла + 50 %<br>199 + 10 % сыво-<br>ротки КРС               | 199 + 10 % сыво-<br>ротки КРС                     | 1 · 10 <sup>5</sup>    | 2-3                                  | 1 : 3 — 1 : 4           | 2                   | ИРТ, ПГ-3, Адено-1 п/г, ротови-<br>русы животных, везикулярного<br>стоматита                          |
| ТР — трахея те- 90 % Игла + 10 %<br>ленька                                   | 199 + 10 % сыво-<br>ротки КРС                     | (1 - 2)10 <sup>5</sup> | 3-4                                  | 1 : 2 — 1 : 3           | 2                   | ИРТ, ПГ-3, диареи КРС   |
| ЛЭК — легкое 0,3 % ФГМ —<br>эмбриона коро- Игла + 10 % сыво-<br>ротки КРС    | 199 + 10 % сыво-<br>ротки КРС                     | (1 - 2)10 <sup>5</sup> | 3-4                                  | 1 : 4                   | 2                   | ИРТ, ПГ-3, ротавирусам КРС,<br>ринопневмонии лошадей  |
| ЩЖС — щито- 90 % 199 + 10 %<br>видная железа сыворотки КРС                   | 199 + 10 % сыво-<br>ротки КРС                     | (1 - 2)10 <sup>5</sup> | 3-4                                  | 1 : 3                   | 2                   | Энтеро-, парво-, ротавирусам<br>свиней, ТГС, ринопневмонии ло-<br>шадей                               |
| КСТ — эндоте- 90 % 199 + 10 %<br>лий коронарных сыворотки КРС                | 199 + 10 % сыво-<br>ротки КРС                     | (1 - 2)10 <sup>5</sup> | 3-4                                  | 1 : 4 — 1 : 6           | 2                   | ИРТ, ПГ-3, диареи КРС   |
| Т-1 — почка те- 50 % Игла + 40 %<br>ленька                                   | 199 + 10 % сыво-<br>ротки КРС                     | (1 - 3)10 <sup>5</sup> | 3-4                                  | 1 : 2 — 1 : 3           | 1                   | Аденовирусам 1 и 2 п/г, респира-<br>торно-синцитиальному, ИРТ,<br>ПГ-3                                |

креплению клеток к стеклу и обеспечивают целостность клеточной культуры.] Под действием версена клетки округляются, отделяются от стекла. Через 10—15 мин после округления клеток версены сливают, оставляя небольшое количество его (в 1-литровом матрасе — 5—10 мл, в 0,1-литровом — 2—3 мл), и выдерживают еще 5—10 мин, периодически омывая клетки версеном, затем добавляют небольшое количество питательной среды. После встраивания подсчитывают клетки в камере Горяева, исходную клеточную взвесь разводят ростовой питательной средой до необходимой концентрации (100—200 тыс. в 1 мл) и разливают при помешивании в пробирки или матрасы, закрывают резиновыми пробками и культивируют в термостате при 37 °C в течение 3—4 дней до образования сплошного монослоя. Обычно клетки в камере Горяева не подсчитывают, а пересевают с коэффициентом от 1 : 2 до 1 : 6 в зависимости от вида клеток. Состав питательной среды также зависит от вида клеток, но чаще при культивировании перевиваемых клеток используют среды Игла, 199 или смеси этих сред с гидролизатом лактальбумина.

Важно отметить, что при поддержании перевиваемых клеток путем их систематического пересева в лаборатории оставляют не менее одного матраса без пересева на случай непригодности последнего пассажа.

**Диплоидные культуры клеток.** Международный комитет по клеточным культурам дал следующее определение диплоидным клеткам: это морфологически однородная популяция клеток, стабилизированная в процессе культивирования *in vitro*, имеющая ограниченный срок жизни, характеризующаяся тремя фазами роста, сохраняющая в процессе пассирования кариотип, свойственный исходной ткани, свободная от контаминаций и не обладающая туморогенной активностью при трансплантации хомячкам.

Диплоидные культуры клеток, так же как и перевиваемые, получают из первичных культур клеток. Кариотип клеток очень лабилен и при обычных методах культивирования клеток он изменяется в первые дни. Поэтому потребовались специальные методы обработки ткани, высокого качества питательные среды, фергальная сыворотка для длительного поддерживания клеток *in vitro* в диплоидном состоянии. Эту задачу впервые успешно решили американские ученые Хейфлик и Мурхед (1961).

Диплоидные клетки получены из различных тканей эмбриона человека (легкие, почки, кожно-мышечная ткань, сердце и др.) и животных (почка эмбриона крупного рогатого скота, свиней, ВНК-21 — почка хомяка и др.).

Диплоидные клетки в отличие от перевиваемых имеют ограниченные возможности пассирования. Максимальное число пассажей 50±10, затем количество делящихся клеток резко уменьшается и они гибнут. Однако диплоидные клетки могут быть использованы в течение длительного времени, так как при каждом пассаже

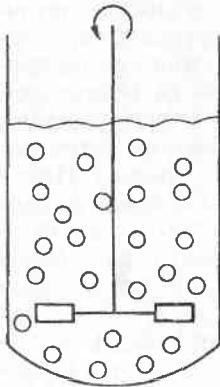


Рис. 38. Культивирование клеток на микроносителях

pH, скорость перемешивания), а также адаптированы многие линии перевиваемых клеток к размножению в этих условиях (ВНК-21, Нер-2, МДВК и др.). Выращивание вирусов в супензионных культурах клеток открывает большие возможности в промышленном производстве вакцин и диагностикумов. Однако только перевиваемые клетки хорошо культивируются в супензии.

Новый подход к культивированию клеток в супензии — применение микроносителей (сифадекс, силикагель, цитолар и др.). На микроносителях культивируемые клетки формируют монослои. Таким образом, этот способ позволяет методами супензионного культивирования выращивать зависимые от прикрепления к твердому субстрату клетки: первичные, субкультуры, диплоидные. Эти клетки принято называть поверхностно зависимыми (рис. 38).

Способ культивирования на микроносителях в настоящее время чрезвычайно популярен, так как он открывает большие перспективы в клеточной биотехнологии, в получении вакцин и других биологически активных веществ (интерферон, гормоны и т. д.).

**Хранение культур клеток.** Каждый из трех основных типов клеточных культур — первичных культур, диплоидных штаммов и перевиваемых линий клеток, используемых в вирусологических исследованиях, часто приходится консервировать, так как при продолжительном пассировании клеток *in vitro* есть опасность бактериального загрязнения и неконтролируемых (генетических) изменений самих клеток.

Наиболее простой метод консервирования культур клеток — хранение их при 4 °C до 1–6 нед. Успешно применяют хранение клеточных штаммов в условиях сухого льда (минус 78 °C) и жидкого азота (минус 196 °C). Для этого клетки снимают с матрасов, сущен-

тируют в концентрации 10<sup>6</sup> в 1 мл питательной среды, содержащей в качестве защитных веществ 10—40 % сыворотки и 10 % очищенного стерильного глицерина (вместо глицерина успешно применяют ДМСО — диметилсульфоксид). Затем клеточную суспензию разливают в ампулы, запаивают и выдерживают 1—3 ч при 4 °C, после чего замораживают клетки в смеси этилового спирта с сухим льдом. Скорость охлаждения не должна превышать 1 °C в 1 мин. При снижении температуры до минус 25 °C ампулы помещают для хранения в сухой лед. Если для хранения используют жидкий азот, то ампулы с клетками охлаждают до минус 70 °C и кладут в жидкий азот. Хранение клеток в жидким азоте в течение ряда лет не изменяет их пролиферативную активность и чувствительность к вирусам.

Восстанавливают замороженные клетки следующим образом: ампулу с замороженными клетками быстро погружают в водяную баню на 1—2 мин при легком встряхивании, затем клетки выливают в матрас, добавляют соответствующее количество ростовой среды и культивируют в термостате при 37 °C. Для удаления глицерина или ДМСО питательную среду заменяют на следующий день после посева.

При транспортировке клеток матрасы с выросшим монослоем заливают средой доверху и закрывают резиновой пробкой. В лаборатории питательную среду сливают и используют при культивировании этих клеток в виде добавок к питательной среде, применяемой в данной лаборатории.

Можно транспортировать и клеточную суспензию при 4 °C. При благоприятных условиях транспортировки, исключающих перегревание и замораживание клеток, 80—90 % из них сохраняют жизнеспособность до 7—8 дней.

Работа с культурой клеток требует абсолютной стерильности, питательной подготовки посуды, соответствующих растворов, питательных сред и высокого качества воды.

**Контаминация культур клеток.** Работа с культурами клеток, их использование в вирусологических и других исследованиях, в биотехнологии требуют постоянного контроля на отсутствие постоянных агентов (контаминаций). Контамиантами могут быть вирусы, бактерии, грибы, микоплазмы и клетки других клеточных культур. Микоплазмы — одни из наиболее частых контаминаций, особенно в перевиваемых линиях клеток. Своевременное выявление их, других микроорганизмов или вирусов в культуре клеток — важное условие поддержания высокого качества последней. Паспортизация стабильных клеточных линий предусматривает в качестве необходимого теста контроль на отсутствие микоплазмоконтаминации, что должно стать обязательным для всех лабораторий, где работают с культурами клеток.

Резкое закисление питательной среды в культуральных флаconах и опалесценция ее могут быть следствием контаминации культур клеток микоплазмами. Для выявления последних исполь-

зуют следующие методы: посев на питательные среды, тест-культуры, цитологические, радиоавтографические и электронно-микроскопические.

В случае контаминации клеточные культуры уничтожают, а культивирование возобновляют из резервных расплодок, хранящихся в жидком азоте. Только редкие и уникальные культуры подлежат деконтаминации.

Предупредить размножение и подавить случайно попавшие в клеточную культуру бактерии удается с помощью противомикробных препаратов (антибиотиков и др.), добавляемых в ростовые среды непосредственно перед их использованием. Эти препараты следует строго дозировать и применять дифференцирование. Их использование — необходимое условие при возрастании риска контаминации в процессе получения первичных культур клеток при крупномасштабном супензионном выращивании клеток, массовом производственном культивировании перевиваемых клеток, а также во всех случаях объединения клеточного материала.

При работе с культурами клеток используют многие антимикробные (нетоксичные) препараты в оптимальных дозах, характер действия которых приведен в таблице 5. Выбор эффективного препарата или комплекса препаратов зависит от чувствительности к ним конкретных контаминаントов.

##### 5. Противомикробные препараты для культур клеток (Л. П. Дьяконов и др.)

| Препарат                    | Чувствительные микроорганизмы | Антимикробное действие | Оптимальные концентрации для культур клеток (ед./мл., мкг/мл.) |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------------|--|
| Пенициллин                  | Б +                           | Бактерицидное          | 100,0  |
| Стрептомицин                | Б ±                           | »                      | 100,0  |
| Мономицин                   | Б ±, М                        | »                      | 100,0  |
| Неомицин                    | Б ±, М                        | »                      | 50,0   |
| Канамицин                   | Б ±, М                        | »                      | 200,0  |
| Гентамицин                  | Б ±, М                        | »                      | 200,0  |
| Полимиксин                  | Б ±,                          | »                      | 50,0   |
| Фурагин                     | Б ±,                          | »                      | 8,0  |
| Тетрациклин                 | Б ±, М                        | Бактериостатическое    | 30,0   |
| Эритромицин                 | Б ±                           | То же                  | 50,0   |
| Линкомицин                  | Б ±, М                        | »                      | 100,0  |
| Левомицетин (хлорамфеникол) | Б ±, М                        | »                      | 30,0   |
| Тилозин                     | М                             | »                      | 10,0   |
| Олеандомицин                | М                             | »                      | 15,0   |
| Астазилид (преп. № 1)       | М                             | »                      | 10,0   |
| Астазиан (преп. № 2)        | М                             | »                      | 50,0   |
| Нистатин                    | МГ                            | Фунгистатическое       | 50,0   |
| Амфотерицин                 | МГ                            | »                      | 2,5  |

Обозначения: Б+ — грамположительные бактерии; Б— — грамотрицательные бактерии; М — микоплазмы; преп. № 1 — моноэфир сахарозы и жирных кислот; преп. № 2 — полисахарид; МГ — микроскопические грибы.

**Растворы.** Наиболее широко используют при работе с культурами клеток растворы Хенкса и Эрла, которые готовят на бидистиллированной воде с добавлением различных солей и глюкозы.

**Раствор Хенкса:** на 1 л бидистиллированной воды 8,0 г NaCl, 0,4 г KCl, 0,1 г MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0,14 г CaCl<sub>2</sub>, 0,06 г KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,06 г NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,0 г глюкозы, 0,02 г фенолрота, 0,07 г NaHCO<sub>3</sub>.

**Раствор Эрла:** на 1 л бидистиллированной воды 6,8 г NaCl, 0,4 г KCl, 0,1 г MgSO<sub>4</sub>, 0,2 г CaCl<sub>2</sub>, 0,125 г NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,2 г NaHCO<sub>3</sub>, 1,0 г глюкозы.

Эти сбалансированные солевые растворы используют для приготовления всех питательных сред, так как они обеспечивают сохранение pH, осмотическое давление в клетках и соответствующую концентрацию необходимых неорганических веществ. Кроме того, их применяют при различных манипуляциях с культурой клеток (отмывание от ростовых сред, разведение вируса и т. д.).

При культивировании клеток применяют диспергирующие растворы трипсина и версена. Раствор трипсина (0,25%-ный на фосфатном буфере) используют для разделения кусочков тканей на отдельные клетки и для снятия слоя клеток со стекла. Раствор версена — натриевую соль этилендиаминетрауксусной кислоты (0,02%-ный на растворе Хенкса) — используют для снятия клеток со стекла. Все растворы стерилизуют при соответствующих режимах.

**Питательные среды.** Различают естественные и искусственные (синтетические и полусинтетические) питательные среды.

Естественные среды состоят из смеси солевого раствора (Хенкса, Эрла), сыворотки крови (животных или человека), тканевого (эмбрионального) экстракта (эмбрионов кур, коров, человека), коровьей амниотической жидкости и т. д. Количество каждого компонента в разных примесях сред значительно варьирует. Используют эти среды редко.

В настоящее время применяют в основном искусственные питательные среды. К полусинтетическим питательным средам относят ферментативные гидролизаты различных белковых продуктов: гидролизат лактальбумина, мышечный ферментативный гидролизат, ферментативно-казеиновый дрожжевой гидролизат, гемогидролизат, аминопептид и др. Наиболее широко используют в вирусологической практике 5%-ный раствор гидролизата лактальбумина, 5%-ный и 2,5%-ный раствор гемогидролизата.

Из синтетических сред наиболее широкое применение нашли среда 199 и среда Игла. В состав среды 199 входит более 60 компонентов: 20 аминокислот, 17 витаминов, компоненты нукleinовых кислот, источники липидов, 8 минеральных солей и другие вещества. В состав среды Игла также входит не менее 60 компонентов, включающих аминокислоты, витамины, углеводы и т. д.

Во все питательные среды и некоторые солевые растворы добавляют индикатор феноловый красный (0,002 %) для определения концентрации водородных ионов (рН). В принятой концентрации он не оказывает токсического воздействия на клетки и вирусы. При снижении рН среда желтеет, что позволяет определять момент ее закисления продуктами метаболизма клеток до уровня, требующего замены среды на свежую; при сдвигах рН в щелочную сторону растворы принимают красно-малиновый цвет. При нейтральном значении рН (7,2–7,4) цвет среды оранжево-красный. Для регулирования рН солевых растворов и питательных сред используют 7,5%-ный раствор бикарбоната натрия ( $\text{NaHCO}_3$ ) и 3%-ный раствор уксусной кислоты ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ).

Для уничтожения микрофлоры перед использованием в среды добавляют антибиотики: пенициллин и стрептомицин по 100 ЕД/мл. Для подавления плесени используют натриевую соль нистатина по 100 мкг на 1 мл среды.

Все питательные среды принято делить на две группы:

ростовые, обеспечивающие жизнь и размножение клеток. Они содержат 2–10 % сыворотки крови, применяются в первые дни культивирования клеток;

поддерживающие, обеспечивающие жизнедеятельность клеток, но не размножение их. Они не содержат сыворотки крови, используются обычно после заражения культуры клеток вирусами.

Сыворотка крови крупного рогатого скота — обязательный компонент ростовых питательных сред. В ее состав входит ряд биологически активных веществ, необходимых для роста клеток *in vitro*. Содержащиеся в сыворотке активная фракция альбуминов и фетуин способствуют прикреплению клеток к поверхности стекла. В практической работе наибольшее применение нашли сыворотки как взрослого крупного рогатого скота, так и телят, получаемые на мясокомбинатах. Самая лучшая сыворотка для культуры клеток — сыворотка эмбрионов коров. При получении сыворотки следует соблюдать строгую стерильность. Каждая серия сыворотки проходит контроль на стерильность и токсические свойства по отношению к культурам клеток.

**Посуда.** Качество посуды имеет важное значение для успешного культивирования клеток вне организма. Посуда должна быть стерильной, обезжиренной, не обладать токсическим действием. Для культивирования клеток используют пробирки, матрасы на 50, 100, 250, 500, 1000 и 1500 мл, роллерные колбы на 500, 1000, 2000 мл, различные пипетки, флаконы для питательных сред и растворов, колбы различной вместимости, воронки и др.

Предложено много способов обработки посуды, и в каждой лаборатории применяют один из них, наиболее экономичный, удобный и дающий наилучшие результаты. При культивировании клеток особенно большие требования предъявляют к подготовке и стерилизации посуды, пробок и др. Во многих случаях

неправильная их мойка и стерилизация служат причиной неприкрепления клеток к стеклу или быстрой дегенерации клеточного монослоя.

При обработке посуды необходимо учитывать высокую чувствительность клеток к токсическому действию солей тяжелых металлов. Одним из обязательных условий успешной работы с клетками является высокое качество воды. Для ополаскивания посуды используют дистиллированную, а лучше бидистиллированную или деионизированную воду (электропроводность не должна превышать  $2-10^{-6}$  Ом/см, рН 6,2–6,8).

Обработка стеклянной посуды состоит из нескольких этапов:

- 1) инфицированную посуду погружают в 2–3%-ный раствор  $\text{NaOH}$  на 5–6 ч;
- 2) споласкивают в 3–4 сменах водопроводной воды;
- 3) замачивают (на ночь) в 0,3–0,5%-ном растворе порошка «Лотос», «Лоск» или мыла Б;
- 4) тщательно моют с помощью ёрша в теплом растворе порошка «Лотос» или «Лоск»;
- 5) споласкивают в нескольких сменах (8–10 раз) водопроводной воды;
- 6) споласкивают в дистиллированной воде, содержащей 0,5 %  $\text{HCl}$ ;
- 7) споласкивают 4–5 раз водопроводной водой и в трех сменах дистиллированной воды;
- 8) сушат в сушильном шкафу;
- 9) монтируют и стерилизуют в сушильном шкафу ( $180^\circ\text{C}$ , 3–4 ч), кроме резиновых пробок, или автоклавируют (при 200 кПа 1,5–2 ч).

Всю новую посуду моют теплой водой с мылом, споласкивают водой и погружают на 3 ч в хромник (100 г двухромовокислого калия на 1 л концентрированной серной кислоты), затем в течение 9 ч промывают в проточной воде и нескольких сменах дистиллированной воды, сушат, монтируют и стерилизуют. Старую, бывшую в употреблении посуду обрабатывают хромником лишь периодически и не более чем в течение 1 ч.

Новые резиновые пробки кипятят 1 ч в 5%-ном растворе двууглекислой соды, затем промывают несколько раз горячей водопроводной водой и кипятят каждый раз по 1 ч в шести сменах дистиллированной воды. Пробки, бывшие в употреблении, автоклавируют или кипятят 1 ч. Очищают щеткой, прополаскивают несколько раз водопроводной и один раз дистиллированной водой. Затем кипятят в дистиллированной воде 1 ч, споласкивают в трех сменах дистиллированной воды, стерилизуют в автоклаве.

Металлические инструменты моют горячей водой с мылом, промывают водопроводной и дистиллированной водой, стерилизуют кипячением в дистиллированной воде в течение 30 мин. Во время работы в стерильном боксе инструменты находятся в стакан-

не с 96%-ным этиловым спиртом, перед использованием инструменты прожигают пламенем горелки.

В настоящее время ни одна вирусологическая лаборатория не может обойтись без культуры клеток. Культуры клеток имеют следующие преимущества перед лабораторными животными и куриными эмбрионами:

можно добиться заражения практически всех культур клеток, что позволяет получать вируссодержащий материал с наивысшей концентрацией вируса при наименьшем содержании белкового балласта;

поскольку можно получить культуры клеток любого вида животного, снимаются видовые ограничения культивирования вирусов;

возможно вмешательство в инфекционный процесс в любой момент, не нарушая целостности живой системы;

можно непрерывно контролировать ход инфекционного процесса;

возможно получение готовой суспензии вируса в виде культуральной жидкости;

соблюдается полная стерильность культуральной жидкости в отношении грибов и бактерий;

предельно просты техника заражения и получение вируссодержащего материала;

относительная дешевизна.

Культуры клеток — наиболее совершенная из лабораторных систем для культивирования вирусов. В вирусологической практике культуры клеток чаще всего используют для первичного обнаружения вирусов и их выделения из патологического материала, накопления вируса при изготовлении вакцин и диагностикумов, поддержания вирусных штаммов в лаборатории, титрования вирусов и как тест-объект в реакции нейтрализации.

Для успешного выделения вируса необходимо соблюдать следующие требования:

используемая культура клеток должна быть чувствительной к предполагаемому вирусу. Чувствительность ее повышается, если клетки получены от молодых животных (лучше эмбрионов);

инокулируемый вирус не должен быть старым, долго хранившимся, так как определенная часть инактивированного вируса в популяции подавляет размножение вирулентных частиц. Вирулентность вируса повышается в результате серийных, быстро чередующихся пассажей предельных разведений;

культурирование проводят при определенном соотношении вируса и клеток, т. е. при определенной множественности заражения. В качестве средней величины рекомендуется  $10^6$ — $10^4$  ТЦД<sub>50</sub> на 10 млн клеток;

поддерживающую среду добавляют после того, как вирус прикрепится к клеткам — адсорбируется (обычно это происходит че-

рез 1—2 ч при 22 или 37 °C в зависимости от вируса). Распределение вируса в монослое при заражении должно быть равномерным; оптимальная температура для размножения вируса 36—38 °C. Длительное нахождение образовавшегося свободного вируса в теплой среде приводит к его инактивации.

Лучше всего получать вирус при 75 % цитопатического действия.

**Культивирование вирусов в культуре клеток.** Методика его сводится к следующему: подбору культуры клеток; получению вируссодержащего материала; подготовке для заражения; заражению клеток вируссодержащим материалом; культивированию вируса в клетках; индикации вируса в культуре клеток; сбору культуральной жидкости и идентификации в ней вируса.

**Подбор культур клеток.** Не всякая клетка чувствительна к любому вирусу. Вирус к первичной культуре обычно успешно адаптируется при условии, если культура получена из органов животного, естественно восприимчивого к данному вирусу. Однако адаптация вируса к перевиваемым клеткам более сложна, а в ряде случаев неосуществима. Для культивирования некоторых вирусов до сих пор неизвестно ни одной клеточной системы. Для культивирования вируса используют обычно молодые клетки, т. е. в первый день формирования монослоя, а в некоторых случаях (для парвовирусов свиней) клетки заражают при их посеве, так как вирус интенсивно размножается при наличии делящихся клеток (когда они находятся в стадии логарифмического роста). (Получение вируссодержащего материала и подготовка его для заражения описаны на с. 13—21.)

**Заржение клеток.** Для этого отбирают пробирки (или матрасы) со сплошным клеточным монослоем, просматривая их под малым увеличением микроскопа. Ростовую питательную среду сливают, клетки 1—2 раза промывают раствором Хенкса, чтобы удалить сывороточные антитела и ингибиторы. В каждую пробирку вносят по 0,1—0,2 мл вируссодержащего материала и покачиванием распределяют его равномерно по слою клеток. В таком виде пробирки (матрасы) оставляют от 1 до 2 ч при 22 или 37 °C для адсорбции вируса на поверхности клеток. Затем вируссодержащий материал удаляют из пробирок (матрасов) и наливают поддерживающую среду (в пробирку 1—2 мл, в матрасы около 10 % его объема). При выделении вируса из патологического материала некоторые пробы (фекалий и др.) могут оказывать токсическое действие на клетки, поэтому после адсорбции вируса монослоем клеток отмывают 1—2 раза раствором Хенкса (или питательной средой) и затем наливают поддерживающую среду.

**Культивирование вируса.** Пробирки (матрасы) закрывают герметически резиновыми пробками и ставят на инкубацию в термостат при 37 °C. Наиболее широко применяют стационарное инкубирование. При этом матрасы кладут в горизонтальном

положении, пробирки — под углом 5° так, чтобы монослой клеток оказался под питательной средой (чертой вверх). В ряде лабораторий зараженные культуры клеток инкубируют на врачающейся системе — роллерах. Используя этот метод, удается получать большой выход вируса, имеющего более высокий инфекционный титр, чем при стационарном культивировании.

Для каждой пробы материала обычно используют не менее 4—10 пробирок с культурой клеток. Для контроля оставляют 4—6 пробирок с незараженной культурой клеток, в которых заменяют ростовую среду на поддерживающую.

В культурах клеток, зараженных вирусом, питательную среду можно не менять в течение 7 дней, а pH среды (6,9—7,4) поддерживать с помощью 7,5%-ного раствора бикарбоната натрия. При более длительном культивировании инфицированных клеток (аденовирусы и др.) среду меняют.

Все пробирки (матрасы) после заражения клеток ежедневно исследуют под малым увеличением микроскопа, сравнивая культуры клеток, зараженные вирусом, с контрольными.

В термостате адсорбировавшиеся на клетках вирусные частицы проникают внутрь их и начинается их репродукция. Новые вирусные частицы покидают (полностью или частично) клетки, в которых они образовались, проникают в непораженные клетки, репродуцируются в них, переходят в новые клетки и поражают их. Так продолжается до тех пор, пока есть живые неповрежденные клетки. В результате этого процесса практически все клетки в матрасе или пробирке поражаются вирусом, хотя абсолютно все почти никогда не поражаются.

Вирус накапливается в основном в культуральной жидкости, но часть вирионов может оставаться и внутри не разрушенных вирусом клеток. Чтобы оставшийся в клетках вирус освободить, клетки тщательно разрушают или многократным замораживанием — оттаиванием (2—3 раза), или с помощью ультразвука.

Индикация (обнаружение) вируса в культуре клеток. Существуют следующие основные методы индикации вируса в культуре клеток: по цитопатическому эффекту, или цитопатическому действию (ЦПЭ, ЦПД); по положительной реакции гемадсорбции (РГАд); по образованию бляшек; по обнаружению внутриклеточных включений; по выявлению вирусов в реакции иммунофлуоресценции (РИФ); по обнаружению интерференции вирусов; по подавлению метаболизма клеток (цветная пробы); электронной микроскопией и др.

ЦПД. Наиболее широко и часто о размножении вируса в культуре клеток судят по цитопатическому эффекту, или цитопатическому действию. ЦПД называются любые изменения клеток под влиянием размножающегося в культуре клеток вируса. Физиологические изменения клеток установить довольно

сложно, а морфологические изменения обнаруживаются довольно легко. Для этого достаточно положить на предметный столик микроскопа пробирку или матрас слоем клеток вверх и, используя малое увеличение (объектив  $\times 8$ — $10$ , окуляр  $\times 7$ — $10$ ), осмотреть слой. Полезно сравнить клетки, зараженные вирусом, с такими же клетками в пробирке, не подвергавшимися заражению. В этом случае практически любые наблюдаемые в микроскоп отличия зараженной культуры клеток от контрольной можно считать проявлением ЦПД. Эти отличия могут захватывать весь монослой или отмечаться только в виде небольших очажков измененных клеток в слое нормальных клеток. Интенсивность ЦПД выражается тем, какая часть клеточно-го монослоя изменена вирусом. Хотя общепринятой системы оценки интенсивности ЦПД нет, ее часто оценивают в крестах или баллах. Так, если изменению (по сравнению с контролем) подвергся весь монослой в пробирке или матрасе, ЦПД оценивают на четыре креста, если  $3/4$  — на три, если  $1/2$  — на два креста,  $1/4$  — на один крест. Но эти оценки все же весьма условны.

Формы ЦПД зависят от биологических свойств вируса, вида клеток, дозы заражения, условий культивирования и т. д. Одни вирусы проявляют ЦПД через 2—3 сут после заражения (энтровервирусы), другие — через 1—2 нед (аденовирусы).

Ряд авторов пытались сгруппировать сходные формы ЦПД. У одних получилось 23 формы, у других — 11, у третьих — 5 и т. д. Но наиболее существенно различаются между собой три формы ЦПД: фрагментация клеток, округление клеток, симпластообразование (рис. 39, 40).

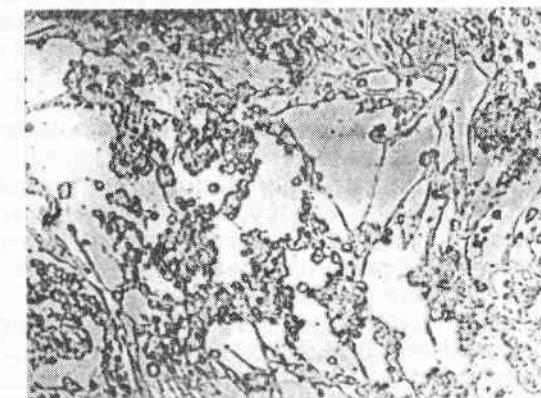


Рис. 39. Цитопатическое действие адено-вируса крупного рогатого скота в культуре клеток яичника



Рис. 40. Цитопатическое действие вируса оспы овец в культуре клеток легких эмбриона овцы (по Н. И. Троценко)

соседних клеток сливаются, образуя одно целое, в котором расположаются (главным образом по периферии) ядра клеток. Такие образования из цитоплазматической массы с многими клеточными ядрами называются симпластами (гигантские многоядерные клетки). Их образование объясняют двояко: нарушением процесса деления клеток под влиянием вируса или тем, что некоторые вирусы содержат фермент (лецитиназу), который растворяет клеточные оболочки, в результате цитоплазмы расположенных рядом клеток сливаются. ЦПД в культуре клеток способно вызывать большинство вирусов, поэтому этот метод индикации вирусов в культуре клеток применяют очень широко. Однако есть вирусы, которые, размножаясь в культуре клеток, ЦПД не вызывают (вирусы бешенства, классической чумы свиней, некоторые штаммы вируса диареи крупного рогатого скота и др.). Клетки остаются жизнеспособными, но интенсивность клеточного деления понижается, со временем изменяется и их морфология.

При неопластической трансформации пораженных клеток в монослое образуются плотные фокусы трансформации различной величины и формы, белого цвета (вирус саркомы Райса).

Отсутствие ЦПД в первом пассаже еще не говорит об отсутствии вируса, который не всегда размножается настолько быстро, чтобы вызвать ярко выраженное ЦПД. Поэтому и прибегают к «слепым» пассажам. Необходимо провести не менее трех «слепых» пассажей, прежде чем судить о наличии вируса в исследуемом материале.

РГАд. Гемадсорбция — соединение эритроцитов с поверхностью пораженных вирусом клеток — впервые была обнаружена

Фрагментация — разрушение клеток на отдельные фрагменты, которые отделяются от стекла и переходят в культуральную жидкость в виде клеточного детрита (вирус везикулярного стоматита).

Округление — потеря клетками способности прикрепляться к стеклу, вследствие чего клетки, обычно распластанные по стеклу, принимают шаровидную форму, отделяются от стекла и свободно плавают в культуральной жидкости, где и погибают (энтеровирусы, аденовирусы и др.).

Симпластообразование — растворение клеточных оболочек, вследствие чего цитоплазмы ядрами называются симпластами (гигантские многоядерные клетки). Их образование объясняют двояко: нарушением процесса деления клеток под влиянием вируса или тем, что некоторые вирусы содержат фермент (лецитиназу), который растворяет клеточные оболочки, в результате цитоплазмы расположенных рядом клеток сливаются. ЦПД в культуре клеток способно вызывать большинство вирусов, поэтому этот метод индикации вирусов в культуре клеток применяют очень широко. Однако есть вирусы, которые, размножаясь в культуре клеток, ЦПД не вызывают (вирусы бешенства, классической чумы свиней, некоторые штаммы вируса диареи крупного рогатого скота и др.). Клетки остаются жизнеспособными, но интенсивность клеточного деления понижается, со временем изменяется и их морфология.

Фогелем и Щелоковым (1957) на культуре ткани, инфицированной вирусом гриппа. В последующем выяснилось, что этой способностью обладает ряд других вирусов: парагриппозные, оспоподобные и оспы, ньюкаслской болезни, гриппа млекопитающих и птиц. Наиболее ценным оказалось применение этой реакции для выявления и идентификации парагриппозных вирусов животных (ПГ-З крупного рогатого скота, парагриппа овец, вируса Сендай). В основе этого явления лежит родство рецепторов вируса, находящихся на поверхности пораженной клетки, с рецепторами эритроцита, что приводит к их взаимному сцеплению аналогично реакции гемагглютинации. Преимущество этой реакции состоит в том, что она становится положительной еще до появления отчетливых цитопатических изменений в инфицированных клетках. Для постановки реакции используют эритроциты морской свинки, обезьян, человека (группы О) и другие эритроциты, чувствительные к гемагглютинирующему действию изучаемого вируса.

Методика РГАд состоит в следующем. На 3—4-й день после инфицирования клеток берут две пробирки с одинаковой культурой клеток, из которых одна заражена вирусодержащим материалом, а вторая контрольная. Из обеих пробирок сливают культуральную жидкость и вносят в обе по 2—3 капли 0,5%-ной суспензии отмытых эритроцитов. Обе пробирки оставляют на 5—10 мин так, чтобы эритроциты были на поверхности клеток (кладут горизонтально на стол), а затем слегка споласкивают физраствором и исследуют под микроскопом (малое увеличение). В контрольной пробирке эритроциты полностью удаляются с физраствором, а некоторые из оставшихся плавают вместе с жидкостью. Если в зараженной пробирке эритроциты не удалились с физраствором и не плавают, а прикреплены к поверхности клеток, следует считать РГАд положительной (см. рис. 89).

В зависимости от вируса и вида клеток расположение эритроцитов может быть трояким:

эритроциты адсорбированы только по периферии клеточного пласта в виде «ожерелья» (вирус африканской чумы свиней);

эритроциты расположены на слое клеток очагами или скоплениями (вирус гриппа);

эритроциты расположены на слое клеток диффузно (вирус парагриппа).

Каждый вирус способен адсорбировать эритроциты крови животных определенных видов. Если вирус на данной культуре клеток вызывает и ЦПД, и РГАд, то гемадсорбция проявляется раньше, чем ЦПД. Метод этот пригоден для индикации в культурах клеток только некоторых вирусов и поэтому применяется нечасто. Однако для индикации ряда вирусов (вирусы африканской чумы свиней, парагриппа-3 крупного рогатого скота и др.) он не заменим.

При отсутствии гемадсорбции на 3—4-й день после инфицирования через каждые 2—3 дня берут следующие пробирки с инфицированной культурой клеток и ставят РГАд по описанной выше методике. Пробирки с культурой клеток находятся под наблюдением в течение 14—20 дней. При отрицательной реакции гемадсорбции в первом пассаже проводят следующий пассаж и РГАд.

РГАд используют для обнаружения вируса в культуре клеток, для титрования его и при постановке реакции нейтрализации с целью определения титра антител в сыворотках крови животных.

*Метод образования бляшек.* Этот метод обнаружения вирусов технически сложнее других и применяется главным образом для титрования вирусов.

Дальбекко и Фогт в 1954 г. впервые предложили методику получения бляшек под агаром в культуре куриных фибробластов с вирусом западного лошадиного энцефаломиелита. В последующие годы многие авторы с успехом применяли этот метод при изучении различных вирусов — ящура, везикулярного стоматита, ньюкаслской болезни, чумы птиц, полиомиелита, Коксаки и др. Метод бляшек стали широко применять в вирусологии для получения чистых популяций вируса, особенно при изучении их генетических свойств. Методику получения бляшек, предложенную Дальбекко и Фогтом, модифицировали, и в настоящее время есть целый ряд отличных друг от друга методов, связанных с изучением различных вирусов.

Метод бляшек основан на образовании вирусом в однослойных культурах, залитых агаровой средой, содержащей витальный краситель — нейтральрот, негативных колоний или бляшек (см. рис. 45). Бляшки представляют собой обесцвеченные участки культуры, состоящие из погибших под действием вируса клеток. Кроме агара в целях предотвращения переноса вируса на другие места можно использовать крахмал и метилцеллюлозу. Некоторые вирусы дают бляшки без покрытия слоем агара, например вирус чумы крупного рогатого скота, осповакцины, некоторые представители вирусов герпеса и др.

При постановке бляшек особое внимание должно быть обращено на качество культуры, она должна иметь сплошной рост клеток без признаков дегенерации. Лучше всего использовать культуры, выращенные во флаконах или матрасах различного типа. На клетки, промытые средой или раствором Хенкса, наносят вирус в определенных разведениях и обеспечивают контакт вируса с клетками при периодическом покачивании в точно установленный отрезок времени (1—2 ч) при 37—38 °C. Неадсорбировавшийся вирус удаляют путем промывания раствором Хенкса или отсасывают пастеровской пипеткой, затем на слой клеток наносят специаль-

ное агаровое покрытие\*. Выбор среды покрытия определяется видом клеток и вируса.

Обычные компоненты агарового покрытия — агар, раствор Эрла, телячья сыворотка, нейтральный красный, раствор соды ( $\text{NaHCO}_3$ ), среда, антибиотики.

После застывания (30—60 мин) с поверхности агара сливают конденсированную влагу, флаконы переносят в термостат и инкубируют клетками вверх. Время инкубации и температура должны быть оптимальными для бляшкообразования, вызываемого данным вирусом. Наблюдение за появлением бляшек проводят в течение нескольких дней. За это время вирусы, адсорбировавшиеся на клетках, проникают в последние, проходят цикл репродукции, выходят из клеток и поражают соседние клетки. В сплошном слое живых клеток возникают островки мертвых, погибших вследствие репродукции в них вируса клеток. Раствор красителя окрашивает только живые клетки. Поэтому в матрасе на ровном красновато-розовом фоне появляются бесцветные пятна, которые и называются негативными пятнами Дальбекко или бляшками. Каждая бляшка соответствует островку мертвых клеток. Бляшки в культуре клеток образуют многие вирусы. При большой плотности (соответствующей низким разведениям вируса) они часто сливаются друг с другом. Время появления и морфология бляшек зависят от вида и штамма вируса, типа клеток и условий культивирования (см. рис. 45).

В основу титрования вирусов положены наблюдения Дальбекко и Фогта, показавших линейную зависимость между дозой внешнего вируса и количеством образующихся бляшек. Они показали, что для образования одной бляшки достаточно одной инфекционной вирусной частицы. Однако это положение верно при определенных условиях, и, прежде всего, при внесении в культуру больших разведений вирусов, исключающих возможность множественного заражения клеток.

*Цветная проба.* Цветную пробу для лабораторных исследований впервые предложили Солк, Янгнер и Уорд в 1954 г. Предпосылкой для разработки данного метода явились наблюдения Эндерса, Уэллера и Роббинса, которые отметили, что в незараженных тканевых культурах под влиянием продуктов метаболизма

\* Агаровое покрытие (для энтеровирусов): 2,5%-ный раствор агара — 90 мл; раствор Эрла 10-кратной концентрации — 18 мл; трижды дистиллированная вода — 60 мл; бычья сыворотка — 3,6 мл; раствор  $\text{NaHCO}_3$  (7,5 %) — 5,4 мл; нейтральный красный (1:1000) — 3 мл; пенициллин — 100 000 ЕД/мл — 0,18 мл; стрептомицин 100 000 ЕД/мл — 0,18 мл.

Все компоненты смешиваются при температуре 45—50 °C. При наслаждении на монослои клеток агаровая среда должна быть охлаждена до 36—38 °C.

pH среды сдвигается в кислую сторону, что улавливается по желтению фенолрота, добавленного в питательную среду. В то же время жидкость в тканевых культурах, зараженных вирусом, убивающим живые клетки, сохраняла свой красный цвет.

Наиболее отчетливые результаты дают вирусы с высокой скоростью размножения при культивировании их на медленнорастущих клетках.

Так как метод цветной пробы не отличается высокой достоверностью, его в практике используют редко.

**Обнаружение внутриклеточных включений.** При многих вирусных заболеваниях в клетках (в цитоплазме или ядре) различным органов и тканей появляются особые образования, называемые тельцами-включениями. Их классифицируют по локализации в клетке, составу нуклеиновой кислоты, тинкториальным свойствам и гомогенности.

Тельца-включения локализуются избирательно: при оспе, гриппе, бешенстве, парагриппе и других болезнях, как правило, развиваются цитоплазматические включения; при ринотрахеите крупного рогатого скота, ларинготрахеите птиц, адено-вирусной инфекции и других — ядерные.

Для приготовления препаратов культур клеток с целью выявления телец-включений клетки выращивают на покровных стеклах в пробирках или пенициллиновых флаконах, заражают испытуемым материалом и через определенные сроки инкубации при 37 °C (что зависит от свойств инокулированного вируса) стекла вынимают, промывают в теплом растворе Хенкса или физиологическом растворе (pH 7,0—7,2), подсушивают фильтровальной бумагой и фиксируют в одной из фиксирующих смесей: растворе Буэна — 10—15 мин, фиксаторе Карнуа — 10, Ценкера — 20—30, метиловым спиртом — 15 мин или в других фиксаторах. Затем препараты окрашивают.

Вирусные тельца-включения хорошо обнаруживаются в препаратах, окрашенных гематоксилином-эозином. Для этого фиксированные на покровных стеклах клетки промывают в дистиллированной воде и погружают на 5—15 мин в раствор гематоксилина (гематоксилин Майера, Эрлиха, Караки и др.). Время окрашивания подбирают эмпирически для каждой культуры клеток и краски. Затем препараты отмывают водой и помещают на 1—2 мин в аммиачную воду (на 200 мл дистиллированной воды добавляют 2—3 капли аммиака). В щелочной среде ядра клеток приобретают синий цвет. Далее препараты окрашивают 0,1%-ным водным раствором эозина 30—60 с, удаляют лишнюю влагу фильтровальной бумагой, проводят по спиртам возрастающей концентрации: 70, 80, 96 (первый раз), 96 (второй раз), 100° + ксилол (1 : 1), ксилол и заключают в бальзам. В каждом из спиртов и ксилоле препараты держат не более 1 мин. Перед перенесением препаратов в следую-

щую боксусу обязательно снимают с него фильтровальной бумагой лишнюю влагу, иначе спирт будет обводниться. При окраске гематоксилином-эозином ядра клеток окрашиваются в синий цвет, цитоплазма — в розовый, а тельца-включения — в синий или розовый в зависимости от вируса (рис. 41).

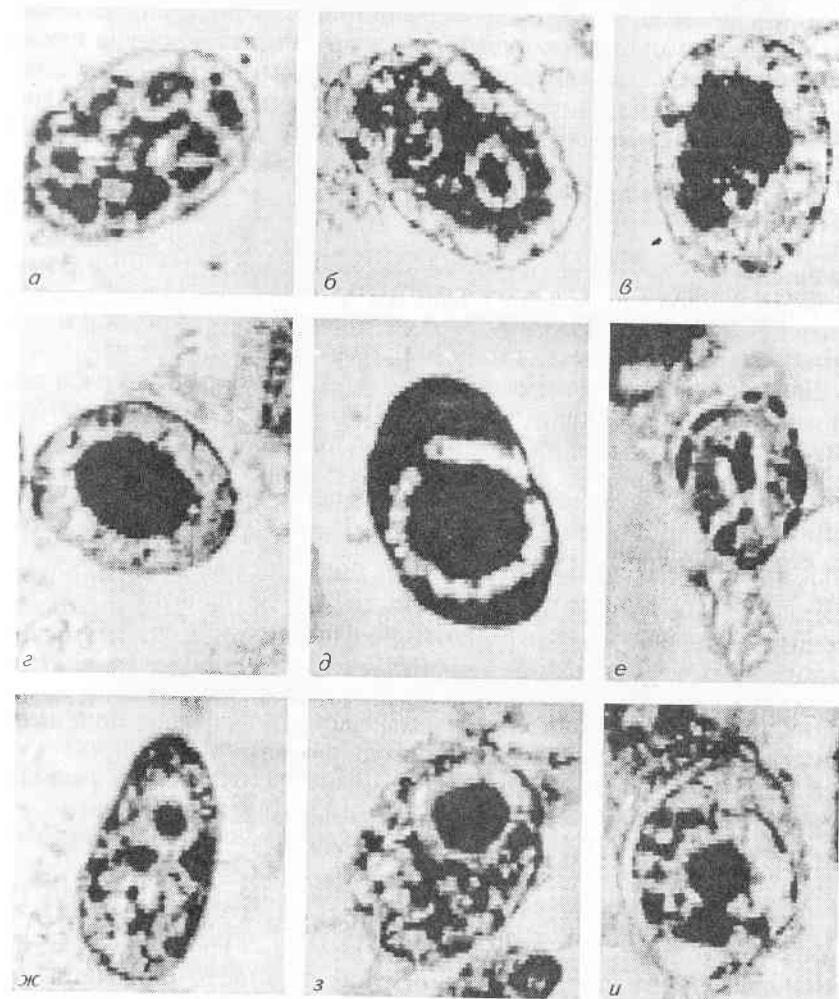


Рис. 41. Внутриядерные тельца-включения. Окраска гематоксилином-эозином (по Л. Н. Носик и др.):

а—е — перевиваемая культура клеток ПТ-80, зараженная адено-вирусом крупного рогатого скота; ж—и — первичная культура клеток testicula бычка, зараженная адено-вирусом крупного рогатого скота седьмого типа

Для обнаружения телец-включений при гриппе довольно часто используют окраску культур клеток по методу Клисенко. Для этого стекла с зараженной культурой клеток споласкивают теплым ( $37^{\circ}\text{C}$ ) физиологическим раствором и фиксируют в жидкости Дюбоска — Бразила—Буэна от 20 мин до нескольких недель. Тщательно отмытые (3–4 раза) в дистиллированной воде объекты окрашивают 10 мин 1%-ным раствором акридинового оранжевого, тщательно отмывают дистиллированной водой, затем снова окрашивают 1%-ным раствором эозина 30 мин, промывают дистиллированной водой и допропитывают раствором (1 : 1000) метиленового синего. Последний готовят перед употреблением из 1%-ного маточного раствора.

Окрашенные препараты промывают дистиллированной водой, дифференцируют в подкисленном (2–3 капли ледяной уксусной кислоты на 50 мл спирта) абсолютном спирте до появления розово-синего оттенка. Обезвоживают абсолютным спиртом и, проводя через ксилол, заключают в бальзам. Цитоплазма окрашивается в нежно-розовый цвет, ядро — в розово-сиреневый, ядрышки — в синий, вирусные включения — в ярко-красный (рис. 42).

Для окраски клеток крови, костного мозга или культур клеток из лимфоидных органов обычно применяют окраску по методу Романовского—Гимзы.

В вирусологической практике для обнаружения телец-включений довольно часто используют метод простого флуоресцентирования с применением акридинового оранжевого. (Сущность метода, его применение изложены на с. 132–133.)

*Обнаружение вирусов в реакции иммунофлуоресценции.* В том случае, если размножение вируса в культуре клеток не сопровождается цитопатическим эффектом, гемадсорбцией, его присутствие можно обнаружить с помощью флуоресцирующих антител. Этот метод широко используют при диагностике классической чумы свиней, парвовирусной инфекции свиней и других болезней. (Подробное изложение данного метода см. на с. 133–140.)

*Обнаружение вирусов с помощью иммунопероксидазной реакции (иммуноферментного анализа)* см. на с. 142–149.

*Обнаружение вирусов с помощью электронного микроскопа.* Методика изложена в специальном разделе.

*Метод, основанный на интерференции вирусов.* Построен на том, что некоторые вирусы в культуре клеток снижают способность размножаться в ней других вирусов. Например, вирус чумы свиней снижает инфекционную активность вируса ящура, вирус ньюкаслской болезни — вируса везикулярного стоматита и т. д.

Обычно этот метод применяют для обнаружения вирусов, которые не вызывают ЦПД в культуре клеток. Так, для обнаружения вируса чумы свиней в культуре клеток (он не вызывает ЦПД) эту

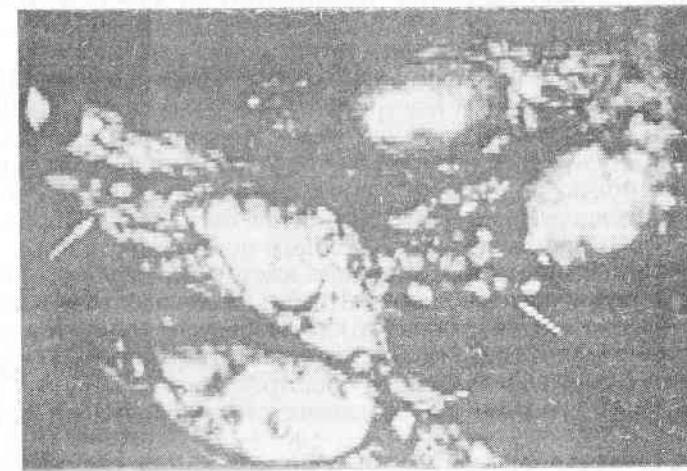
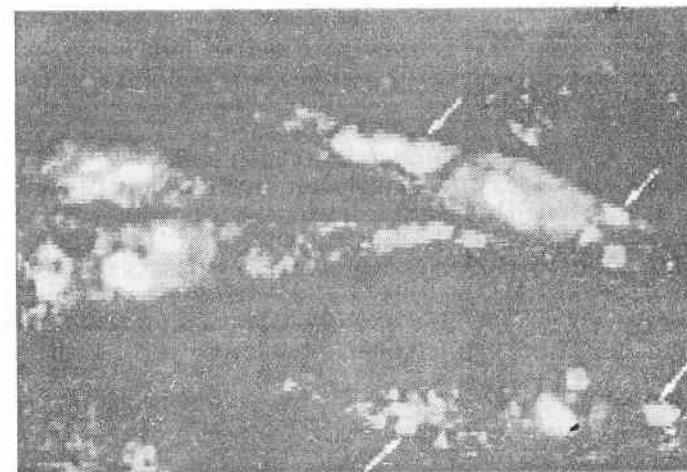


Рис. 42. Цитоплазматические тельца-включения. Окраска акридиновым оранжевым

инфицированную культуру заражают вторым вирусом (ящура) в дозе не менее  $100 \text{ ТЦД}_{50}$  и инкубируют в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$ . Через несколько дней проводят учет под микроскопом. Если в культуре клеток не обнаруживают ЦПД, значит, в ней находится вирус чумы свиней. Если во всех пробирках ЦПД, значит, вируса чумы нет и вирус ящура проявляет цитопатическое действие. Метод интерференции используют даже для титрования вирусов, не вызывающих ЦПД.

**Получение первично-трипсинизированных культур клеток из кожно-мышечной ткани развивающихся куриных эмбрионов.** Куриные эмбрионы 9—11-дневной инкубации овоскопируют. Отбирают яйца с подвижными эмбрионами и хорошо выраженными сосудами. На скорлупе простым карандашом отмечают границы воздушной камеры и расположение зародыша.

Поверхность скорлупы протирают йодированным спиртом и обжигают. Стерильными ножницами срезают скорлупу на 2—3 мм выше границы воздушной камеры, разрывают подскорлупную и хорионаплантонную оболочки и за шейку извлекают эмбрион в стерильную чашку Петри (рис. 43). У эмбриона удаляют голову, лапки, крылья и внутренние органы. Оставшийся кожно-мышечный мешок переносят в стерильную майонезную банку (250 мл) и измельчают ножницами на кусочки 3—4 мм.

Измельченную ткань 2—3 раза отмывают раствором Хенкса от слизи и кровяных элементов до получения прозрачных сливных вод и переносят в колбу для трипсинизации. В колбу наливают 0,15%-ный раствор трипсина, подогретого до 35—37 °C (соотношение ткани и трипсина 1 : 3), вносят стерильный магнитик и ставят на магнитную мешалку (рис. 44).

Трипсинизацию проводят дробно, т. е. через каждые 3—5 мин отделившиеся клетки вместе с трипсином сливают в центрифужные фляконы и помещают на лед или в холодильник для прекращения действия трипсина на клетки. К оставшемуся в колбе содержимому добавляют новую порцию трипсина. Скорость вращения на магнитной мешалке регулируют так, чтобы не было пены. Процесс повторяют несколько раз (3—5) до полного истощения ткани.

После трипсинизации суспензию клеток в растворе трипсина центрифугируют при  $1000 \text{ мин}^{-1}$  10 мин, надсадочную жидкость сливают (выбрасывают), а осадок клеток ресусцидируют в теплой ( $37^{\circ}\text{C}$ ) питательной среде (в заведомо известном объеме) и фильтруют через 3-слойный марлевый фильтр.

После тщательного перемешивания клеток берут 1 мл для подсчета клеток.

Успех культивирования клеток в значительной степени зависит от посевной дозы. При малом количестве клеток не наблюдается образование монослоя даже при длительном культивировании. При слишком большой дозе клеток происходит интенсивная их пролиферация, и образованный слой клеток значительно раньше подвергается старению и неспецифической дегенерации. Клетки подсчитывают в камере Горяева.

К 1 мл взвеси клеток добавляют равный объем 0,1%-ного раствора кристалвиолета, приготовленного на 0,1 н. растворе лимонной кислоты. После перемешивания камеру заполняют взвесью клеток и подсчитывают все клетки, имеющие ядро и неповрежденную цитоплазму; группу клеток с явными контурами считают за одну клетку.

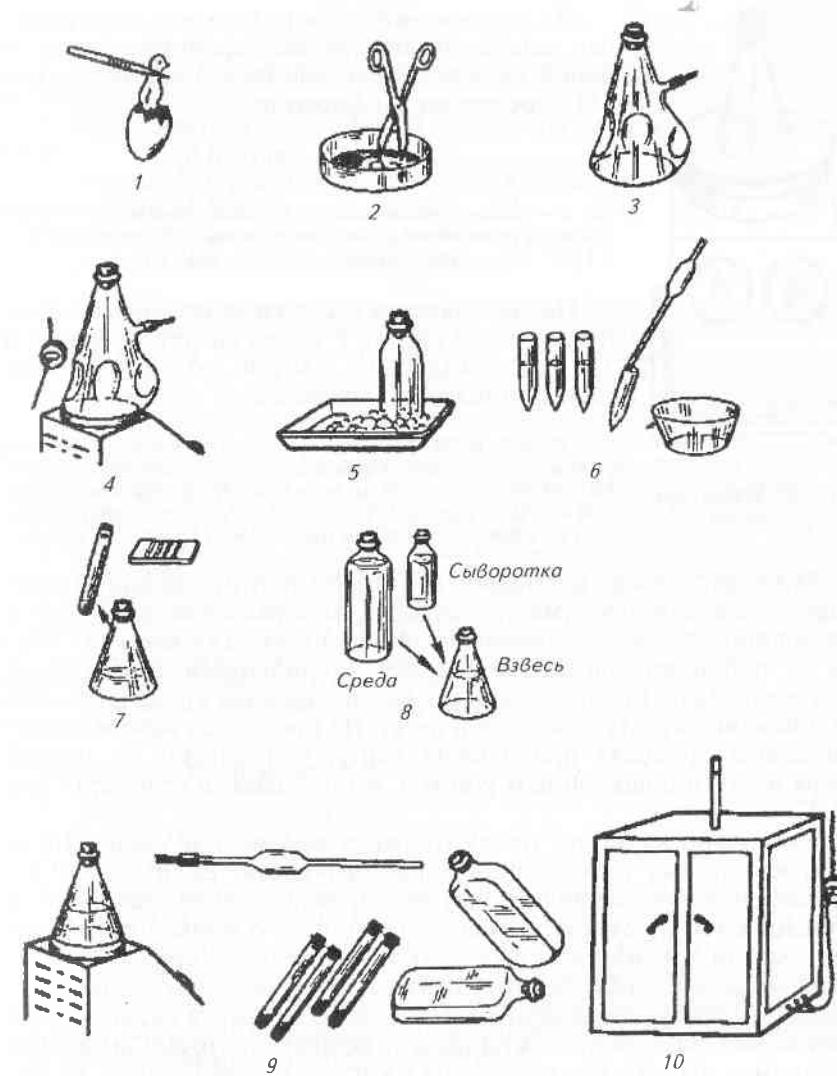


Рис. 43. Схема получения культуры клеток куриного эмбриона:

1 — извлечение эмбриона; 2 — удаление головы, конечностей и внутренностей; 3 — промывание; 4 — дробная трипсинизация; 5 — обединение взвеси клеток в сосуде на льду; 6 — центрифугирование и удаление трипсина; 7 — ресусцидирование осадка и подсчет клеток; 8 — доведение концентрации клеток до необходимой для посева; 9 — посев клеток в пробирки и матрасы; 10 — инкубация в термостате

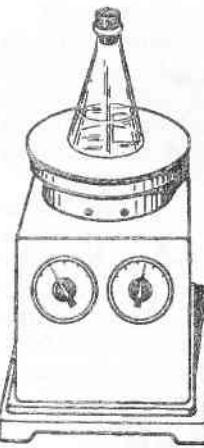


Рис. 44. Магнитная мешалка

На основании подсчета клеток в двух камерах высчитывают среднее арифметическое в одной из них. Число клеток в 1 мл супензии ( $X$ ) определяют по формуле

$$X = (A \cdot 2 \cdot 1000) : 0,9,$$

где  $A$  — среднее число клеток в одной камере; 2 — коэффициент разведения супензии краской; 1000 — число  $\text{мм}^3$  в 1  $\text{см}^3$ ; 0,9 — объем камеры Горяева,  $\text{мм}^3$ .

После подсчета супензию клеток разводят питательной средой с таким расчетом, чтобы в 1 мл содержалось от 700 тыс. до 1 млн клеток (для куриных фибробластов).

Пример. В 1 мл полученной супензии клеток (100 мл) содержится 4 млн клеток. Следовательно, всего в 100 мл супензии 400 млн клеток. Посевная концентрация — 1 млн клеток в 1 мл. Исходную супензию клеток (100 мл) доводят ростовой питательной средой до 400 мл.

Затем супензию разливают в матрасы или пробирки. В пробирки заливают по 1 мл, в матрасы вместимостью 1000, 250 и 100 мл вносят соответственно 100, 40 и 15 мл взвеси клеток. Сосуды и пробирки плотно закрывают стерильными резиновыми пробками (для предупреждения защелачивания среды), делают надпись (вид культуры клеток и дату). На пробирках восковым карандашом проводят продольную черту, укладывают их чертой вверх в лотки с наклонным углом 5° и помещают в термостат при 37 °C.

Ежедневно культуры просматривают под малым увеличением микроскопа для определения характера роста. Если клетки не пролиферируют, выглядят округлыми, зернистыми, темными и отслаиваются от стекла, это свидетельствует о плохой обработке посуды или токсичности сыворотки, питательной среды. Пролиферирующие клетки светлые, связаны цитоплазматическими отростками, растут однослойным пластом. В процессе размножения клеток выделяются продукты обмена веществ, которые вызывают изменение pH питательной среды в кислую сторону (среда желтеть), что отрицательно влияет на клетки и может привести их к гибели. Такую среду заменяют свежей. Обычно сплошной монослоем куриные фибробlastы образуют через 36–48 ч.

От одного куриного эмбриона получают 70–120 млн клеток. Культуры клеток куриных фибробластов используют при работе с вирусом болезни Ауески, оспы птиц, ньюкаслской болезни, гриппа птиц, вируса саркомы Райса и др.

## Задания

1. Получить первичную культуру клеток (фибробласты куриного эмбриона).
2. Ознакомиться с методикой заражения культур клеток вирусами.
3. Определить размножение вируса в культуре клеток по цитопатическому эффекту.
4. Поставить реакцию гемадсорбции.
5. Ознакомиться с методом бляшек.

**Материальное обеспечение:** стерильная спецодежда (халаты, колпаки, маски); куриные эмбрионы 9–11-дневного возраста; овоскопы или осветители ОИ-19; подставки для яиц; спиртовки; стерилизаторы со стерильными инструментами (ножницы глазные прямые и изогнутые, пинцеты анатомические); магнитные мешалки; центрифуга; центрифужные стерильные флаконы; сосуд со льдом; микроскоп и инвертированный микроскоп; камеры Горяева; лотки для укладки пробирок; груши резиновые; штативы для пробирок; посуда стерильная (чашки Петри, баночки майонезные, колбы для трипсинации с магнитами, фильтры марлевые, пипетки градуированные на 1, 2, 5 и 10 мл, пробирки с резиновыми пробками, матрасы на 100–1500 мл, роллерные колбы); растворы и среды (растворы Хенкса и Эрла, 0,25%-ный раствор трипсина, 0,02%-ный раствор версена, 7,5%-ный раствор двууглекислой соды, сыворотка крови крупного рогатого скота, среда 199, среда Игла, среда гидролизат лактальбумина); пенициллин; стрептомицин; сосуды с дезинфицирующим раствором; штативы для пробирок; пробирки с культурой клеток первичных — куриные фибробласты (или ПЭК, БТ), перевиваемых — L (ППТ или Нер-2) в норме и зараженные вирусами (ニューカスル病ウツボ細胞, ИРТ, ПГ-3); 0,5%-ная супензия эритроцитов петуха (или морской свинки); вирусодержащий материал; матрасы с бляшками; окрашенные микропрепараты культур клеток первичных и перевиваемых в норме и с различными формами ЦПД; таблицы и слайды.

## Примерный план занятий (6 ч)

### Первое занятие (2 ч).

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Демонстрация: а) растворов Хенкса, Эрла, трипсина, версена; б) питательных сред 199, Игла, гидролизат лактальбумина; в) посуды, применяемой при культивировании клеток.
4. Самостоятельная работа студентов: а) просмотреть под микроскопом первичные и перевиваемые культуры клеток (живая культура клеток и фиксированные микропрепараты); б) зарисовать просмотренные препараты в тетрадь.

### Второе занятие (2 ч).

1. Объяснение преподавателем методики трипсинации куриных эмбрионов.
2. Демонстрация преподавателем каждого этапа трипсинации.
3. Самостоятельная работа студентов: а) подготовить рабочее место для трипсинации; б) подготовить куриные эмбрионы для трипсинации; в) провести трипсинацию, получить супензию клеток необходимой концентрации и разлить ее по пробиркам.

### Третье занятие (2 ч).

- Объяснение преподавателем: а) методики заражения культур клеток; б) методов индикации вирусов в культуре клеток.
- Демонстрация: а) методики заражения культур клеток; б) методики постановки РГАд; в) основных форм ЦПД (на фото, слайдах, препаратах); г) матрасов с бляшками.

3. Самостоятельная работа студентов: а) просмотреть под микроскопом монослой первичных и перевиваемых культур клеток в норме (живые клетки и фиксированные микропрепараты) и зарисовать; б) изучить формы ЦПД различных вирусов (живые зараженные культуры клеток и микропрепараты) и зарисовать; в) поставить РГАд с целью индикации вируса.

4. Подведение итогов занятия.

5. Задание к следующему занятию.

#### Контрольные вопросы

- Какие виды культур клеток вам известны и какова их характеристика?
- Какие растворы и питательные среды применяют при культивировании клеток?
- Какова методика получения первично-трипсинизированных культур клеток?
- Как используются культуры клеток в вирусологии?
- Какова методика заражения культур клеток вирусами?
- Какие методы индикации вирусов в культуре клеток вы знаете?
- В чем преимущества культур клеток перед другими лабораторными системами?

**Методические указания.** Время данного занятия целесообразно распределить следующим образом. В первые 4 ч — объяснение преподавателя, демонстрация и самостоятельная работа студентов по трипсинизации куриных эмбрионов. При выполнении трипсинации группу делят на 2—4 подгруппы (в зависимости от наличия на кафедре материальных средств). Самая главная подготовка к этому занятию — это обеспечение стерильной посудой, инструментами, средами и растворами, которые должны быть заранее подготовлены.

Последние 2 ч можно посвятить методам индикации вирусов в культуре клеток. Для этого нужно иметь заранее: а) полученные культуры клеток (куриные фибробласти) в норме и зараженные вирусом (вакцинный вирус ньюкаслской болезни) или культуру клеток ПЭК или МДВК (это лучше) в норме и зараженные вакцинным вирусом ПГ-3. Эти культуры клеток будут использованы студентами как для изучения форм ЦПД и нормы клеток, так и для постановки РГАд; б) фиксированные окрашенные микропрепараты культуры клеток в норме и с различными формами ЦПД и РГАд.

При отсутствии условий регулярного получения культур клеток можно приготовить фиксированные препараты. Для этого надо предварительно получить культуру клеток (ПЭК или любую перевиваемую линию клеток) примерно в 100 пробирках. В 50 пробир-

ках с хорошим монослоем слить среду, отмыть клетки раствором Хенкса и залить 70%-ным спиртом. Культуру клеток остальных 50 пробирок заразить любым вирусом, который вызывал бы ЦПД. При наличии ЦПД в зараженных пробирках их также фиксируют спиртом.

Такие препараты могут сохраняться много месяцев при комнатной температуре и быть использованы студентами для изучения клеток в норме и с ЦПД, а также при изучении титрования вирусов и РН.

Если нет возможности обеспечить занятия всем необходимым в полной мере, допустимы некоторые упрощения:

при невозможности обеспечить студентов стерильными халатами, шапочками и масками допустима работа в обычных нестерильных халатах и в обычной учебной комнате, но потребуется больше аккуратности в работе для обеспечения асептики;

при отсутствии магнитных мешалок можно ограничиться взвешиванием смеси кусочков ткани с трипсином в руках;

при отсутствии трипсина эмбриональные ткани удается разбить на отдельные клетки или их агрегаты пипетированием;

при отсутствии стандартных питательных сред для культур клеток допустимо использование естественных питательных сред, состоящих из раствора Эрла (или Хенкса) с добавлением сыворотки крови и эмбрионального экстракта;

при отсутствии растворов Эрла и Хенкса можно приготовить и использовать Тироде и даже (в крайнем случае) 0,85%-ный раствор натрия хлорида.

Главное, что обеспечивает успех получения первичных культур клеток, — полная стерильность инструментов, посуды и материалов, а также сохранение стерильности при манипуляции с ними.

Основное время на занятиях занимает получение культур клеток, на это следует отводить не менее 2 ч.

## Тема 7

### ТИТРОВАНИЕ ВИРУСОВ

В лабораторных работах с вирусами, биофабричном производстве и в ветеринарной практике постоянно возникает необходимость определения количества вирусов в том или ином материале. Без такого определения невозможно экспериментальное заражение вирусами живых лабораторных систем, производство живых и инактивированных противовирусных вакцин и диагностических препаратов, оценка активности живых противовирусных вакцин, получение иммунных сывороток и многие другие работы.

Количество вируса в каком-либо материале определяют по титру вируса в этом материале. Под титром вируса понимают выра-



Рис. 45. Бляшки, образованные вирусом в культуре клеток

жение его концентрации в материале. *Титр вируса — это количество вируса, содержащееся в единице объема материала.* Поскольку количество вируса невозможно выразить в обычно применяемых (объем, масса и т. п.) единицах, прибегают к измерению в единицах действия или единицах активности. Вирусы обладают инфекционным и гемагглютинирующими действиями. Отсюда и единицы количества вирусов инфекционные и гемагглютинирующие. Размерность этих единиц зависит от соотношения полноценных и неполноценных вирионов в используемой супензии, объекта, способа титрования и других факторов. В практике нашли применение три типа единиц количества вируса: 1-й — инфекционные единицы локальных повреждений, вызываемых вирусами и оцениваемых по единичному эффекту; 2-й — инфекционные единицы 50%-ного действия вирусов на чувствительные живые объекты, оцениваемые статистически; 3-й — гемагглютинирующие единицы.

Из локальных повреждений, вызываемых вирусами, наиболее известны *бляшки* (рис. 45) в зараженных культурах клеток (островки мертвых клеток в слое живых) и *оспины* (некротические узелки) на ХАО куриного эмбриона (рис. 46), зараженных осипенными и некоторыми другими вирусами. В случаях такого проявления инфекционной активности вирусов количество вируса может быть измерено в бляшкообразующих единицах (БОЕ) или оспообразу-

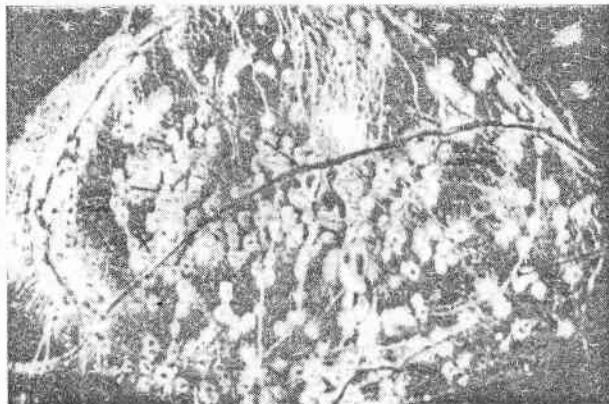


Рис. 46. Оспины на ХАО куриного эмбриона, зараженного вирусом оспы коров

ющих единицах (ООЕ). Одна БОЕ равна дозе вируса, способной вызвать образование одной бляшки, а одна ООЕ — одной оспины. Для определения титра вируса в БОЕ или ООЕ поступают так. Точно отмеренными и строго одинаковыми объемами исследуемого вируссодержащего материала заражают несколько культур клеток в матрасах или куриных эмбрионов на ХАО. Затем подсчитывают, сколько образовалось в каждом матрасе бляшек (под агаровым покрытием с нейтральным красным) или в каждом курином эмбрионе оспин и рассчитывают среднее арифметическое этого количества. Оно точно равно количеству БОЕ или ООЕ вируса, содержащегося в заражающей дозе вируссодержащего материала. Поскольку объем заражающей дозы всегда точно известен, нетрудно рассчитать, сколько БОЕ или ООЕ приходится на единицу объема вируссодержащего материала. Это и будет выражением концентрации или титром вируса в материале. Рассчитать титр вируса ( $T$ ) можно по довольно простой формуле

$$T = \frac{n}{Va}$$

где  $n$  — среднее арифметическое количество бляшек на один матрас или оспин на один куриный эмбрион;  $V$  — объем заражающей дозы;  $a$  — разведение вируссодержащего материала, взятое для заражения.

**Пример:** Необходимо определить титр вируса оспы кур в супензии из кусочков пораженной кожи больных оспой кур. Так как супензия получилась довольно концентрированная и вязкая, отобрали 0,5 мл этой супензии и добавили к ней 4,5 мл физраствора, т. е. развели в 10 раз (1 : 10). По 0,2 мл разведенной супензии внесли на ХАО пяти куриных эмбрионов. Через 6 дней инкубации в термостате куриные эмбрионы вскрыли и сосчитали количество оспин на всех пяти ХАО. Их оказалось 10, 11, 13, 18 и 8. Среднее арифметическое

$$n = \frac{10 + 11 + 13 + 18 + 8}{5} = 12.$$

Полученные результаты ( $n = 12$  оспин,  $V = 0,2$  мл,  $a = 1 : 10 = 0,1$ ) подставим в формулу

$$T = \frac{12}{0,2 \cdot 0,1} = \frac{12}{0,02} = \frac{12 \cdot 100}{2} = 600.$$

Следовательно, титр вируса в супензии равен 600 ООЕ/мл, т. е. в каждом миллилитре супензии содержится по 600 доз вируса оспы, каждая из которых способна вызвать образование одной оспины на ХАО.

Этот пример титрования вируса — упрощенный, так как он не учитывает случаев высокой концентрации вируса в материале, при которой бляшки в культуре клеток или оспины на ХАО могут слияться между собой и их невозможно будет сосчитать. Считается,

что счету поддаются бляшки и оспины, если их количество не превышает 50 на матрас или ХАО. Поскольку титр вируса в исследуемом материале обычно неизвестен (он ведь подлежит определению), то трудно сказать, в каком разведении надо брать материал для заражения, чтобы избежать слияния бляшек или оспин. Поэтому в таких случаях готовят несколько разведений испытуемого материала (обычно с коэффициентом 10) и каждым разведением в одинаковых дозах заражают равные группы культур клеток или куриных эмбрионов, затем рассчитывают среднее арифметическое количество бляшек или оспин для каждого разведения, отбрасывая те, где счет оказался невозможным. Титр вируса тогда рассчитывают по формуле

$$T = \frac{n_1 + n_2 + n_3 + \dots + n_n}{V(a_1 + a_2 + a_3 + \dots + a_n)}.$$

Эта формула похожа на предыдущую, но несколько усложнена. Пример результатов титрования приведен в таблице 6.

#### 6. Результаты титрования по БОЕ

| Разведение вируса | Доза заражения V (мл) | Среднее арифметическое бляшек на один матрас |
|-------------------|-----------------------|--|
| $a_1 = 1 : 10$    | 0,2                   | $n_1 = 134$                                  |
| $a_2 = 1 : 100$   | 0,2                   | $n_2 = 28$                                   |
| $a_3 = 1 : 1000$  | 0,2                   | $n_3 = 5$                                    |

$$T = \frac{134 + 28 + 5}{0,2 \left( \frac{1}{10} + \frac{1}{100} + \frac{1}{1000} \right)} = \frac{167}{0,2 \cdot 0,111} = \frac{167 \cdot 10\,000}{222} = 7522.$$

Метод титрования вирусов в БОЕ дает наиболее достоверные данные о концентрации вирусов, но он встречает технические трудности, связанные с получением и подсчетом бляшек. Что касается оспин, то их использование для титрования ограничивается довольно немногочисленными вирусами, способными образовывать узелки на ХАО куриных эмбрионов.

Наиболее универсален метод определения титра вируса в единицах 50%-ного инфекционного действия. По этому методу за единицу количества вируса принимается такая его доза, которая способна вызывать инфекционный эффект у 50 % зараженных тест-объектов. Она обозначается как ЭД<sub>50</sub> — эффективная 50%-ная доза. Число таких доз вируса в единице объема материала и будет выражать титр вируса в этом материале.

В качестве тест-объектов в лабораториях обычно используют белых мышей, куриные эмбрионы и культуры клеток, у которых инфекционное действие вируса может проявляться гибеллю, клиническими симптомами, патологоанатомическими изменениями и цитопатическим эффектом. Для каждого вируса подбирают чувствительный к нему тест-объект и форму учета его инфекционного действия, по которой оценивают эффект заражения. В зависимости от вида тест-объекта и формы проявления инфекционного действия ЭД<sub>50</sub> принимает один из следующих видов, приведенных в таблице 7.

#### 7. Виды единиц количества вирусов при определении по 50%-ному инфекционному действию

| Тест-объекты          | Виды инфекционного действия вирусов                      | Единицы количества вирусов              |                        |
|-----------------------|--|---|------------------------|
|                       |  | название единиц                         | сокращение обозначения |
| Лабораторные животные | Гибель   | 50%-ная летальная доза                  | ЛД <sub>50</sub>       |
| То же                 | Клинические симптомы или патологоанатомические изменения | 50%-ная инфекционная доза               | ИД <sub>50</sub>       |
| Куриные эмбрионы      | Гибель   | 50%-ная эмбриональная летальная доза    | ЭЛД <sub>50</sub>      |
| То же                 | Патологоанатомические изменения                          | 50%-ная эмбриональная инфекционная доза | ЭИД <sub>50</sub>      |
| Культуры клеток       | Цитопатический эффект                                    | 50%-ная цитопатическая доза             | ЦПД <sub>50</sub>      |

Иначе говоря:

1 ЛД<sub>50</sub> — это доза вируса, убивающая 50 % лабораторных животных (обычно белых мышей);

1 ИД<sub>50</sub> — доза вируса, вызывающая клинические симптомы или патологоанатомические изменения у 50 % зараженных лабораторных животных;

1 ЭЛД<sub>50</sub> — доза вируса, убивающая 50 % куриных эмбрионов;

1 ЭИД<sub>50</sub> — доза вируса, вызывающая патологоанатомические изменения у 50 % зараженных куриных эмбрионов;

1 ЦПД<sub>50</sub> — доза вируса, вызывающая цитопатический эффект у 50 % зараженных культур клеток (обычно пробирок с культурами клеток).

Количество ЭД<sub>50</sub> (ЛД<sub>50</sub>, ИД<sub>50</sub>, ЭЛД<sub>50</sub>, ЭИД<sub>50</sub> или ЦПД<sub>50</sub>) вируса, содержащееся в единице объема вирусодержащего материала, и будет выражением титра (T) вируса в этом материале. Например, T = 10<sup>3,48</sup> ЦПД<sub>50</sub>/0,1 мл означает, что в каждой 0,1 мл вирусодержащего материала содержится 10<sup>3,48</sup> доз вируса (т. е. более 1000, но менее 10 000, а именно 10<sup>3,48</sup> = 3020), каждая из которых

способна вызвать цитопатический эффект в 50 % пробирок с культурой клеток.

Названные единицы 50%-ного инфекционного действия вируса ( $\text{ЛД}_{50}$ ,  $\text{ИД}_{50}$ ,  $\text{ЭЛД}_{50}$ ,  $\text{ЭИД}_{50}$ ,  $\text{ЦПД}_{50}$ ) используются в случаях оценки инфекционного действия вируса со статистически оцениваемым эффектом, имеющим место, когда учет инфекционного действия вируса ведется по летальному действию, клиническим симптомам, патологоанатомическим изменениям или цитопатическому действию.

Титрование вирусов по 50%-ному инфекционному действию — наиболее универсальный прием, пригодный для титрования практически любого вируса, если подобрать чувствительную к нему живую систему (тест-объект). Однако этот метод титрования вирусов довольно трудоемкий, длительный и требует статистических расчетов.

Задача определения титра вируса в единицах 50%-ного инфекционного действия ( $\text{ЛД}_{50}$ ,  $\text{ИД}_{50}$ ,  $\text{ЭЛД}_{50}$ ,  $\text{ЭИД}_{50}$ ,  $\text{ЦПД}_{50}$ ) сводится к тому, чтобы найти такое разведение испытуемого вируссодержащего материала, в объеме заражающей дозы которого содержалась бы одна  $\text{ЭД}_{50}$ , а затем рассчитать, сколько таких единиц вируса содержится в таком же объеме вируссодержащего материала, что и будет показателем титра вируса в этом материале.

Чтобы решить эту задачу, сначала из исследуемого вируссодержащего материала готовят ряд последовательных 10-кратных разведений. 10-кратные разведения берут по двум причинам:

во-первых, как видно из графика зависимости инфекционного эффекта от дозы вируса (рис. 47), кривая этой зависимости вблизи точки, соответствующей  $\text{ЭД}_{50}$ , на значительном отрезке приближается к прямой. Это означает, что в определенных пределах, центр которых в точке  $\text{ЭД}_{50}$ , между логарифмом дозы (разведения) вируса и инфекционным эффектом существует прямолинейная зависимость, т. е. величина инфекционного эффекта пропорциональна логарифму дозы вируса (или его разведения), в области малых и особенно больших доз эта зависимость нарушается;

во-вторых, при 10-кратном разведении облегчаются последующие расчеты.

Однаковыми объемами каждого из 10-кратных разведений исследуемого вируссодержащего материала заражают равные групп-

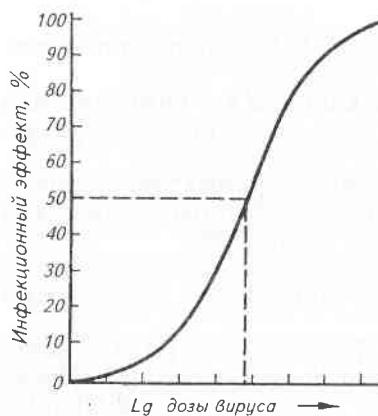


Рис. 47. График зависимости инфекционного эффекта от дозы вируса

пы чувствительных к данному вирусу живых тест-объектов (мышей, куриных эмбрионов или культур клеток). При этом в каждой группе должно быть не менее 4–6 тест-объектов, так как при меньшем количестве статистически рассчитываемая величина титра вируса будет иметь слишком большую погрешность (статистическая величина тем точнее, чем на большем количестве исходных данных она основана).

После заражения учитывают результат действия вируса (гибель, клинические симптомы, патологоанатомические изменения или ЦПЭ) на зараженные объекты и определяют, в каком разведении вирус проявил свое действие на 50 % чувствительных объектов. Разведение, дающее 50%-ный эффект, рассчитывают методом прямолинейной интерполяции. Когда такое разведение нашли, то считают, что в заражающем объеме вируса, разведенного в найденное (соответствующее 50%-ному эффекту) число раз, содержится 1  $\text{ЭД}_{50}$ . В таком же объеме исходного (неразведенного) вируссодержащего материала таких доз ( $\text{ЭД}_{50}$ ) содержится больше во столько раз, во сколько был разведен материал, давший 1  $\text{ЭД}_{50}$ . Затем пересчитывают, сколько таких единиц 50%-ного инфекционного действия вируса содержится в единице объема (мл) вируссодержащего материала, что и будет выражением титра вируса в данном материале.

Разберем сказанное на конкретном примере. Предположим, что мы получили 12 мл суспензии вируса электромелии и путем бактериологического контроля убедились, что она свободна от бактерий и грибов. Наша задача — установить титр вируса в указанной суспензии. Вначале подбираем лабораторную живую систему, чувствительную к данному вирусу. Выясняем, что вирус электромелии убивает мышей при внутрибрюшинном заражении. Поэтому решаем титровать вирус в нашей суспензии на белых мышах. Для этого подбираем 60 мышей, равных по массе и без признаков какого-либо заболевания. По 6 мышам рассаживаем в 10 клеток (или широкогорлые банки объемом 10 л), каждую из которых нумеруем. Затем из исследуемой суспензии вируса готовим ряд последовательных 10-кратных разведений. Количество разведений зависит от предполагаемого титра вируса (чем он выше, тем больше нужно сделать разведений). Их надо получать столько, чтобы последнее (наиболее высокое) разведение уже не давало инфекционного эффекта совсем. Но если вероятные пределы титра вируса предположить трудно, то лучше сделать больше разведений, так как лишние разведения не помешают определению титра вируса, а в случае, если последнее разведение не даст нулевого эффекта, титр вируса определить будет затруднительно или невозможно. В соответствии с величиной предполагаемых разведений берут и количество лабораторных объектов, на которых будут титровать вирус (в нашем примере мы решили делать 10 разведений вируса и соответственно разделили мышей на 10 групп по 6 в каждой).

Чтобы получить 10 последовательных разведений исследуемой супензии вируса, надо взять 10 стерильных пробирок с пробками (в штативе), пронумеровать их и в каждую налить по 9 мл стерильного физраствора, а затем в первую пробирку внести пипеткой ровно 1 мл исследуемой супензии, выдув ее так, чтобы не касаться концом пипетки поверхности физраствора, и удалить в сосуд с дезраствором (3%-ным раствором натрия или калия гидроксида). Взять новую стерильную пипетку и с ее помощью, несколько раз набирая и выдувая жидкость, тщательно перемешать смесь в первой пробирке, набрать 1 мл смеси и внести во вторую пробирку, не касаясь поверхности физраствора. Затем взять третью стерильную пипетку, перемешать ею смесь во второй пробирке и перенести ею 1 мл из второй в третью пробирку, и так повторять до десятой пробирки. В результате получим ряд последовательных 10-кратных разведений супензии вируса.

Наливать в пробирки по 9 мл физраствора и затем последовательно переносить по 1 мл необязательно. Можно эти объемы уменьшить в 2,5 или 10 раз, т. е. разлить по 4,5 мл физраствора и переносить по 0,5 мл, или разлить по 1,8 мл физраствора и переносить по 0,2 мл, или разлить по 0,9 мл физраствора и переносить по 0,1 мл. Но надо помнить, что чем меньше используемые объемы, тем ниже точности отмеривания и определения титра вируса.

Процесс получения последовательных 10-кратных разведений можно представить следующей схемой.

| Номер пробирки        | 1         | 2         | 3         | 4         | 5         | 6         | 7         | 8         | 9         | 10         |
|-----------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| Физраствор            | 4,5       | 4,5       | 4,5       | 4,5       | 4,5       | 4,5       | 4,5       | 4,5       | 4,5       | 4,5        |
| Исследуемый вирус     | 0,5       |           |           |           |           |           |           |           |           |            |
| Полученное разведение | $10^{-1}$ | $10^{-2}$ | $10^{-3}$ | $10^{-4}$ | $10^{-5}$ | $10^{-6}$ | $10^{-7}$ | $10^{-8}$ | $10^{-9}$ | $10^{-10}$ |

После получения разведений супензии вируса необходимо выбрать дозу заражения, которая должна быть технически удобной и обеспечить эффект заражения. Так как лабораторные объекты обычно мелкие, то дозу заражения выбирают небольшую. Для мышей (даже при внутрибрюшинном заражении) она колеблется обычно от 0,1 до 0,5 мл. Предположим, мы решили каждой мыши ввести внутрибрюшинно 0,3 мл инфекционного материала, т. е. супензию вируса в различных разведениях. Тогда 0,3 мл супензии вируса первого разведения ( $10^{-1}$ , или 1 : 10) надо ввести 6 мышам первой группы, 0,3 мл разведения  $10^{-2}$  (1 : 100) — второй и т. д.

За зараженными мышами устанавливают регулярное (не реже одного раза в сутки) наблюдение и фиксируют их гибель. Гибель в первые 48 ч после заражения трудно признать результатом действия вируса (особенно в высоком разведении), ее считают неспецифической и в расчет не принимают. Когда падеж зараженных

мышей прекращается, т. е. в течение 2–3 сут не будет новых случаев гибели, учет можно считать законченным. Результаты эксперимента фиксируют в журнале.

Предположим, что мы получили следующие результаты:

| Разведение вируса          | Выжило | Пало |
|----------------------------|--------|------|
| $10^{-1}$ (1 : 10)         | 0      | 6    |
| $10^{-2}$ (1 : 100)        | 0      | 6    |
| $10^{-3}$ (1 : 1000)       | 1      | 5    |
| $10^{-4}$ (1 : 10 000)     | 4      | 2    |
| $10^{-5}$ (1 : 100 000)    | 5      | 1    |
| $10^{-6}$ (1 : 1 000 000)  | 6      | 0    |
| $10^{-7}$ (1 : 10 000 000) | 6      | 0    |

Теперь надо расчетным путем найти такое разведение вируса (а это равнозначно его дозе), которое вызывает гибель 50 % зараженных мышей. Для этого известно много способов (в том числе и графических), но у нас наиболее часто пользуются методом Рида и Менча или методом Кербера (хотя оба эти способа дают погрешности и не являются наилучшими).

**Расчет дозы (разведения) вируса, дающей 50%-ный эффект (ЭД<sub>50</sub>), по Риду и Менчу.** Этот метод предусматривает использование кумулятивных данных, которые получают исходя из предположения, что мышь, выжившая при заражении определенной дозой (разведением) вируса, от заражения меньшей дозой обязательно бы выжила. И наоборот, мышь, павшая от заражения определенным разведением вируса, обязательно пала бы от заражения меньшим разведением (большой дозой) вируса. Количество выживших и павших при таком рассуждении увеличивают на каждое разведение путем суммирования с предыдущими, идя от большего к меньшему. Посмотрим, как это получится для нашего примера. Для этого результат надо записать в виде таблицы 8.

#### 8. Результаты заражения мышей

| Разведение вируса | Фактические данные |      | Кумулятивные данные |      |                               |
|-------------------|--------------------|------|---------------------|------|-------------------------------|
|                   | выжило             | пало | выжило              | пало | Отношение павших к зараженным |
| $10^{-1}$         | 0                  | 6    | 0                   | 20   | 20 : 20                       |
| $10^{-2}$         | 0                  | 6    | 0                   | 14   | 14 : 14                       |
| $10^{-3}$         | 1                  | 5    | 1                   | 8    | 8 : 9                         |
| $10^{-4}$         | 4                  | 2    | 5                   | 3    | 3 : 8                         |
| $10^{-5}$         | 5                  | 1    | 10                  | 1    | 1 : 11                        |
| $10^{-6}$         | 6                  | 0    | 16                  | 0    | 0 : 16                        |
| $10^{-7}$         | 6                  | 0    | 22                  | 0    | 0 : 22                        |

Для получения кумулятивных данных (кумуляция — накопление) поступают так. Берут колонку фактических данных с отрицательной реакцией на заражение (у нас колонка выживших после заражения мышей) и идут от меньшего значения к большему. Будем считать, что от дозы 0,3 мл в разведении  $10^{-1}$  ни одна мышь не выжила; от разведения  $10^{-4}$  выжило 4, но и одна, выжившая от  $10^{-3}$ , от  $10^{-4}$  заведомо выжила бы (доза  $10^{-4}$  меньше, чем  $10^{-3}$ ), и ее прибавляют к 4. Для  $10^{-5}$  выжило 5, но и одна, пережившая  $10^{-3}$ , а также 4, пережившие  $10^{-4}$ , от  $10^{-5}$  тоже выжили бы. Их всех прибавляют к 5, фактически выжившим. Точно так же рассуждают и для остальных разведений.

Для положительно реагирующих на заражение (у нас павших) рассуждения ведут в обратном порядке и также суммируют от меньшего значения к большему.

После получения кумулятивных данных рассчитывают процент положительно реагирующих на заражение (в нашем примере павших) для каждого разведения (например, для разведения  $10^{-4}$  пало 3 и выжило 5, т. е. пало 3 из 8, что равно  $(3/8) \cdot 100 = 37,5\%$ ).

Как видно из полученных результатов, 0,3 мл суспензии вируса ни в одном из взятых разведений не убивает ровно 50 % мышей. Такое разведение вируса (или дозу вируса, т. е.  $\text{ЛД}_{50}$ ) необходимо рассчитать.

Из таблицы 8 видно, что 0,3 мл суспензии вируса в разведении  $10^{-3}$  убивает более 50 % (88,8 %), а в разведении  $10^{-4}$  — меньше 50 % (37,5 %) мышей. Значит, искомое разведение находится между  $10^{-3}$  ( $1 : 1000$ ) и  $10^{-4}$  ( $1 : 10000$ ). Чтобы его найти, надо воспользоваться формулой

$$\lg \text{ЛД}_{50} = \lg B - \frac{b - 50}{b - a} \lg d,$$

где  $\text{ЛД}_{50}$  — искомое разведение вируса;  $B$  — разведение, дающее эффект более 50%;  $b$  — процент, соответствующий разведению  $B$ ;  $a$  — процент, соответствующий разведению, дающему эффект менее 50%;  $d$  — коэффициент разведения (у нас разведения 10-кратные, значит, коэффициент равен 10).

Подставим в формулу значения букв из нашего примера:

$$\lg \text{ЛД}_{50} = \lg 10^{-3} - \frac{88,8 - 50}{88,8 - 37,5} \lg 10 = -3 - \frac{38,8}{51,3} 1 = -3 - 0,76 = -3,76.$$

Значит, разведение вируса, 0,3 мл которого способно вызвать гибель 50 % зараженных мышей, равно  $10^{-3,76}$ , или  $1 : 10^{3,76}$ . Иначе говоря, в 0,3 мл вируса, разведенного в  $10^{3,76}$  раз, содержится одна  $\text{ЛД}_{50}$  (т. е. доза вируса, способная убить 50 % мышей). Тогда в 0,3 мл исходной (испытуемой) суспензии вируса таких доз содержитя  $10^{3,76}$  (т. е. больше во столько раз, во сколько разведен ви-

рус, давший 50%-ный эффект). Значит, титр вируса  $T = 10^{3,76}$   $\text{ЛД}_{50}/0,3$  мл, или  $T = (10/3)10^{3,76}$   $\text{ЛД}_{50}/\text{мл}$ .

Искомое разведение вируса, дающее 50%-ный эффект ( $\text{ЭД}_{50}$ ), можно найти и иначе. В нашем примере  $\text{ЛД}_{50}$  лежит между разведениями  $10^{-3}$  и  $10^{-4}$ . Разница между процентом выше 50 и 50 равна  $88,8 - 50 = 38,8$ , а разница между высшим и низшим значениями равна  $88,8 - 37,5 = 51,3$ . Отношение  $38,8 : 51,3$  показывает, на какую величину отличается  $10^{-3}$  от искомой. Если его умножить на логарифм коэффициента разведения ( $\lg 10 = 1$ ), то получим  $38,8 : 51,3 = 0,76$ . Значит, искомое разведение  $\text{ЛД}_{50}$  равно  $10^{-3+(-0,76)} = 10^{-3,76} = 1 : 10^{3,76}$ , а титр вируса  $T = (10/3)10^{3,76}$   $\text{ЛД}_{50}/\text{мл}$ .

Титр вируса, выраженный числом с дробным показателем степени, обычно в таком виде и оставляют. Но его можно легко превратить в абсолютную величину с помощью таблицы антилогарифмов (например, в «Четырехзначных математических таблицах» В. М. Брадиса).

В нашем примере  $10^{3,76} = 5754$ . Поэтому выражение титра вируса можно записать так:  $T = (10/3)5754 \text{ ЛД}_{50}/\text{мл}$ , или  $T = 19180 \text{ ЛД}_{50}/\text{мл}$ . Метод Рида и Менча требует положительных данных, симметричных относительно 50 % (например, от 0 до 100 %, от 10 до 90 %, от 20 до 80 % и т. д.), постоянного числа животных на каждое разведение, отсутствия положительного эффекта от неспецифических причин.

Недостатки метода следующие: 1) более высокая доза вируса не всегда вызывает и более высокий инфекционный эффект; 2) невозможно вычислить стандартную ошибку; 3) создается впечатление, что работа велась с большим числом тест-объектов, чем фактически.

Этот метод является приближенным, но он дает величины, которые хорошо согласуются с показателями, полученными более точными методами.

**Расчет дозы (разведения) вируса, дающей 50%-ный эффект ( $\text{ЭД}_{50}$ ), по Керберу.** Этот метод проще, он не требует расчета кумулятивных данных, пригоден и в случаях положительного эффекта от неспецифических причин. Но для получения высокодостоверных результатов необходимо, чтобы положительные данные были известны в диапазоне от 0 до 100 %.

Рассчитаем  $\text{ЛД}_{50}$  для тех же результатов титрования, что и в предыдущем примере.

| Разведение вируса | Выжило | Пало |
|-------------------|--------|------|
| $10^{-1}$         | 0      | 6    |
| $10^{-2}$         | 0      | 6    |
| $10^{-3}$         | 1      | 5    |
| $10^{-4}$         | 4      | 2    |
| $10^{-5}$         | 5      | 1    |
| $10^{-6}$         | 6      | 0    |
| $10^{-7}$         | 6      | 0    |

Для расчета  $\text{ЛД}_{50}$  здесь можно воспользоваться следующей формулой (модификация наша):

$$\lg \text{ЛД}_{50} = \lg D + \frac{\lg d}{2} - \lg d \sum \frac{r}{n},$$

где  $D$  — высшее разведение вируса, еще дающее 100%-ный эффект;  $d$  — коэффициент разведения;  $\sum \frac{r}{n}$  — сумма отношений положительно реагирующих тест-объектов к зараженным для всех разведений, дающих эффект от 0 до 100%;  $r$  — количество положительно реагирующих тест-объектов на каждое разведение;  $n$  — количество зараженных тест-объектов на каждое разведение.

Подставим в формулу значения букв:

$$\begin{aligned}\lg \text{ЛД}_{50} &= \lg 10^{-2} + \frac{\lg 10}{2} - \lg 10 \left( \frac{0}{6} + \frac{1}{6} + \frac{2}{6} + \frac{5}{6} + \frac{6}{6} \right) = \\ &= -2 + 0,5 - \frac{14}{6} = -2 + 0,5 - 2,33 = -3,83.\end{aligned}$$

Следовательно, в 0,3 мл вируса, разведенного  $10^{-3,83}$  (или в  $10^{3,83}$  раз), содержится 1  $\text{ЛД}_{50}$  вируса. Далее рассуждаем так же, как и при расчете по Риду и Менчу. Если  $1\lg \text{ЛД}_{50} = -3,83$ , то  $\text{ЛД}_{50} = 10^{-3,83}$ , или  $1 : 10^{3,83}$ . Значит, в 0,3 мл вируса, разведенного  $1 : 10^{3,83}$ , содержится 1  $\text{ЛД}_{50}$ , а в 0,3 мл исходного вируса содержится таких доз больше в  $10^{3,83}$  раз, т. е.  $10^{3,83} \text{ ЛД}_{50}$ . Значит, титр вируса в нашей суспензии  $T = 10^{3,83} \text{ ЛД}_{50}/0,3 \text{ мл}$ , или  $T = (10 : 3)10^{3,83} \text{ ЛД}_{50}/\text{мл}$ , или  $T = (10 : 3)6761 \text{ ЛД}_{50}/\text{мл}$ , или  $T = 22\,537 \text{ ЛД}_{50}/\text{мл}$ .

Небольшое расхождение в величине титра вируса, рассчитанного по двум методам, произошло из-за отсутствия абсолютной точности обоих методов.

При титровании вирусов на лабораторных животных и учете реакции на заражение не по гибели животных графу «Пало» заменяют графикой «Положительно реагировало», и титр будет выражаться в  $\text{ИД}_{50}$  (вместо  $\text{ЛД}_{50}$ ). При титровании вирусов на куриных эмбрионах поступают так же, как и при титровании на лабораторных животных, но титр будет выражаться в  $\text{ЭЛД}_{50}$  или в  $\text{ЭИД}_{50}$ . При титровании вируса на культурах клеток результаты записывают в графы «ЦПЭ» и «Отсутствие ЦПЭ» (или «+» и «-»), титр выражается в  $\text{ЦПД}_{50}$ .

Некоторые вирусы обладают способностью агглютинировать эритроциты определенных видов животных при определенных условиях (разных для разных вирусов). Титр таких вирусов можно выразить в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ). За 1 ГАЕ принимается такая доза вируса, которая способна агглютинировать

около 50 % эритроцитов, содержащихся в том же, что и вирус, объеме 1%-ной суспензии отмытых эритроцитов. Для титрования вирусов по гемагглютинирующему действию используют или ряд пробирок, или ряд лунок на плексигласовых панелях. Последовательность операций здесь такая:

готовят 1%-ную суспензию отмытых эритроцитов животных того вида, эритроциты которых способны агглютинировать титруемый вирус;

готовят ряд последовательных 2-кратных разведений исследуемого вируссодержащего материала в равных объемах;

ко всем разведениям вируссодержащего материала добавляют 1%-ную суспензию отмытых эритроцитов в точно таких же объемах;

смеси выдерживают установленное время при определенной температуре;

интенсивность гемагглютинации в каждой лунке (пробирке) оценивают в крестах по следующей шкале (рис. 48):

| Вид осадка эритроцитов   | Оценка РГА в крестах |
|--|----------------------|
| Все эритроциты агглютинированы и образовали сплошной ровный слой («зонтик»)  | +++                  |
| Основная масса эритроцитов агглютинирована и образует «зонтик», но в центре ясно видно скопление небольшой части неагглютинированных эритроцитов   | ++                   |
| Основная масса эритроцитов неагглютинирована и осела в центре в виде скопления («пуговки»), но по периферии видно некоторое количество агглютинированных эритроцитов, т. е. небольшой «зонтик», создающий неровность краев «пуговки» | +                    |
| Все эритроциты неагглютинированы и осели в самом глубоком месте пробирки (центре) в виде «пуговки» с ровными краями  | —                    |

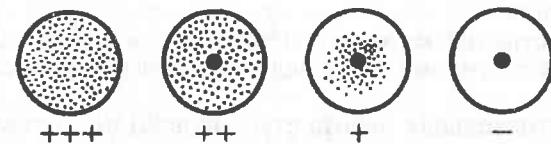


Рис. 48. Система оценки РГА в крестах

получить 1 ГАЕ. Так, если высшим разведением, еще дающим гемагглютинацию, оцениваемую на два креста, будет 1 : 128, это значит, что в объеме титрования вируса, разведенного в 128 раз, содержится 1 ГАЕ, а в таком же объеме титруемого материала таких единиц (ГАЕ) будет 128, т. е. титр вируса ( $T$ ) в данном материале равен 128 ГАЕ (табл. 9).

Поскольку супензию эритроцитов и вирусодержащий материал в разведениях берут в равных объемах, то безразлично, на какой объем будет приходиться 128 ГАЕ, ибо с возрастанием объема одного компонента во столько же раз увеличивается и объем другого. Поэтому соотношение количеств эритроцитов и вирионов в смеси вирусодержащего материала с супензией эритроцитов при изменении их объемов не нарушается, значит, не изменяется и число ГАЕ.

### Задания

1. Рассчитать титр вируса в единицах 50%-ного инфекционного действия по предложенным фактическим данным.
2. Определить титр вируса ньюкаслской болезни в аллантоисной жидкости в единицах гемагглютинирующго действия.

**Материальное обеспечение:** задачи на определение титра вируса в ЭД<sub>50</sub> по фактическим данным, выписанные на карточки (на каждого студента по одной карточке, всего не менее 10 вариантов задач); аллантоисная жидкость куриных эмбрионов, зараженных вирусом ньюкаслской болезни; 1%-ная супензия отмытых эритроцитов кур; физиологический раствор (изотонический раствор NaCl); плексигласовые панели с лунками; градуированные пипетки на 1 мл; резиновые груши; сосуды с дезраствором; карандаши для записи по стеклу.

### Примерный план занятия (4 ч)

1. Контрольные вопросы.
2. Демонстрация примера расчета титра вируса в ЭД<sub>50</sub> по фактическим данным.
3. Самостоятельная работа студентов по решению задач на расчет титра вируса в ЭД<sub>50</sub>.
4. Проверка правильности решения задачи каждым студентом и исправление выявленных ошибок.
5. Воспроизведение на доске (студентами в тетрадях) схемы определения титра вируса ньюкаслской болезни в РГА, разбор принципа и техники.
6. Демонстрация методики подготовки к работе плексигласовых панелей с лунками и последовательного переноса материала пипеткой.
7. Самостоятельная работа студентов: а) подготовка панелей, пипеток и материала; б) получение последовательных 2-кратных разведений вируса по 0,5 мл или по 0,2 мл; в) добавление

9. Пример титрования вируса в РГА

| Показатель                      | Номер лунок |     |     |      |      |      |       |       |       |        | Контроль эритроцитов |
|---------------------------------|-------------|-----|-----|------|------|------|-------|-------|-------|--------|----------------------|
|                                 | 1           | 2   | 3   | 4    | 5    | 6    | 7     | 8     | 9     | 10     |                      |
| Разведение вируса               | 1:2         | 1:4 | 1:8 | 1:16 | 1:32 | 1:64 | 1:128 | 1:256 | 1:512 | 1:1024 | —                    |
| Физиологический раствор, мл     | 0,5         | 0,5 | 0,5 | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5    | 0,5                  |
| Вирусодержащий материал, мл     | 0,5         | 0,5 | 0,5 | 0,5  | 0,5  | 0,5  | 0,5   | 0,5   | 0,5   | 0,5    | —                    |
| 1%-ная супензия эритроцитов, мл | —           | —   | —   | —    | —    | —    | —     | —     | —     | —      | —                    |
| Экспозиция                      | —           | —   | —   | —    | —    | —    | —     | —     | —     | —      | —                    |
| Результат                       | +++         | +++ | +++ | +++  | +++  | +++  | +++   | ++    | —     | —      | —                    |

\* Из последнего разведения 0,5 мл вирусодержащего материала удаляют в дезинфицирующий раствор.

1%-ной суспензии эритроцитов; г) учет результатов и их интерпретация.

8. Во время экспозиции переписывание в тетрадь (с доски или таблицы) схемы титрования антител к вирусу ньюкаслской болезни в РТГА.

9. Подведение итогов занятия.

10. Задание к следующему занятию.

#### Контрольные вопросы

1. Что такое титр вируса?
2. Каковы единицы измерения количества вируса?
3. Каков принцип определения титра вируса в БОЕ и ОOE?
4. В чем принцип определения титра вируса в единицах 50%-ного инфекционного действия?
5. Какова методика расчета титра вируса в единицах 50%-ного инфекционного действия?
6. В чем принцип определения титра вируса в ГАЕ?
7. Каковы достоинства и недостатки разных методов титрования вирусов?

**Методические указания.** 1. Занятие по титрованию вирусов можно провести как 4-часовое, а можно разделить на два 2-часовых (два метода титрования вирусов). Какое занятие должно быть первым, не имеет существенного значения.

2. Для занятия по расчету титра вируса в ЭД<sub>50</sub> необходимо заранее составить несколько (не менее 10) задач с фактическими данными. Целесообразно задачи составлять с разными тест-объектами и разным инфекционным действием, что способствует закреплению принципа в памяти студентов. Каждую задачу необходимо предварительно решить и иметь готовые ответы, что существенно облегчит проверку решений. Удобно каждую задачу давать студентам на карточках и под номерами.

3. По какому методу рассчитывать разведение, дающее 50%-ный эффект (по Керберу или по Риду и Менчу), не имеет принципиального значения, так как они одинаково широко используются в практике.

4. Для титрования вируса ньюкаслской болезни в РГА целесообразно использовать аллантоисную жидкость куриных эмбрионов, зараженных этим вирусом на занятии по куриным эмбрионам. В крайнем случае, можно использовать суспензию вирусвакцины против ньюкаслской болезни (более отчетливые результаты в РГА дает штамм Н).

5. Поскольку следующим занятием будет РТГА, для экономии времени можно дать схему РТГА, чтобы по ней студенты ставили реакцию на следующем занятии.

6. Переписывание схемы РТГА студентами способствует лучшему ее осмысливанию и запоминанию.

## Тема 8

### ТИТРОВАНИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСАМ В РЕАКЦИИ ТОРМОЖЕНИЯ (ЗАДЕРЖКИ) ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РТГА, РЗГА)

Антителами называются белки, образующиеся в организме теплокровного животного в ответ на парентеральное введение высокомолекулярных веществ с признаками генетической чужеродности для данного организма. Вещества, на введение которых образуются антитела, называются антигенами. Вирусы в подавляющем большинстве являются антигенами. Антитела способны вступать во взаимодействие с тем антигеном, в ответ на который они образовались (специфичность антител), и нейтрализовать его биологическую активность. Таким образом антитела защищают организм от инфекционных агентов, и в этом состоит биологический смысл их образования.

Антитела могут взаимодействовать с гомологичными антигенами не только *in vivo*, но и *in vitro*.

Обычно источником антител служит сыворотка крови (*serum*), и поэтому реакции взаимодействия антител с антигенами *in vitro* называются серологическими. Одной из простейших серологических реакций является реакция торможения (задержки) гемагглютинации (РТГА, РЗГА). Она основана на том, что антитела при встрече с гомологичным вирусом (антigenом) нейтрализуют не только его инфекционную, но и гемагглютирующую активность, так как блокируют рецепторы вирионов, ответственные за гемагглютинацию, образуя с ними комплекс антиген + антитело. Принцип РТГА состоит в том, что в пробирке смешивают равные объемы сыворотки крови и суспензии вируса и после экспозиции определяют, сохранился ли в смеси вирус, путем добавления суспензии эритроцитов. Агглютинация эритроцитов указывает на наличие, а отсутствие гемагглютинации – на отсутствие вируса в смеси. Исчезновение вируса из смеси вирус + сыворотка и расщепление является как признак взаимодействия антител сыворотки и вируса.

Но антитела с антигенами взаимодействуют в строго определенных количественных соотношениях. Поэтому, для того чтобы определенное количество вируса было лишено гемагглютирующей способности, требуется определенный минимум антител, а так как один из компонентов РТГА всегда неизвестен, приходится реакцию ставить в ряду пробирок с различными дозами антител и одинаковыми дозами вируса или наоборот. Это достигается тем, что берут или разные разведения сыворотки и одно и то же разведение вируса, или разные разведения вируса и одно и то же разведение сыворотки.

РТГА позволяет решать следующие задачи: определять титр антител к гемагглютинирующему вирусу в сыворотке; идентифицировать неизвестный гемагглютинирующий вирус по известным сывороткам; установить степень антигенного родства двух вирусов.

Достоинства РТГА: простота техники, быстрота, не требуется стерильной работы, специфичность, дешевизна. Недостаток: РТГА возможна только с гемагглютинирующими вирусами.

Принцип титрования антител в РТГА состоит в следующем:

готовят ряд последовательных (обычно 2-кратных) разведений исследуемой сыворотки в одинаковых объемах (чаще по 0,25 или 0,2 мл);

к каждому разведению добавляют такие же объемы гомологичного вируса в титре 4 ГАЕ;

смеси выдерживают определенное время при определенной температуре (для вируса ньюкаслской болезни 40–60 мин при комнатной температуре);

ко всем смесям добавляют равные объемы 1%-ной суспензии отмытых эритроцитов;

после экспозиции оценивают гемагглютинацию в каждой смеси в крестах.

В реакции предусматриваются контроли сыворотки, вируса и эритроцитов.

То наивысшее разведение сыворотки, которое еще полностью тормозит гемагглютинацию, принимается за показатель титра антител в этой сыворотке.

Схема РТГА приведена в таблице 10. В приведенном примере высшим разведением сыворотки, еще полностью тормозящим гемагглютинацию, является 1 : 32, и титр антител записывают Т = 1 : 32. Запомним, что титр антител в сыворотке всегда выражается наибольшим разведением сыворотки, еще дающим определенный эффект при взаимодействии с гомологичным антигеном. Титр антител представляет выражение их концентрации в сыворотке.

#### 10. Схема титрования антител к вирусу ньюкаслской болезни в РТГА

| Компоненты реакции          | Опыт                 |                                     |       |        |        |        |         |         |
|-----------------------------|----------------------|-------------------------------------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|
|                             | Разведение сыворотки |                                     |       |        |        |        |         |         |
|                             | 1 : 2                | 1 : 4                               | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 32 | 1 : 64 | 1 : 128 | 1 : 256 |
| Физиологический раствор, мл | 0,2                  | 0,2                                 | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2     | 0,2     |
| Сыворотка, мл               | 0,2                  | Последовательный перенос по 0,2*    |       |        |        |        |         |         |
| Вирус Т = 4 ГАЕ, мл         | 0,2                  | 0,2                                 | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2     | 0,2     |
| Контакт вируса с сывороткой |                      | 40–60 мин при комнатной температуре |       |        |        |        |         |         |
| Эритроциты 1%-ные, мл       | 0,4                  | 0,4                                 | 0,4   | 0,4    | 0,4    | 0,4    | 0,4     | 0,4     |
| Экспозиция                  |                      | 30–40 мин при комнатной температуре |       |        |        |        |         |         |
| Результат                   | —                    | —                                   | —     | —      | —      | ++     | +++     | +++     |

Надо иметь в виду, что чем ниже титр вируса, взятого в РТГА, тем меньшие концентрации антител можно обнаруживать в сыворотке (а значит, тем выше будет их титр). Титр вируса 4 ГАЕ — наиболее низкий, еще позволяющий получать уверенную гемагглютинацию, так как, будучи разведенным равным объемом сыворотки, он понижается в каждой лунке до 2 ГАЕ. Это значит, что при добавлении в каждую лунку 1%-ной суспензии эритроцитов в объеме, равном суммарному объему вируса и сыворотки, количество вирионов будет такое, которое необходимо для агглютинации всех 100 % эритроцитов (вспомним, что 1 ГАЕ вируса агглютинирует 50 % эритроцитов в 1%-ной суспензии).

Если взять вирус в титре ниже 4 ГАЕ, то возникнет опасность не получить явления гемагглютинации вообще, когда из-за случайных причин или технических погрешностей количество вирионов может оказаться меньшим, чем необходимо для агглютинации 50 % эритроцитов (а значит, и получения отчетливой гемагглютинации, оцениваемой не менее чем на 2 креста). Чтобы заведомо исключить такую вероятность, 1%-ную суспензию эритроцитов вносят в лунки в том же объеме, что и вирус (т. е. в объеме, равном половине жидкости в лунках), или повышают титр вируса до 8 ГАЕ (т. е. в 2 раза). В обоих случаях в каждой лунке окажется количество вируса, в 4 раза превышающее минимум, который еще удается обнаруживать методом гемагглютинации. Однако показатель титра антител при этом будет в 2 раза ниже. Поэтому указанные приемы используют в тех случаях, когда

Продолжение по горизонтали

| Компоненты реакции          | Контроль  |                                     |            |                  |     |     |
|-----------------------------|-----------|-------------------------------------|------------|------------------|-----|-----|
|                             | сыворотки | эритроцитов                         | ГАЕ вируса |                  |     |     |
|                             |           |                                     | 2          | 1                | 1/2 | 1/4 |
| Физиологический раствор, мл | 0,2       | 0,4                                 | 0,4        | 0,4              | 0,4 | 0,4 |
| Сыворотка, мл               | 0,2       | —                                   | —          | —                | —   | —   |
| Вирус Т = 4 ГАЕ, мл         | —         | —                                   | 0,4        | Перенос по 0,4** |     |     |
| Контакт вируса с сывороткой |           | 40–60 мин при комнатной температуре |            |                  |     |     |
| Эритроциты 1%-ные, мл       | 0,4       | 0,4                                 | 0,4        | 0,4              | 0,4 | 0,4 |
| Экспозиция                  |           | 30–40 мин при комнатной температуре |            |                  |     |     |
| Результат                   | —         | —                                   | +++        | ++               | —   | —   |

\* Из последней лунки удалить 0,2 мл.

\*\* Из последней лунки удалить 0,4 мл.

высокой точностью титра антител можно пренебречь. Модификация РТГА приведена в таблице 11.

На точность определения титра антител влияет также кратность разведения сыворотки. Чем она меньше, тем точнее будет определен титр антител. Но очень малые кратности неудобны технически, и потому обычно используют наименьшее из технически удобных 2-кратное разведение.

Следует всегда иметь в виду, что идущие в РТГА сыворотки необходимо предварительно освобождать от термостабильных неспецифических ингибиторов вирусов, обладающих способностью ингибировать гемагглютинирующие свойства вирусов. С этой це-

#### 11. Схема РТГА с уменьшенным вдвое количеством эритроцитов

| Компоненты реакции          | Опыт                 |       |       |        |        |        |         |         |
|-----------------------------|----------------------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|
|                             | Разведение сыворотки |       |       |        |        |        |         |         |
|                             | 1 : 2                | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 32 | 1 : 64 | 1 : 128 | 1 : 256 |
| Физиологический раствор, мл | 0,2                  | 0,2   | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2     | 0,2     |
| Сыворотка, мл               | 0,2                  |       |       |        |        |        |         |         |
| Вирус Т = 4 ГАЕ, мл         | 0,2                  | 0,2   | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2     | 0,2     |
| Контакт вируса с сывороткой |                      |       |       |        |        |        |         |         |
| Эритроциты 1%-ные, мл       | 0,2                  | 0,2   | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2     | 0,2     |
| Экспозиция                  |                      |       |       |        |        |        |         |         |
| Результат                   | —                    | —     | —     | —      | ++     | +++    | +++     | +++     |

#### Продолжение по горизонтали

| Компоненты реакции          | Контроль  |             |            |     |     |                |     |  |
|-----------------------------|-----------|-------------|------------|-----|-----|----------------|-----|--|
|                             | сыворотки | эритроцитов | ГАЕ вируса |     |     |                | 1/4 |  |
|                             |           |             | 2          | 1   | 1/2 |                |     |  |
| Физиологический раствор, мл | 0,2       | 0,4         | 0,2        | 0,2 | 0,2 | 0,2            | 0,2 |  |
| Сыворотка, мл               | 0,2       | —           | —          | —   | —   | —              | —   |  |
| Вирус Т = 4 ГАЕ, мл         | —         | —           | 0,2        |     |     | Перенос по 0,2 |     |  |
| Контакт вируса с сывороткой |           |             |            |     |     |                |     |  |
| Эритроциты 1%-ные, мл       | 0,2       | 0,2         | 0,2        | 0,2 | 0,2 | 0,2            | 0,2 |  |
| Экспозиция                  |           |             |            |     |     |                |     |  |
| Результат                   | —         | —           | +++        | ++  | —   | —              |     |  |

лью сыворотки обрабатывают одним из следующих веществ: углекислым газом ( $\text{CO}_2$ ), периодатом калия ( $\text{KIO}_4$ ), риванолом, каолином, активированным углем, экстрактом холерного вибриона и др.

Простейшим является метод освобождения сывороток от термостабильных неспецифических ингибиторов вирусов с помощью  $\text{CO}_2$ . Для этого сыворотку разводят дистиллированной водой 1 : 10 и пропускают через нее  $\text{CO}_2$  (из баллона или аппарата Киппа через тонкую трубку) так, чтобы газ пузырьками проходил через жидкость в течение 3—5 мин (пока сыворотка не помутнеет). Затем сыворотку центрифицируют 10—20 мин при 2000—2500 мин<sup>-1</sup> и собирают надсадочную жидкость (ингибиторы уходят в осадок). Для восстановления изотонии к сыворотке добавляют 8,5%-ный раствор хлористого натрия в объеме, равном 0,1 объема разведенной водой сыворотки. При использовании обработанной  $\text{CO}_2$  сыворотки надо помнить, что она уже разведена 1 : 11.

#### Задание

Определить в РТГА титр антител к вирусу ньюкаслской болезни в сыворотке крови кролика.

**Материальное обеспечение:** вирус ньюкаслской болезни с известным титром (от предыдущего занятия), сыворотка крови кролика, иммунизированного вирусом ньюкаслской болезни, обработанная  $\text{CO}_2$ , физиологический раствор  $\text{NaCl}$ , 1%-ная суспензия отмытых эритроцитов петуха; плексигласовые панели с дунками, пипетки градуированные на 1 мл, резиновые груши; аппарат Киппа.

#### Примерный план занятия (2 ч)

1. Самостоятельная работа студентов по схеме постановки РТГА (от предыдущего занятия): а) получение 2-кратных разведений сыворотки (по 0,2 мл); б) добавление вируса в титре 4 ГАЕ (по 0,2 мл); в) контакт вируса с сывороткой 40—60 мин.

2. Контрольные вопросы и объяснение преподавателя (во время контакта).

3. Демонстрация техники освобождения сывороток от неспецифических ингибиторов вирусов.

4. Продолжение самостоятельной работы студентов: а) розлив суспензий эритроцитов; б) экспозиция (30—40 мин).

5. Объяснение преподавателя (во время экспозиции).

6. Учет и запись результатов титрования антител в РТГА.

7. Ответы на вопросы.

#### Контрольные вопросы

- Что такое антигены и антитела?
- Что такое серологические реакции и для чего они используются?
- В чем принцип и использование РТГА?
- Что вы знаете о модификации РТГА?

**Методические указания.** Наиболее сложным и ответственным моментом является подготовка сыворотки. Важно, чтобы она надежно работала с вирусом. Самый доступный и полностью отвечающий назначению — вирус ньюкаслской болезни (лучше штамм Н). Он используется на занятиях по заражению куриных эмбрионов и по титрованию вирусов. Лучше сохранять в замороженном виде аллантоисную жидкость зараженных куриных эмбрионов, но можно использовать и лиофилизированную вирусвакцину против ньюкаслской болезни.

Чтобы иметь специфическую сыворотку к вирусу ньюкаслской болезни в большом количестве, берут 1—2 кроликов (не белых) и вводят им вирус ньюкаслской болезни в виде аллантоисной жидкости или разведенной вирусвакцины. Вводят внутрибрюшинно и внутримышечно (титр вируса должен быть как можно выше) примерно по 5 мл и через 12—14 дней иммунизацию повторяют. Спустя 7—10 дней кроликов тотально обескровливают, собирают кровь в стерильный сосуд и получают сыворотку. После проверки на активность (получается в пределах 1 : 160 — 1 : 1280) в РТГА сыворотку надо разлить по 1—2 мл и держать в морозильной камере. Активность сыворотки сохраняется несколько лет. В РТГА используют только разведенную сыворотку (не менее 1 : 10).

Вирус на занятие надо предварительно оттитровать и довести его титр до 4 ГАЕ.

Освобождение сывороток от термостабильных неспецифических ингибиторов вирусов имеет смысл провести демонстрационно для всей группы.

## Тема 9

### РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

Принцип реакции нейтрализации (РН) состоит в том, что в пробирке соединяют равные объемы сыворотки крови и суспензии вируса и после выдержки определяют, сохранился ли в смеси активный вирус. Делают это путем заражения смесью, чувствительной к взятому вирусу живой системы (биопроба на тест-объектах). Отсутствие действия вируса на тест-объект (отрицательная биопроба) при положительном контроле расценивается как свидетельство нейтрализации биологической активности вируса антителами сыворотки и, следовательно, гомологичности антител сыворотки и антигенов вируса. При этом чем больше в сыворотке антител к взятому вирусу, тем в более высоком разведении она еще способна нейтрализовать определенную (стандартную) дозу вируса (обычно 100 ЭД<sub>50</sub>). В случае же положительной биопробы считают, что нейтрализации вируса не произошло, так

как сыворотка не содержит антител к взятому вирусу. В зависимости от вида тест-объектов РН может быть поставлена на лабораторных животных, куриных эмбрионах или культурах клеток.

Так как антитела с гомологичными антигенами взаимодействуют в строго определенных количественных соотношениях и содержание антител в сыворотке всегда неизвестно, берут не одну, а ряд пробирок, в которых вирус и сыворотка находились бы в разных соотношениях. Для этого или к разным дозам (разведениям) сыворотки добавляют одну и ту же дозу вируса, или к разным дозам (разведениям) вируса добавляют одну и ту же дозу сыворотки. Эти две модификации РН технически выполняются неодинаково.

#### Постановка РН с разведениями сыворотки.

1. Готовят ряд последовательных 2-кратных разведений испытуемой сыворотки (SS) в одинаковых объемах. Количество разведений должно быть тем больше, чем выше предполагается титр антител в сыворотке.

2. Ко всем разведениям сыворотки добавляют такие же объемы гомологичного вируса (AS), взятого в таком титре, чтобы в каждый тест-объект при заражении попало бы ровно 100 ЭД<sub>50</sub> вируса.

3. Смеси вируса с сывороткой выдерживают определенное время при определенной температуре. Для разных вирусов эти показатели разные.

4. Каждой смесью в одинаковых объемах заражают равные группы чувствительных к взятому вирусу лабораторных живых систем (тест-объектов).

5. Учитывают результат действия вируса на тест-объекты в каждой группе (по разведениям сыворотки).

6. Рассчитывают разведение сыворотки, защищающее 50 % тест-объектов от действия 100 ЭД<sub>50</sub> вируса, используя метод Кербера или Рида и Менча.

7. Рассчитанное разведение сыворотки и принимают за показатель титра вируснейтрализующих антител в ней.

**Пример.** От кролика, иммунизированного вирусом ньюкаслской болезни, получена сыворотка крови. Требуется определить титр антител в ней.

Поскольку вирус ньюкаслской болезни убивает куриные эмбрионы, то РН можно поставить на куриных эмбрионах, используя их в качестве тест-объектов. Так как для заражения куриных эмбрионов в аллантоисную полость обычно вводят по 0,1—0,2 мл инфекционного материала, примем, что в каждый куриный эмбрион должно быть внесено по 0,2 мл смеси вируса с сывороткой, состоящей из равных объемов вируссодержащего материала и сыворотки. Чтобы в один куриный эмбрион было введено 100 ЭД<sub>50</sub> вируса в объеме 0,1 мл, титр вируса должен быть равен 1000 ЭД<sub>50</sub>/мл.

Для постановки РН готовят ряд последовательных 2-кратных разведений испытуемой сыворотки (SS) в одинаковых объемах. К каждому разведению SS добавляют такие же объемы вируссодержащего материала с вирусом ньюкаслской болезни (AS) в титре 1000 ЭД<sub>50</sub>/мл. Смеси выдерживают около 60 мин при комнатной температуре (таких условий требует вирус ньюкаслской болезни) и вводят четырем куриным эмбрионам по 0,2 мл каждой смеси. Результат заражения учитывают через 48—72 ч после гибели эмбрионов. За положительную РН принимают

8 Р. В. Белоусова и др.

ют отсутствие гибели эмбрионов, а за отрицательную — гибель их (значит, вирус в смеси не был нейтрализован антителами сыворотки).

Предположим, получили результат, представленный в таблице 12.  
Для расчета титра антител в сыворотке составим таблицу 13.

## 12. Результат реакции нейтрализации с разведением сыворотки

| Компоненты реакции    | Разведение сыворотки SS |       |       |        |        |        |         |         | Контроль вируса AS |
|-----------------------|-------------------------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|--------------------|
|                       | 1 : 2                   | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 32 | 1 : 64 | 1 : 128 | 1 : 256 |                    |
| SS + AS               | +                       | +     | +     | +      | +      | +      | —       | —       |                    |
|                       | +                       | +     | +     | +      | +      | —      | —       | —       |                    |
|                       | +                       | +     | +     | —      | —      | —      | —       | —       |                    |
|                       | +                       | +     | —     | —      | —      | —      | —       | —       |                    |
| Контроль сыворотки SS | +                       |       |       |        |        |        |         |         |                    |
|                       | +                       |       |       |        |        |        |         |         |                    |
|                       | +                       |       |       |        |        |        |         |         |                    |
|                       | +                       |       |       |        |        |        |         |         |                    |

Чтобы рассчитать, в каком разведении сыворотка защищает 50 % куриных эмбрионов от действия 100 ЭЛД<sub>50</sub> вируса ньюкаслской болезни, воспользуемся формулой Кербера (модификация наша)

$$\lg \mathbb{E}D_{50} = \lg D + \frac{\lg d}{2} - \lg d \sum \frac{r}{n},$$

где ЭД<sub>50</sub> — искомое разведение сыворотки; D — высшее разведение сыворотки, еще дающее 100%-ный эффект (в нашем примере это 1 : 4 = 10<sup>-0,6</sup>, при котором сыворотка защитила 100 % куриных эмбрионов от действия вируса); d — коэффициент разведения (он равен 2); r — количество положительно реагирующих (на сыворотку) куриных эмбрионов; n — количество тест-объектов (куриных эмбрионов) при испытании каждого разведения (в нашем примере по 4 эмбриона).

## 13. Результаты реакции нейтрализации с разведением сыворотки

| Разведение сыворотки         | Число куриных эмбрионов (n) | Доза заражения, мл | Выжило (+) (r) | Пало (—) |
|------------------------------|-----------------------------|--------------------|----------------|----------|
| 1 : 2 = 10 <sup>-0,3</sup>   | 4                           | 0,2                | 4              | 0        |
| 1 : 4 = 10 <sup>-0,6</sup>   | 4                           | 0,2                | 4              | 0        |
| 1 : 8 = 10 <sup>-0,9</sup>   | 4                           | 0,2                | 3              | 1        |
| 1 : 16 = 10 <sup>-1,2</sup>  | 4                           | 0,2                | 2              | 2        |
| 1 : 32 = 10 <sup>-1,5</sup>  | 4                           | 0,2                | 2              | 2        |
| 1 : 64 = 10 <sup>-1,8</sup>  | 4                           | 0,2                | 1              | 3        |
| 1 : 128 = 10 <sup>-2,1</sup> | 4                           | 0,2                | 1              | 3        |
| 1 : 256 = 10 <sup>-2,4</sup> | 4                           | 0,2                | 0              | 4        |

Подставим в формулу значения букв из таблицы и получаем

$$\begin{aligned} \lg \mathbb{E}D_{50} &= \lg 10^{-0,6} + \frac{\lg 2}{2} - \lg 2 \left( \frac{0}{4} + \frac{1}{4} + \frac{1}{4} + \frac{2}{4} + \frac{2}{4} + \frac{3}{4} + \frac{4}{4} \right) = \\ &= -0,6 + \frac{0,3}{2} - 0,3 \cdot \frac{13}{4} = -0,6 + 0,15 - 0,3 \cdot 3,35 = -0,45 - 0,975 = -1,425. \end{aligned}$$

Значит, сыворотка в разведении 10<sup>-1,425</sup> = 1 : 10<sup>1,425</sup> защищает 50 % куриных эмбрионов от действия 100 ЭЛД<sub>50</sub> вируса ньюкаслской болезни. По таблице антилогарифмов находим, что 1 : 10<sup>1,425</sup> = 1 : 26,5. Следовательно, титр антител в сыворотке Т=1 : 26,5.

## Постановка РН с разведением вируса (табл. 14).

### 14. Пример РН с разведением вируса

| Компоненты реакции | Разведение вируса |                  |                  |                  |                  |                  |                  | Контроль сывороток |
|--------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|--------------------|
|                    | 10 <sup>-1</sup>  | 10 <sup>-2</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 10 <sup>-4</sup> | 10 <sup>-5</sup> | 10 <sup>-6</sup> | 10 <sup>-7</sup> |                    |
| AS + SS            | +                 | +                | +                | —                | —                | —                | —                |                    |
|                    | +                 | +                | —                | —                | —                | —                | —                |                    |
|                    | +                 | —                | —                | —                | —                | —                | —                |                    |
|                    | —                 | —                | —                | —                | —                | —                | —                |                    |
| AS + SN            | +                 | +                | +                | +                | +                | +                | —                |                    |
|                    | +                 | +                | +                | +                | +                | —                | —                |                    |
|                    | +                 | +                | +                | +                | —                | —                | —                |                    |
|                    | +                 | +                | +                | —                | —                | —                | —                |                    |
| Контроль вируса    | +                 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                    |
|                    | +                 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                    |
|                    | +                 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                    |
|                    | +                 |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                    |

1. Готовят два ряда последовательных 10-кратных разведений вируса в одинаковых объемах (количество разведений зависит от титра вируса).

2. Ко всем разведениям первого ряда добавляют в том же объеме испытуемую сыворотку (в небольшом разведении).

3. Ко всем разведениям второго ряда добавляют в том же объеме нормальную сыворотку (SN), т. е. животного того же вида, в том же разведении и тем же методом освобожденную от неспецифических ингибиторов вирусов, что и испытуемая, но заведомо не содержащую антитела к взятому вирусу.

4. Все смеси вируса с испытуемой и нормальной сыворотками выдерживают установленное время при определенной температуре. Показатели эти разные для разных вирусов.

5. Каждой смесью в одинаковых дозах заражают равные группы тест-объектов, чувствительных к взятому вирусу (обычно культуры клеток, куриные эмбрионы или белые мыши).

6. Учитывают результат заражения по каждой группе тест-объектов, считая за положительный результат действие вируса, а за отрицательный — отсутствие действия.

7. Рассчитывают титр вируса в присутствии исследуемой сыворотки ( $T_{AS+SS}$ ) и титр вируса — в присутствии нормальной сыворотки ( $T_{AS+SN}$ ).

8. Определяют, во сколько раз  $T_{AS+SS}$  ниже, чем  $T_{AS+SN}$ . Это число называется индексом нейтрализации (ИН). Он тем больше, чем выше концентрация антител в испытуемой сыворотке.

Считается, что если ИН < 10, антител к использованному вирусу в испытуемой сыворотке нет, а если ИН > 100, антитела достоверно есть (ИН от 10 до 100 — сомнительный результат).

Если просчитать титры вируса в присутствии испытуемой, а также нормальной сывороток, то получим  $T_{AS+SS} = 10^2 \text{ ЭД}_{50}/\text{мл}$  и  $T_{AS+SN} = 10^5 \text{ ЭД}_{50}/\text{мл}$ . Отсюда

$$\text{ИН} = \frac{T_{AS+SN}}{T_{AS+SS}} = \frac{10^5}{10^2} = 10^3 = 1000.$$

Таким образом, РН с разведениями сыворотки позволяет определить титр антител в исследуемой сыворотке, показателем которого (а значит, и концентрации) служит разведение сыворотки, защищающее 50 % тест-объектов от действия 100 ЭД<sub>50</sub> вируса. РН с разведением вируса позволяет определить, во сколько раз антитела исследуемой сыворотки способны снизить титр вируса путем нейтрализации его инфекционной активности. Это абстрактное число, называемое индексом нейтрализации, также является показателем концентрации антител в сыворотке. Очевидно, что чем выше концентрация антител в сыворотке, тем выше будет индекс нейтрализации.

Реакция нейтрализации позволяет решить следующие задачи:

1) определить титр вируснейтрализующих антител в сыворотке, или индекс нейтрализации;

2) идентифицировать неизвестный вирус путем испытания его с различными заведомо известными сыворотками;

3) установить антигенные родства между вирусами. Степень антигенного родства R рассчитывают по формуле Арчетти

$$R\% = 100\sqrt{r_1 r_2},$$

где  $r_1 = \text{ИН}_1/\text{ИН}_2$ ;  $r_2 = \text{ИН}_3/\text{ИН}_4$ ; ИН<sub>1</sub> — индекс нейтрализации сывороткой к вирусу № 1 вируса № 2; ИН<sub>2</sub> — индекс нейтрализации сывороткой к вирусу № 1 вируса № 1; ИН<sub>3</sub> — индекс нейтрализации сывороткой к вирусу № 2 вируса № 1; ИН<sub>4</sub> — индекс нейтрализации сывороткой к вирусу № 2 вируса № 2.

Достоинства реакции нейтрализации: универсальность и высокая специфичность. Недостатки РН: большая трудоемкость, необ-

ходимость строго соблюдать стерильность материалов и инструментов, высокая стоимость живых тест-объектов, необходимость проведения математических расчетов, относительная длительность биопробы.

Следует всегда помнить, что сыворотки, идущие в РН, должны быть предварительно освобождены от термолабильных неспецифических ингибиторов вирусов путем прогревания (в разведенном не менее чем в 2 раза виде) в течение 30 мин при температуре от 56 до 63 °C в зависимости от вида животного, от которого получена сыворотка. Так, сыворотки лошади и морской свинки требуют прогревания при 56 °C, кур — при 58, крыс и кроликов — при 60 °C.

### Задание

Определить титр антител в сыворотке с помощью РН на культурах клеток.

**Материальное обеспечение:** фиксированные спиртом культуры клеток нормальные и с ЦПД, набранные так, что образуется реакция нейтрализации; микроскопы с осветителями и приспособлениями для исследования под микроскопом пробирок.

### Примерный план занятия (2 ч)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Самостоятельная работа студентов: а) оценка результатов РН на культурах клеток и сведение их в таблицу; б) расчет титра антител в сыворотке.
4. Подведение итогов занятия.
5. Задание к следующему занятию.

### Контрольные вопросы

1. В чем принцип реакции нейтрализации?
2. Какие модификации реакции нейтрализации вы знаете?
3. Какие задачи позволяет решать реакция нейтрализации?
4. В чем достоинства и недостатки реакции нейтрализации?

**Методические указания.** 1. Занятие требует предварительной подготовки. Поскольку на одном занятии всю РН поставить практически невозможно, имеет смысл использовать только заключительный этап постановки ее. Подготовить РН удобно на фиксированных культурах клеток. Для этого надо предварительно вырастить в пробирках (не менее 50) культуры клеток (любого типа) и примерно в половине из них заменить питательную среду на 70%-ный этиловый спирт (2–3 мл на пробирку), предварительно отмыть монолой физиологическим раствором. Такие фиксированные культуры клеток хорошо сохраняются на горизонтальных (с уклоном 5°)

штативах при комнатной температуре многие месяцы, оставаясь удобными для просмотра и мало отличаясь по виду от живых.

Вторую половину пробирок с культурами клеток надо заразить вирусом, способным вызвать ЦПД во взятых культурах клеток. После образования ЦПД эти культуры также надо зафиксировать в спирте. Подбирая комбинации пробирок с ЦПД и без него по группам, соответствующим предполагаемым разведениям сыворотки, легко составить набор, соответствующий произвольной схеме РН, снабдив пробирки соответствующими номерами. На одну учебную группу полезно иметь несколько таких наборов, имитирующих РН (набор на 6–8 студентов).

Кроме практического знакомства с РН такое лабораторное занятие дает дополнительную тренировку в оценке действия вирусов на культуры клеток.

2. При расчете титра антител надо обязательно перевести 2-кратные разведения сыворотки в 10-кратные с дробным показателем степени, помня, что  $2 = 10^{0.3}$ .

3. При использовании для расчета 50%-ного защитного действия сыворотки формул по Риду и Менчу или Керберу надо в отличие от расчета титра вируса за положительный эффект считать отсутствие действия вируса (отрицательную биопробу) и ничего не менять в самих формулах.

## Тема 10

### РЕАКЦИЯ ДИФФУЗИОННОЙ ПРЕЦИПИТАЦИИ В ГЕЛЕ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

Реакция диффузационной преципитации (РДП) в геле (синонимы: реакция гель-преципитации, реакция двойной диффузии в геле) основана на способности к диффузии в гелях антител и растворимых антигенов и отсутствии такой способности у комплекса антиген + антитело. Комплекс антиген + антитело образуется при контакте диффундирующих навстречу друг другу гомологичных антигена и антитела. Он осаждается на месте образования в толще геля в виде полосы преципитации.

Диффузией называется проникновение молекул одного вещества между молекулами другого, обусловленное тепловыми движениями молекул. Диффузия возможна в газах, жидкостях, твердых телах и гелях. Гелями называются такие дисперсные системы, в которых жидкая фаза распределена равномерно среди твердой. Обычно гели образуются высокомолекулярными соединениями, которые дают коллоидные растворы (золи), а при охлаждении превращаются в гели, имеющие некоторые свойства твердых тел. К таким соединениям относятся крахмал, желатин, агар-агар и др. В лабораторной практике очень часто используют агаровый гель.

Антитела сыворотки представляют собой молекулы иммуноглобулинов, которые, несмотря на довольно крупные размеры, способны диффундировать в агаровом геле. Антигены вирусов — это вирусные белки. Они могут находиться в составе вирионов, представляя так называемые корпскулярные антигены, крупные размеры которых не позволяют им диффундировать в агаровом геле. Но белки вирусов могут быть и в виде свободных молекул, образующихся в результате деструкции вирионов и (или) разрушения клеток, в которых они образовались. Это так называемые растворимые антигены. Они способны к диффузии в агаровом геле.

Методика постановки РДП в геле состоит в том, что в слое агарового геля делают несколько углублений (лунок) и в них наливают антигены и сыворотки так, чтобы антиген и сыворотка были в соседних лунках. Из лунок антигены и сыворотки начинают диффундировать в слой геля. Диффузия направлена во все стороны от каждой лунки. В пространстве между лунками, содержащими антиген и сыворотку, последние диффундируют навстречу друг другу (двойная диффузия в геле). Если они окажутся гомологичными, то образуется комплекс антиген + антитело, который к диффузии не способен вследствие более крупных размеров. Он оседает (преципитирует) на месте образования в виде беловатой полосы преципитации, которая хорошо заметна на фоне прозрачного геля (рис. 49). Если же диффундирующие друг другу навстречу антиген и сыворотка будут негомологичны, полосы преципитации не образуются. Этот принцип позволяет решать ряд практических задач, из которых важнейшие следующие:

обнаружение в сыворотке крови S антител, гомологичных данному антигену AS (например, вирусу), производится при помощи схемы РДП, показанной на рисунке 50. Если в сыворотке S содержатся антитела к антигену AS, между лунками S и AS образуется полоса преципитации, отсутствующая между лунками с контрольными компонентами SN и AS;

обнаружение в материале антигена A, гомологичного известным антителам сыворотки SS, производится по аналогичной схеме РДП (рис. 51). При наличии в исследуемом материале антигена, гомологичного антителам сыворотки SS, между A и SS должна образоваться полоса преципитации, отсутствующая между остальными лунками;

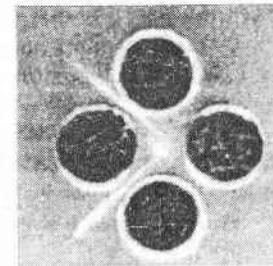


Рис. 49. РДП в агаровом геле на предметном стекле (по С. С. Марениковой)

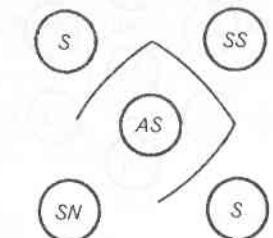


Рис. 50. Схема РДП для обнаружения антител

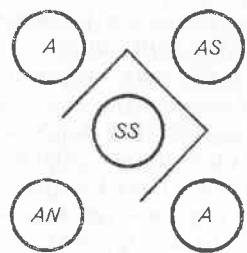


Рис. 51. Схема РДП для обнаружения антигена

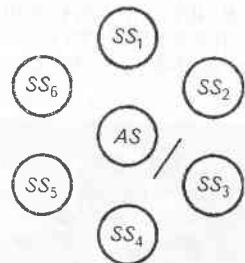


Рис. 52. Схема РДП для идентификации вируса

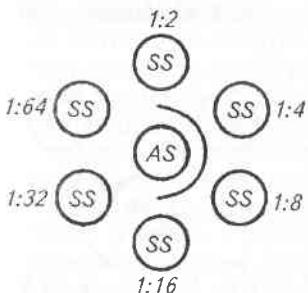


Рис. 53. Схема РДП для титрования антител

идентификация неизвестного вируса может быть произведена в РДП по схеме, показанной на рисунке 52. Здесь AS — неизвестный антиген; SS<sub>1</sub>...SS<sub>6</sub> — сыворотки, содержащие антитела к известным антигенам. Если полоса преципитации образовалась, например между лунками с AS и SS<sub>3</sub>, значит, исследуемый антиген гомологичен антителам сыворотки SS<sub>3</sub>;

титрование антител сыворотки. Здесь высшее разведение сыворотки, еще дающее преципитацию с гомологичным антигеном (в нашем примере 1 : 16), служит показателем титра антител в сыворотке SS (рис. 53).

В ветеринарной практике РДП часто используют для диагностики лейкоза крупного рогатого скота (под названием реакции иммунодиффузии — РИД) и инфекционной анемии лошадей. В обоих случаях задача сводится к обнаружению в сыворотках крови антител к соответствующим вирусам.

РДП может быть поставлена в чашках Петри, на предметных стеклах и в капиллярах. Наиболее широкое применение в практике нашел метод постановки РДП на предметных стеклах. Для его осуществления необходимо иметь обезжиренные предметные стекла, градуированные пипетки на 2—5 мл и пастеровские пипетки; трубку диаметром около 5 мм с острыми краями или специальный штамп, влажную камеру, ученическое перо или другой инструмент, пригодный для извлечения агарового геля из лунки, 1,0—1,5%-ный агар на физрастворе или фосфатном буфере с pH 7,2—7,4, антигены, сыворотки.

Большое значение имеет чистота агара, поэтому лучше всего пользоваться очищенным агаром Дифко. Специфические антигены и сыворотки должны быть в высоких титрах, обеспечивающих образование комплекса антиген + антитело в количестве, достаточном для образования четко видимой полосы преципитации.

**Постановка РДП на предметных стеклах.** Техника постановки состоит в следующем. Обезжиренные предметные стекла укладывают горизонтально на холодную поверхность (можно на стол). Пипеткой набирают 1,5—2 мл агара, нагретого до 60 °С, и зигзагообразным движением выливают его сначала по периметру предметного стекла, а потом быстро заполняют его середину, следя за тем, чтобы не образовывались пузыри и волны. Стекла с налитым агаром, слой которого должен быть 1,5—2 мм, оставляют лежать 5—10 мин для затвердения агара (превращения золя в гель). В слое застывшего агара вырезают лунки. Их количество и взаимное расположение определяются целью, с которой ставят РДП, но диаметр лунок должен быть около 5 мм, а расстояние между соседними лунками — 3—4 мм. Наиболее часто используют два типа расположения лунок, показанные на рисунках 50 и 51.

Для вырезания лунок можно использовать готовый штамп, представляющий собой трубочки с острыми краями, жестко скрепленные в соответствии с типом расположения и количеством лунок. Если готового штампа нет, можно воспользоваться любой трубкой подходящего диаметра, например гильзой от патрона к мелкокалиберной (калибр 5,6) винтовке. В этом случае целесообразно нарисовать карандашом на бумаге количество и взаимное расположение лунок и, подложив этот трафарет под стекло с агарам, по нему вырезать лунки. Остающийся в лунках агар можно извлечь иглой, ученическим пером или пастеровской пипеткой. У образовавшихся лунок дном служит стекло, а стенками — слой агара. Чтобы избежать подтекания жидкостей под агар, рекомендуют лунки заплавить, с тем чтобы они были полностью в слое агара. Для этого можно воспользоваться разными приемами. Один из них состоит в том, что пастеровской пипеткой в лунку вносят горячий (50—60 °С) агар и тотчас отсасывают его обратно. Соприкасаясь на короткое время с холодным дном и стенками лунки, агар успевает частично застыть и покрыть тонким слоем дно и стенки лунки. Схематически это выглядит так, как показано на рисунке 54. Однако если стекла хорошо обезжирены и застывший слой агара прочно сцеплен со стеклом (не «плывет» при наклоне), то и без дополнительной заливки лунок полосы преципитации образуются нормально.

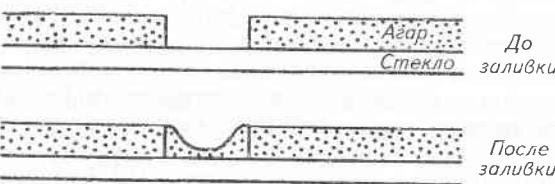


Рис. 54. Схема заливки лунок при постановке РДП

В подготовленные лунки заливают компоненты РДП (антигены и сыворотки). Нужно следить, чтобы компоненты ни в коем случае не переливались через край лунок, а только заполняли объем каждой. Для этого их лучше заливать мелкими каплями с помощью тонко оттянутых пастеровских пипеток.

После заливки компонентов РДП предметные стекла помещают во влажную камеру, чтобы предотвратить высыхание агара. В качестве влажной камеры можно использовать любую закрывающуюся емкость (эксикатор, чашку Петри и т. п.), в которую положены намоченные водой вата или фильтровальная бумага. Влажную камеру оставляют при комнатной температуре или ставят в термостат (в термостате диффузия идет быстрее, но незначительно).

Предварительный учет результатов РДП производят через 8–10 ч, основной — через 24 и окончательный — через 48 ч.

Постановка РДП в чашках Петри по технике принципиально не отличается от постановки на предметных стеклах, только тогда слой агара наливают толщиной до 3 мм, лунки делают большего диаметра и на большем расстоянии. Но в этом случае время учета отодвигается до 5–7 дней.

Методика РДП в капиллярах не нашла широкого применения в практике, и на ней мы останавливаться не будем.

Препараты РДП на предметных стеклах можно через 48–72 ч высушить и окрасить раствором амидного черного. Это позволяет сохранять препарат неопределенно долго и улучшает возможности фотографировать полосы преципитации.

Достиныства РДП следующие: простота техники постановки, быстрота получения ответа, нетребовательность к чистоте компонентов, не требуется стерильной работы, минимальная потребность в компонентах, пригодность для работы с любыми растворимыми антигенами, возможность документирования результата путем фотографирования.

Но все эти достоинства существенно умаляются ее основным недостатком — низкой чувствительностью. Тем не менее РДП достаточно широко пользуются в лабораторной диагностике вирусных болезней животных. Так, РДП ставят для обнаружения в патоматериале вирусов бешенства, инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, африканской чумы свиней, чумы собак и других болезней, а также для идентификации вирусов инфекционной анемии лошадей, адено-вирусов, респираторно-синцитиального вируса, вируса диареи крупного рогатого скота, для обнаружения в сыворотках крови антител к вирусам инфекционной анемии лошадей, респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота и в других случаях.

С целью повышения чувствительности РДП ее ставят с положительным контролем, т. е. заведомо положительным антигеном, и результат учитывают по загибам («усам») полос преципитации.

## Задание

Определить наличие в сыворотке крови кролика антител к вирусу ньюкаслской болезни.

**Материальное обеспечение:** стекла предметные обезжиренные; пипетки градуированные на 2 или 5 мл; пипетки Пастера; гильзы патрона калибра 5,6 мм; кювета 18 × 24 см с влажной бумагой или ватой, герметически закрывающаяся (полиэтиленом), или чашки Петри с влажной фильтровальной бумагой; перья ученические с ручками; 1,2%-ный агар на физрастворе; сыворотка крови кролика, иммунизированного вирусом ньюкаслской болезни; аллантоисная жидкость куриного эмбриона, зараженного вирусом ньюкаслской болезни; сыворотка кролика нормальная; аллантоисная жидкость куриного эмбриона нормального.

### Примерный план занятия (2 ч)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Демонстрация: а) залива агара на предметные стекла; б) изготовления лунок; в) внесения компонентов РДП в лунки.
4. Самостоятельная работа: а) залив агара на предметные стекла; б) изготовление лунок в слое агара; в) разлив компонентов РДП; г) снаряжение влажной камеры; д) зарисовка схемы РДП в тетрадях.
5. Учет результатов РДП и их внесение в схему РДП производятся на следующий день или на следующем занятии.
6. Задание к следующему занятию.

### Контрольные вопросы

1. В чем принцип РДП?
2. Какие задачи позволяет решать РДП?
3. В чем достоинства и недостатки РДП?

**Методические указания.** 1. Для РДП лучше всего пользоваться агаром Дифко, но при его отсутствии возможно использование и отечественного ( дальневосточного ) агара после его очистки.

Методика очистки агара описана в ряде практических руководств.

2. Получение антигенов и сывороток для РДП. В качестве специфического антигена (AS) можно использовать аллантоисную жидкость куриного эмбриона, зараженного вирусом ньюкаслской болезни. Для заражения пригодны любые вакцинны штаммы (B<sub>1</sub>, H, Ла-Сота, Бор), которые можно получить в лиофилизированном виде через соответствующие организации.

Нормальным антигеном в этом случае может служить аллантоисная жидкость незараженного куриного эмбриона. Для получения специфической сыворотки достаточно ввести 2–3 взрослым кроликам по 5–7 мл аллантоисной жидкости зараженного куриного эмбриона внутрибрюшинно и по 1,0 мл — внутривенно. Че-

рез 12–14 дней повторно ввести по 15 мл внутривенно по Безредка и по 5 мл внутримышечно.

Еще через 2 нед можно брать кровь путем пункции сердца или тотального кровопускания. Получив сыворотку крови кроликов, следует определить в ней титр антител в РТГА. Он должен быть не ниже 1 : 64.

Следует иметь в виду, что в сыворотках крови кроликов кроме специфических антител к вирусу ньюкаслской болезни будут содержаться и антитела к белкам аллантоинской жидкости, которые также способны давать в РДП полосы преципитации с аллантоинской жидкостью, что следует учитывать при постановке РДП.

Специфическую пару антиген + антитело, работающую в РДП, можно также взять из готовых диагностических наборов биофабричного производства (например, из набора для диагностики инфекционной анемии лошадей или набора для диагностики лейкоэза крупного рогатого скота).

3. Для лабораторного занятия по РДП необходимо сохранять агар в горячем состоянии относительно продолжительное время (20–30 мин). Удобно приготовленный 1,0–1,5%-ный агар с температурой 50–60 °C разлить во флакончики вместимостью примерно 50 мл и держать их в водяных банях из стеклянных банок вместимостью 0,5 л, заполненных горячей водой.

Для удержания флакончиков в воде на весу их привязывают за горлышко проволокой, концы которой лежат на верхнем крае банки.

## Тема 11

### РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ (ПАССИВНОЙ) ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) находит все более широкое применение в вирусологических исследованиях. Сущность реакции в том, что эритроциты, на которых предварительно адсорбированы антигены, приобретают способность агглютинироваться в присутствии гомологичных сывороток (антител). Этот феномен положен в основу метода обнаружения и титрования антител. Эритроциты при этом выполняют роль носителей со специфическими детерминантами, агглютинация которых происходит в результате реакции антиген — антитело и регистрируется визуально по характеру сформированного осадка. РНГА, таким образом, является специфической серологической реакцией (рис. 55).

Следует отличать РНГА от РГА. В РГА эритроциты склеиваются (агглютинируются) в результате взаимодействия их рецепторов с рецепторами вирусов (рис. 56), а в РНГА — комплексом антиген + антитело.

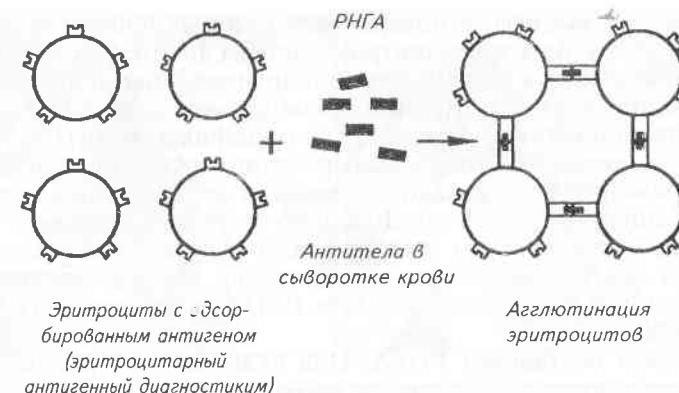


Рис. 55. Схема реакции непрямой гемагглютинации

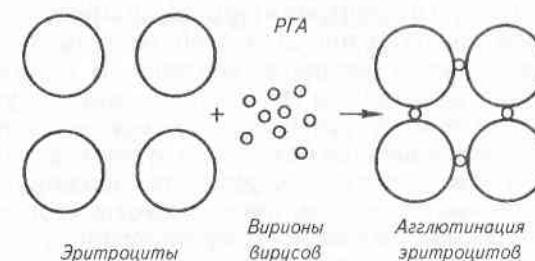


Рис. 56. Схема реакции гемагглютинации

РНГА была впервые предложена в конце 40-х годов XX столетия для выявления бактериальных инфекций. С вирусными антигенами РНГА впервые описали Бернет и Андерсон (1946). Дальнейшее развитие этот метод получил после работ Бойдена (1951), предложившего использовать в этой реакции эритроциты, обработанные танином.

Другой тип РНГА, в основу которого положена адсорбция антител на поверхности эритроцитов с последующей их агглютинацией в присутствии гомологичного антигена, предложен в 1956 г. С применением эритроцитов, сенсибилизованных антителами, открылась возможность быстрого обнаружения антигенов в различных субстратах. Эритроциты, к поверхности которыхочно присоединены антигены, называют эритроцитарным антигенным диагностикумом или эритроцитами, сенсибилизованными ан-

тигеном. Эритроциты, к поверхности которых прочно присоединены антитела, называют эритроцитарным антителным диагностиком или эритроцитами, сенсибилизованными антителами.

На основе этих двух принципиальных методических подходов разработаны и используются многие модификации РНГА.

Так, в качестве носителей (адсорбентов) антигенов или антител могут применяться не только эритроциты, но и частицы целлюлозы, бентонита, латекса и др. Довольно широко используют именно латекс вследствие его стандартности и технологичности изготовления диагностикума (проводят только стадию сенсибилизации). Реакция латексагглютинации (РЛА) проходит более четко, чем РНГА.

**Методика постановки РНГА.** Она включает: а) приготовление сенсибилизованных эритроцитов (подготовка эритроцитов, их фиксация, танизация и сенсибилизация); б) постановку главного опыта РНГА. Обычно в ветеринарных лабораториях ставят только главный опыт, а сенсибилизованные эритроциты готовят на предприятиях биологической промышленности.

Процесс приготовления сенсибилизованных эритроцитов (эритроцитарного диагностикума):

1) подготовка эритроцитов. Для этой цели наиболее широко применяют эритроциты барана и человека. В настоящее время чаще применяют эритроциты птиц — кур, индеек, уток; приготовленные на них диагностикумы быстрее оседают, что позволяет сократить сроки исследования без потери чувствительности. От соответствующего вида животного берут кровь общепринятым методом. Дефибринированную кровь трижды отмывают изотоническим раствором хлорида натрия при центрифугировании;

2) фиксация эритроцитов. Преимущество фиксированных эритроцитов в том, что они могут быть заготовлены впрок и длительное время храниться в суспензии, не подвергаясь гемолизу. Для фиксации эритроцитов чаще всего используют формальдегид, глутаровый или акриловый альдегиды. Методики фиксации эритроцитов различны. Одна из них: 50%-ную взвесь отмытых эритроцитов соединяют с равным объемом 50%-ного формалина и после двухчасового контакта при 37 °C с периодическим встряхиванием эритроциты 3 раза отмывают 0,15 M/NaCl (рН 7,2);

3) танизация эритроцитов. Механизм действия танина на эритроциты мало изучен. Однако при этом достигается главное — танинированные эритроциты обладают значительно большей сорбционной емкостью белков.

Танизацию формалинизованных эритроцитов осуществляют путем смешивания равных объемов 3%-ной взвеси эритроцитов и раствора танина (1 : 20 000). После 10—15-минутного контакта при 37 °C смесь центрифугируют, осадок трехкратно промывают фосфатным буфером (рН 7,2);

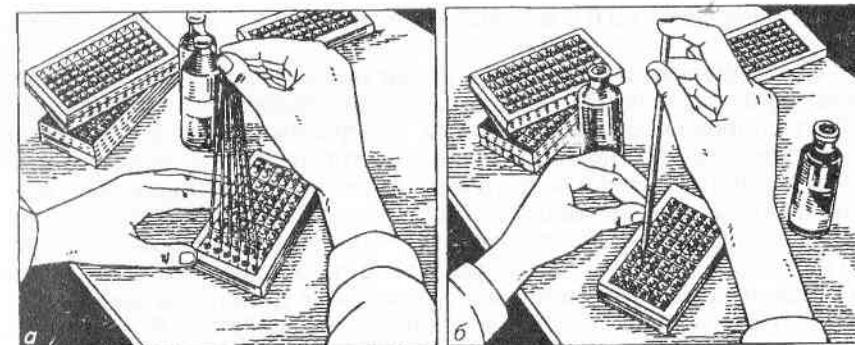


Рис. 57. Прибор Такачи для постановки серологических реакций микрометодом:  
а — перенос компонентов по рядам лунок; б — разлив компонентов специальной пипеткой

4) сенсибилизация эритроцитов. 10%-ную концентрацию эритроцитов на 0,15 M фосфатном буфере (рН 6,4) смешивают с равным объемом вирусодержащей жидкости. Смесь выдерживают 60 мин при 37 °C, периодически встряхивая, затем центрифугируют и 2—3 раза отмывают. Осадок сенсибилизованных эритроцитов разводят до 1%-ной концентрации в фосфатном буферном растворе (рН 7,2), содержащем 1% нормальной кроличьей сыворотки (для стабилизации эритроцитов). Полученные таким образом сенсибилизованные эритроциты используют в РНГА.

Необходимо отметить, что оптимальную сенсибилизирующую дозу антигена (для разных вирусов) подбирают эмпирически в пробных опытах сенсибилизации эритроцитов.

**Главный опыт РНГА.** Реакцию ставят в пробирках или в лунках плексигласовых панелей. В последнее время РНГА ставят микрометодом, используя аппарат Такачи (рис. 57), Титертек или автоматические пипетки (1-, 8-, 12-канальные) с изменяющимися объемами (рис. 58). Исследуемые и контрольные сыворотки прогревают при 56 °C 30 мин.

Исследуемую сыворотку разводят двукратно в объеме 0,2 мл физиологическим раствором с рН 7,2—7,4, содержащим 1% нормальной сыворотки кролика, затем к каждому разведению сыво-

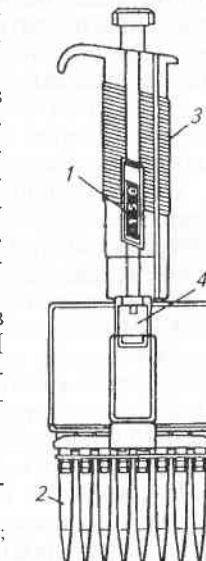


Рис. 58. Восьмиканальная автоматическая пипетка с изменяющимися объемами:

1 — регулятор объема; 2 — наконечники; 3 — рабочая рукоятка;  
4 — сбрасыватель наконечников

ротки добавляют по 0,2 мл сенсибилизированных антигеном эритроцитов.

Смесь встрихивают и выдерживают при комнатной температуре. Учет проводят через 2–3 ч по осаждению эритроцитов в контроле. Опыт сопровождают следующими контролями: 1) на спонтанную гемагглютинацию эритроцитарного антигена (сенсибилизированные эритроциты + физиологический раствор с 1% кроличьей сыворотки); 2) на активность сенсибилизированных эритроцитов (сенсибилизированные эритроциты + положительная сыворотка); 3) на специфичность сенсибилизированных эритроцитов (сенсибилизированные эритроциты + нормальная сыворотка или другая негомологичная для данного антигена сыворотка); 4) на отсутствие в сыворотках неспецифических гемагглютининов (исследуемые сыворотки + несенсибилизированные эритроциты).

Результаты реакции оценивают по четырехбалльной шкале: (+++) — агглютинированные эритроциты образуют перевернутый «зонтик» с неровными краями; (++) — по краю агглютинированных эритроцитов намечается тонкое кольцо из неагглютинированных эритроцитов; (+) — по краю агглютинированных эритроцитов располагается широкое кольцо из неагглютинированных эритроцитов; (–) — эритроциты оседают на дно в виде диска или колечка — отрицательный результат.

При положительной реакции эритроциты равномерно распределяются по дну пробирки или луночки в виде зонтика, а при отрицательной — оседают в виде компактного осадка или колечка в центре луночки. Достоверные результаты получают при отсутствии гемагглютинации: испытуемой сыворотки с несенсибилизированными эритроцитами, диагностикума с заведомо отрицательной сывороткой, при положительной реакции диагностикума с заведомо положительной сывороткой.

За титр антител в сыворотке принимают наибольшее ее разведение, которое еще вызывает агглютинацию сенсибилизированных эритроцитов (схема РНГА приведена в табл. 15).

Ветеринарная биологическая промышленность выпускает наборы эритроцитарных диагностикумов к инфекционному ринотрахеиту, ящуру и адено-вирусной инфекции крупного рогатого скота. К наборам прилагается наставление по практическому применению в условиях диагностической лаборатории.

Таким образом, РНГА позволяет решать следующие диагностические задачи: а) обнаруживать антитела и определять их титр в сыворотках крови. Для этого используют эритроциты, сенсибилизированные вирусом; б) обнаруживать и идентифицировать вирусный антиген. Для этого используют эритроциты, сенсибилизированные антителами.

Достоинства РНГА: высокая чувствительность (по этому показателю она превосходит РДП, РСК и близка к иммуноферментному методу), простота техники постановки и быстрота ответа (через

15. Схема РНГА для определения титра антител в сыворотке

| Компоненты                              | Разделение сыворотки |        |                   |        |                         |         | Компоненты | Контроль |                                  |     |     |     |
|---|----------------------|--------|-------------------|--------|-------------------------|---------|------------|----------|----------------------------------|-----|-----|-----|
|   | 1 : 10               | 1 : 20 | 1 : 40            | 1 : 80 | 1 : 160                 | 1 : 320 | 1 : 640    | 1 : 1280 | 1                                | 2   | 3   | 4   |
| Физиологический раствор, мл             | —                    | 0,2    | 0,2               | 0,2    | 0,2                     | 0,2     | 0,2        | 0,2      | Сенсибилизированные эритроциты   | 0,2 | 0,2 | 0,2 |
| Испытуемая сыворотка, мл                | 0,2                  | —      | Перенос по 0,2 мл | —      | Физиологический раствор | 0,2     | —          | —        | —                                | —   | —   | —   |
| Сенсибилизированные эритроциты          | 0,2                  | 0,2    | 0,2               | 0,2    | 0,2                     | 0,2     | 0,2        | 0,2      | Сыворотка положительная          | —   | 0,2 | —   |
| Учет результатов                        | +++                  | +++    | +++               | +++    | +++                     | +++     | —          | —        | Сыворотка отрицательная          | —   | —   | —   |
| Вывод: титр антител в сыворотке 1 : 160 | +++                  | +++    | +++               | +++    | +++                     | +++     | —          | —        | Сыворотка исследуемая            | —   | —   | 0,2 |
|   |                      |        |                   |        |                         |         |            |          | Эритроциты несенсибилизированные | —   | —   | —   |
|   |                      |        |                   |        |                         |         |            |          | Учет результатов                 | +++ | —   | —   |

2–3 ч). Однако есть и недостатки. Это трудности в приготовлении стабильных эритроцитарных диагностикумов (большая зависимость от чистоты компонентов, необходимость подбора режима сенсибилизации для каждого вида вируса и т. д.).

### Задание

Определить титр антител в сыворотке крови теленка к аденовирусу крупного рогатого скота.

**Материальное обеспечение:** эритроцитарный антигенный диагностикум для диагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота или инфекционно-диагностический ринотрахея; исследуемые сыворотки крови крупного рогатого скота; разбавитель для РНГА; пипетки на 1 мл; пробирки; аппараты Такачи, Титертек или автоматические пипетки (1-, 8-, 12-канальные) с изменяющимися объемами; сыворотки крови; изотонический раствор NaCl; дистиллированная вода; фильтровальная бумага; сосуд с дезраствором; плексигласовые панели с лунками.

### Примерный план занятия (2 ч)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Демонстрация: а) наборов диагностикумов, выпускаемых биологической промышленностью для РНГА; б) методики постановки РНГА микрометодом с использованием аппаратов Такачи и Титертек.
4. Самостоятельная работа студентов: а) подготовить микропанели, петли и пипетки для РНГА; б) поставить РНГА с целью определения титра антител в сыворотке крови теленка к вирусу адено- или ИРТ; в) провести учет результатов реакции.
5. Подведение итогов занятия.
6. Задание к следующему занятию.

### Контрольные вопросы

1. В чем отличие непрямой гемагглютинации от прямой?
2. В чем принцип РНГА?
3. Каково практическое использование РНГА?

**Методические указания.** На данном занятии желательно, чтобы студенты ставили РНГА микрометодом с помощью аппаратов Такачи и Титертек, в качестве компонентов использовать наборы, выпускаемые биопромышленностью для РНГА.

При отсутствии вышеуказанного можно ставить РНГА макрометодом с использованием плексигласовых панелей с лунками. В отношении компонентов реакции придется прибегать к имитации. Для этого в качестве используемой положительной сыворотки взять вирус ньюкаслской болезни (любой вакциинный штамм), в качестве эритроцитарного антигенного диагностикума — эритроциты петуха.

## Тема 12

### РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ (РИФ) И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

В основе реакции иммунофлуоресценции (РИФ)\* лежит явление люминесценции. Сущность его в том, что, поглощая различные виды энергии (световую, электрическую и др.), атомы некоторых веществ переходят в возбужденное состояние, а затем, возвращаясь в исходное состояние, выделяют поглощенную энергию в виде светового излучения.

Люминесценция наблюдается в виде флуоресценции. Флуоресценция — свечение, возникающее в момент облучения возбуждающим светом и прекращающееся сразу (от  $10^{-9}$  до  $10^{-7}$  с) после его окончания.

Многие вещества живых организмов обладают собственной флуоресценцией (так называемой первичной, или аутофлуоресценцией), однако интенсивность ее очень мала. Вещества, обладающие интенсивной первичной флуоресценцией и использующиеся для придания флуоресцирующих свойств нефлуоресцирующим веществам, получили название флуорохромы (флуоресцирующие красители). Такая наведенная флуоресценция называется вторичной. Флуорохромы очень широко используют в люминесцентной микроскопии для обработки биологических объектов, имеющих слабую первичную флуоресценцию.

Люминесцентное свечение подчиняется правилу Стокса, согласно которому свет флуоресценции имеет большую длину волны, чем свет возбуждения. Так, если возбуждающий свет синий, то свет флуоресценции — зеленый. Это позволяет отфильтровывать сравнительно слабую флуоресценцию от более ярких возбуждающих лучей.

Для возбуждения флуоресценции при люминесцентной микроскопии используют ближнюю ультрафиолетовую или сине-фиолетовую часть спектра. Люминесцентная микроскопия осуществляется с помощью специальных микроскопов. В настоящее время в лабораториях используют люминесцентные микроскопы МЛ-1, МЛ-2, МЛ-3 и люминесцентные микроскопы серии «Люмам» (рис. 59).

В люминесцентном микроскопе используют систему светофильтров для выделения сине-фиолетовой части спектра (ФС-1, СС-4 + СС-8), теплозащитные фильтры для предохранения оптики от перегревания и выцветания препаратов (СЗС-14, СЗС-7, БС-8, кювет с водой или раствором медного купороса) и запирающий фильтр на окуляре для снятия возбуждающего света и про-

\*Реакция иммунофлуоресценции (РИФ), или метод флуоресцирующих антител (МФА).

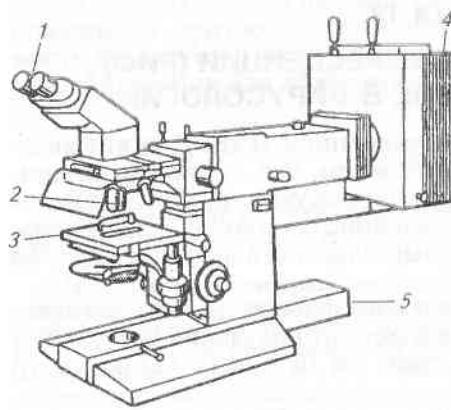


Рис. 59. Общий вид люминесцентного микроскопа «Люмам Р-2»:

1 — бинокуляр; 2 — объективы; 3 — предметный столик; 4 — кожух осветительной лампы; 5 — основание

телей проводят люминесцентную микроскопию препаратов в падающем свете, поскольку он имеет ряд преимуществ перед освещением препарата снизу, а именно: наименьшая потеря света, идущего от источника света, лучший спектральный состав возбуждающего света, незначительное попадание прямого света в глаза исследователя и увеличение освещенности объектов.

При люминесцентной микроскопии используют нефлуоресцирующее иммерсионное масло высокого качества. Иногда применяют его заменитель — диметилфталат, длительное использование которого может привести к порче объективов.

В вирусологической практике люминесцентную микроскопию используют в двух основных методах: флуорохромировании и методе флуоресцирующих антител.

Флуорохромирование — это обработка препарата флуорохромом с целью увеличения силы и контрастности свечения препарата.

Отечественная промышленность выпускает специальные наборы флуорохромов. Наиболее широко применяют акридиновую группу (акридин оранжевый, акридин желтый и др.) и тиозоловую группу (примулин), флуоресцеин-изотиоционат (ФИТЦ). Флуорохром чаще всего используют в водных растворах очень низкой концентрации (от 1 : 1000 до 1 : 1 000 000). Метод флуорохромирования может быть использован при изучении некоторых вирусов (оспы, болезни Борна, адено-вирусной инфекции и др.).

Наибольший интерес представляет акридиновый оранжевый, который вызывает полихроматическую флуоресценцию нуклеиновых кислот. Так, при обработке препаратов этим флуорохромом

пускания света люминесценции (ЖС-18, ЖС-3). Люминесцентный микроскоп устанавливают в затемненной части комнаты на прочном столе. Следует исключить вибрацию, которая создаст помехи, что особенно оказывается при микрофотографировании. В помещении должна быть хорошая вентиляция, устраняющая вредные газы от источника света. Лампа достигает полной силы света через 5—10 мин после включения, если сила тока при работе равна 4—5 А. Повторное включение лампы возможно только после ее охлаждения.

Большинство исследователей проводят люминесцентную микроскопию препаратов в падающем свете, поскольку он имеет ряд преимуществ перед освещением препарата снизу, а именно: наименьшая потеря света, идущего от источника света, лучший спектральный состав возбуждающего света, незначительное попадание прямого света в глаза исследователя и увеличение освещенности объектов.

При люминесцентной микроскопии используют нефлуоресцирующее иммерсионное масло высокого качества. Иногда применяют его заменитель — диметилфталат, длительное использование которого может привести к порче объективов.

В вирусологической практике люминесцентную микроскопию используют в двух основных методах: флуорохромировании и методе флуоресцирующих антител.

Флуорохромирование — это обработка препарата флуорохромом с целью увеличения силы и контрастности свечения препарата.

Отечественная промышленность выпускает специальные наборы флуорохромов. Наиболее широко применяют акридиновую группу (акридин оранжевый, акридин желтый и др.) и тиозоловую группу (примулин), флуоресцеин-изотиоционат (ФИТЦ). Флуорохром чаще всего используют в водных растворах очень низкой концентрации (от 1 : 1000 до 1 : 1 000 000). Метод флуорохромирования может быть использован при изучении некоторых вирусов (оспы, болезни Борна, адено-вирусной инфекции и др.).

Наибольший интерес представляет акридиновый оранжевый, который вызывает полихроматическую флуоресценцию нуклеиновых кислот. Так, при обработке препаратов этим флуорохромом

дезоксирибонуклеиновая кислота ярко флуоресцирует желто-зеленым цветом, а рибонуклеиновая кислота — рубиново-красным.

Препараты для метода флуорохромирования можно готовить двумя способами:

а) на свежий мазок-отпечаток (из органов, соскобов со слизистых оболочек) или суспензии инфицированных клеток наносят 1—2 капли рабочего раствора (1 : 10 000) акридинового оранжевого, накрывают покровным стеклом. Приготовленный таким образом свежий (в течение 10—20 мин после его приготовления) препарат рассматривают в люминесцентном микроскопе;

б) мазки-отпечатки, полученные из патологического материала, или инфицированные культуры клеток (на покровных стеклах) фиксируют 96°-ным этиловым спиртом в течение 15—30 мин, промывают раствором Хенкса, наносят на препарат 1—2 капли раствора акридинового оранжевого (1 : 10 000), через 5—10 мин накрывают покровным стеклом и исследуют.

В результате окрашивания ДНК, содержащаяся в ядрах клеток, дает изумрудно-зеленое свечение, РНК, находящаяся в цитоплазме, светится красным или оранжевым цветом. В препаратах ДНК-содержащих вирусов, например адено-вируса, вирусный материал светится зеленым цветом в ядре в виде гранул различной величины. При наличии в препарате РНК-содержащего вируса, например вируса гриппа, вирусный материал обнаруживается в виде ярко-красных гранул в цитоплазме клеток.

Чтобы различить происхождение ДНК или РНК (клеточное или вирусное), применяют обработку препаратов 0,5%-ным раствором РНК-азы или ДНК-азы в течение 5—10 мин или облучение УФ-лучами. При этом свечение клеточных РНК или ДНК сразу исчезает, а вирусные продолжают светиться еще 20—30 мин. Это служит доказательством специфичности вирусных нуклеиновых кислот.

Метод простого флуорохромирования несложен, однако в большинстве случаев он не дает возможности полно дифференцировать возбудителей болезней.

**Реакция иммунофлуоресценции (РИФ) или метод флуоресцирующих антител (МФА).** Принцип данного метода заключается в том, что антитела, соединенные с флуорохромом, сохраняют способность вступать в специфическую связь с гомологичным антигеном. Образующийся комплекс антиген + антитело обнаруживают под люминесцентным микроскопом по характерному свечению благодаря присутствию в нем флуорохрома. Таким образом, с помощью РИФ реализуется непосредственный контроль за первой фазой серологических реакций, причем специфичность метода сочетается с высокой чувствительностью.

Для получения антител используют высокоактивные гипериммунные противовирусные сыворотки, максимально освобожденные от гетероантител. Из таких сывороток выделяют гомогенные

фракции, содержащие антитела, которые метят флуорохромом. В качестве флуорохрома наиболее часто используют ФИТЦ — флуоресцеин-изотиоционат (зеленое свечение) и РСХ-родамина сульфохлорид (красное свечение). Антитела, меченные флуорохромом, называют коньюгатом.

Хранить коньюгаты рекомендуется при температуре минус 20 °С или при более низких температурах в герметически закрытых сосудах. Можно также консервировать коньюгат путем добавления тиомерсала 1 : 10 000 и хранить при температуре 4 °С. Флуоресцирующие сыворотки или их глобулиновые фракции длительное время сохраняют специфическую активность в лиофилизированном состоянии.

При использовании каждой серии коньюгата необходимо опытным путем проверить рабочее разведение, так как оно зависит не только от качества флуоресцирующей сыворотки, но и от освещения препарата в люминесцентном микроскопе. С этой целью микроскопируют препараты, содержащие специфический антиген, окрашенные коньюгатом, взятым в разных разведениях (обязательно на 1—2 разведения выше и ниже рабочего разведения, указанного на этикетке препарата), выбирают наибольшее разведение, дающее интенсивное свечение (красящий титр), и удаивают его.

**Приготовление препаратов.** Для исследования РИФ используют мазки, отпечатки, гистологические срезы и культуры клеток.

Предметные стекла, применяемые для приготовления препаратов, должны быть тонкими, чистыми, обезжиренными, бесцветными и не иметь царапин. Для этого их промывают в нейтральных детергентах, прополаскивают в дистиллированной воде и сохраняют в спирте или смеси спирта с эфиром. Перед употреблением чистые стекла проводят через пламя горелки и охлаждают. Все надписи делают простым карандашом на специально подготовленной матовой площадке у края предметного стекла. Надписи восковым карандашом при фиксации препаратов растворяются и образуют на стекле восковую пленку, мешающую обработке мазков флуоресцирующими сыворотками.

Мазки готовят из смызов и других жидкостей. Мазки-отпечатки готовят из тех органов и тканей, в которых предполагается наибольшая концентрация вируса. Для диагностики бешенства применяют мазки-отпечатки из мозга; ринопневмонии лошадей, гепатита собак — из печени; гриппа, инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, аденоирической инфекции и других — мазки из носовых смызов, а также отпечатки слизистых оболочек носовой полости, бронхов, трахеи; оспы — мазки из везикул, папул.

Для выявления вируса гриппа или других возбудителей респираторных болезней очищают носовой ход от слизи, берут мазок

ватным тампоном, который помещают в пробирку с забуференным физиологическим раствором или питательной средой для культур клеток (3 мл). Тампон встуживают, отжимают и удаляют, раствор центрифицируют и из осадка делают мазки диаметром 1,5 см каждый на стекле. Исследование слизистых оболочек, выстланых многослойным плоским эпителием, например глотки, конъюнктивы, влагалища, требует приготовления соскобов после очистки слизистой оболочки. Поверхностные ороговевшие клетки таких эпителиев обладают сильной аутофлуоресценцией и не годятся для исследования. Поэтому препараты готовят из клеток скарифицированных участков, содержащих базальные слои эпителия.

Из органов готовят отпечатки, прикладывая быстрым движением предметное стекло к поверхности органа. Отпечаток должен быть тонким и равномерным.

Мазки-отпечатки подсушивают на воздухе, затем фиксируют и сохраняют в холодильнике до исследования (при минус 4—70 °С).

Для контроля таким же образом готовят препараты из органов здоровых животных.

Если вирусы предварительно накапливают в культурах клеток, то последние выращивают на узких пластинках покровного или такого же размера обрезках предметного стекла. Извлеченные в разные сроки после заражения из пробирок с культурой клеток, эти пластинки осторожно отмывают от питательной среды физиологическим раствором или фосфатным буфером. Затем сушат при комнатной температуре на воздухе на чистом листе фильтровальной бумаги, положив клеточным слоем вверх, и фиксируют.

Наилучший фиксатор для вирусных антигенов — чистый ацетон, охлажденный до минус 10 — минус 15 °С; можно также использовать метиловый спирт. Фиксируют препараты 10—20 мин. Продолжительность и температура фиксации могут колебаться в зависимости от вида вируса. При особо опасных инфекциях время фиксации увеличивают. Например, при работе с уличным вирусом бешенства препараты фиксируют не менее 4 ч.

Различают два основных способа применения флуоресцирующих антител: прямой и непрямой (рис. 60).

При использовании прямого, или одноступенчатого, способа (Weller и Coons, 1954) для индикации различных вирусных антигенов применяют соответствующие каждому антигену флуоресцирующие антитела. Непосредственно на препарат наносят коньюгат и выдерживают в течение 20—60 мин при температуре 37 °С во влажной камере, хотя некоторые исследователи предпочитают проводить эту процедуру при 4 °С, удлиняя время. Препараты отмывают физиологическим раствором (рН 7,2—7,5) от не связанных с антигеном коньюгата. Затем их подсушивают на воздухе, наносят нефлуоресцирующее масло и исследуют под микроскопом.

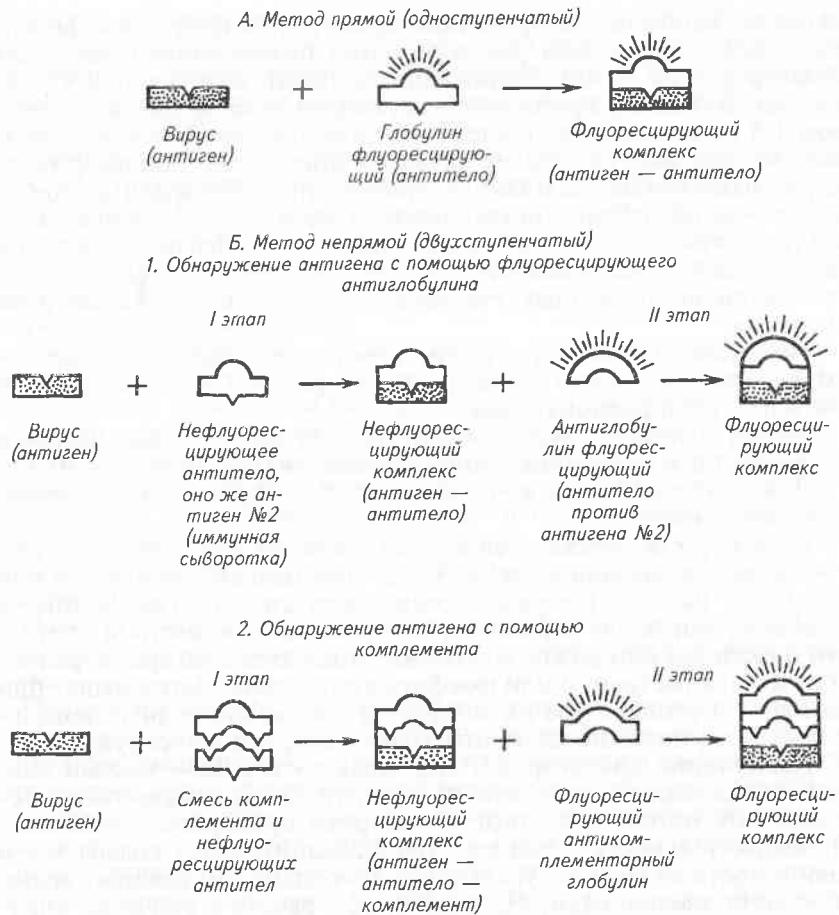


Рис. 60. Схема вариантов метода флуоресцирующих антител

Результаты учитывают по интенсивности и специфичности флуоресценции исследуемого объекта с учетом структурных особенностей по следующей шкале: (++++) — яркая, сверкающая флуоресценция изумрудно-зеленого цвета; (++) — яркая флуоресценция зеленого цвета; (++) — слабая флуоресценция желтовато-зеленого цвета; (+) — очень слабая флуоресценция неопределенного цвета; (−) — объект не флуоресцирует. В качестве обязательного контроля берут препараты из материалов, не содержащих искомый вирус (нормальные тканевые культуры, отпечатки органов здоровых животных и т. п.). Их обрабатывают так же, как опытные препараты, и одновременно с ними (рис. 61).

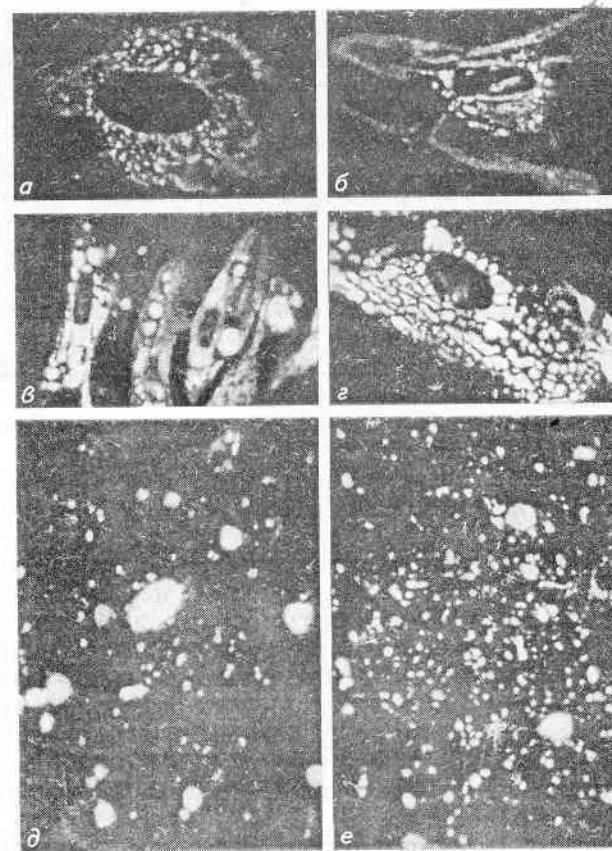


Рис. 61. Выявление прямой РИФ антигена вируса бешенства в культуре клеток (а, б, в, г) и в отпечатках мозга зараженных мышей (д, е) (препараты Е. В. Клюевой)

С целью уменьшения неспецифической фоновой флуоресценции исследуемых препаратов применяют так называемое контрастирование неспецифического свечения. Для этого исследуемые мазки обрабатывают смесью специфической сыворотки, меченной ФИТЦ (и поэтому излучающей зеленый свет), и альбумина нормальной сыворотки лошади или быка, меченного родамином (излучающим красный свет). В таком препарате специфический антиген будет светиться зеленым, а фон препарата (свободные от вируса клетки и т. п.), адсорбируя альбумин, окрашивается в оранжево-красный или бурый цвет (контрольный по отношению к зеленому).

Выпускаемые нашими биофабриками сухие специфические иммунные люминесцирующие сыворотки и альбумины перед окрашиванием мазков растворяют в дистиллированной воде в объеме, указанном на этикетке ампулы. Хорошие препараты должны легко и без осадка растворяться. Если при этом препарат мутнеет или образуется осадок, то от мути или осадка освобождаются центрифугированием при  $6000 \text{ мин}^{-1}$ . Растворенными препаратами, сохраняемыми при  $4^\circ\text{C}$ , можно пользоваться в течение нескольких недель. Перед обработкой исследуемых препаратов готовят рабочую смесь специфического конъюгата с люминесцирующим альбумином. Наиболее выгодное соотношение между флуоресцирующим иммунным глобулином, меченным ФИТЦ, и альбумином, конъюгированным с родамином, приходится определять опытным путем для каждой новой серии любого из этих препаратов, ибо характеристика их активности с момента выпуска до изменения может изменяться.

Прямой метод позволяет выявить и идентифицировать антиген. Для этого нужно иметь на каждый вирус флуоресцирующую сыворотку.

При непрямом, или двухступенчатом, способе (см. рис. 60, б) вначале антиген обрабатывают гомологичными нефлуоресцирующими антителами (1-я ступень). Образуется комплекс антиген + антитело, для обнаружения которого применяют флуоресцирующую антивидовую сыворотку, соответствующую виду животного — продуцента гомологичных антител. Антивидовые сыворотки получают, иммунизируя животных глобулинами животных тех видов, которые служат продуцентами антивирусных антител. Чаще применяют антикроличьи, антилошадиные и сыворотки против глобулинов морской свинки.

При непрямом методе на фиксированый препарат (как описано выше) наносят немеченные сыворотку или гамма-глобулины, содержащие антитела к предполагаемому вирусу, после чего препарат в течение 30 мин выдерживают при температуре  $37^\circ\text{C}$ . Отмывают несвязанные антитела. На препарат наносят конъюгат, содержащий антитела против гамма-глобулинов животных того вида, на которых получали антивирусные антитела, т. е. если использовали антитела, полученные на курах, то применяют меченные флуорохромом антитела против глобулинов кур. Время окрашивания этим конъюгатом такое же, как и при прямом методе.

Препарат отмывают для удаления несвязанных меченных антител, наносят нефлуоресцирующее масло и исследуют под люминесцентным микроскопом (рис. 62).

Непрямой способ имеет ряд преимуществ. Его применяют не только для обнаружения антигена, но и для выявления и титрования антител. Этот метод в несколько раз более чувствителен, чем

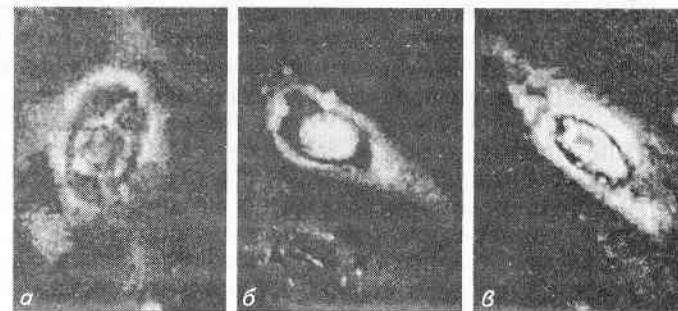


Рис. 62. Выявление непрямой РИФ антигена аденовируса крупного рогатого скота в культуре клеток testicula бычка (препараты Л. Н. Носач, Р. В. Белоусовой и др.):

а — внутриядерное включение не светится; б — внутриядерное включение светится; в — свечение в ядре и в цитоплазме

прямой, так как каждая молекула антигена связывает обычно больше чем одну молекулу антитела. Эти антитела, соединяющиеся с изучаемым антигеном, в свою очередь, являются антигенами для флуоресцирующего антитела, которого связывается значительно больше. Кроме того, этот метод требует одной меченоей сыворотки для обнаружения антигенов различных вирусов. Для подготовки антител к антиглобулиновых люминесцирующих сывороток к работе выпускаемые биофабриками лиофильно высушенные конъюгаты, слегка встряхивая, растворяют в 1 мл (или 0,5 мл) дистиллированной воды. Затем, добавляя физиологический раствор, разведение сыворотки доводят до указанного на этикетке ампулы рабочего разведения. Хорошие конъюгаты должны растворяться легко, без осадка. После растворения конъюгат при температуре  $2-4^\circ\text{C}$  можно хранить в течение 1—2 мес. Пользование конъюгатами в разведениях, более концентрированных, чем рабочее, не только не оправданно, но может привести и к выявлению неспецифического свечения.

Разработано несколько модификаций непрямого метода. Наибольшего внимания заслуживает метод с использованием комплемента (Goldwasser и Shepard, 1958) (см. рис. 60 и 62). Он заключается в том, что на препарат наносят инактивированную нефлуоресцирующую специфическую сыворотку и комплемент морской свинки, затем для выявления комплекса антиген + антитело + комплемент наносят флуоресцирующую антикомплементарную сыворотку.

Этот вариант намного чувствительнее первого и имеет еще большую универсальность, так как требуется только одна антикомплементарная флуоресцирующая сыворотка для обнаружения антигенов различных вирусов.

Оба варианта непрямого метода применяют, как для обнаружения и идентификации антигена, так и для выявления и титрования специфических антител. Микроскопирование мазков из заведомо известных вирусодержащих материалов, обработанных различными разведениями исследуемых сывороток, позволяет обнаруживать специфические антитела и определять их титр в этих сыворотках. Этот метод существенно упрощает и ускоряет серологическую диагностику вирусных инфекций. (Методику по определению и титрованию антител см. в разделе Диагностики ящура.)

РИФ находит все большее применение в различных областях биологии. Особенно широко используется в вирусологии. Благодаря специфичности, высокой чувствительности, доступности, быстроте и относительной простоте РИФ используют с целью индикации и идентификации вирусных антигенов (особое значение приобретает этот метод для тех вирусов, которые не обладают цитопатогенными, гемагглютинирующими и гемадсорбирующими свойствами); выявления и титрования противовирусных антител, а также аутоантител. РИФ делает возможным морфологическое изучение процессов взаимодействия вирусов с клетками, динамики накопления вирусных антигенов в клетке, антигенных связей вирусов, а также патогенеза вирусных инфекций. Особенно большое значение этот метод имеет при изучении смешанных и хронических инфекций.

РИФ относится к экспресс-методам диагностики, так как в течение короткого времени (нескольких часов) она позволяет обнаруживать вирусные антигены даже при наличии их малых доз. Однако оказалось, что РИФ в процессе лабораторной диагностики нередко дает неудовлетворительные результаты. Главная причина неудач состоит в трудности интерпретации степени специфичности реакции, которая может быть обусловлена многими факторами.

Природа неспецифических реакций изучена не полностью. Однако некоторые причины выяснены, они сводятся к следующему:

- 1) наличие в коньюгате не соединившегося с белками флуорочрома;
  - 2) присутствие в коньюгате гетерологичных антител;
  - 3) неспецифическая адсорбция меченых белков на препарате.
- В настоящее время РИФ широко применяют в диагностике большинства вирусных болезней животных.

### Задания

1. Ознакомиться с набором флуоресцирующих сывороток и наставлениями по их применению.
2. Обработать препараты (культуру клеток, зараженную вирусом ИРТ, или ПГ-3, или любым другим вирусом) прямым методом

иммунофлуоресценции с использованием флуоресцирующих сывороток из диагностических наборов.

3. Просмотреть приготовленные препараты в микроскопе.

**Материальное обеспечение:** люминесцентный микроскоп; нефлуоресцирующее иммерсионное масло; предметные и покровные стекла; ацетон; физиологический раствор; дистиллированная вода; чашки Петри; фильтровальная бумага; культура клеток (на покровных стеклах), зараженная вирусом ИРТ, или ПГ-3, или другим видом вируса; соответствующие флуоресцирующие сыворотки; пастеровские пипетки; пробирки с резиновыми пробками; пипетки на 1 и 5 мл; пинцеты хирургические; кюветы; лиапозитивы по теме.

### Примерный план занятия (2 ч)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Самостоятельная работа студентов: а) обработка препаратов прямым методом иммунофлуоресценции; б) просмотр приготовленных препаратов в люминесцентном микроскопе.
4. Демонстрация: а) наборов флуоресцирующих сывороток для диагностики вирусных инфекций; б) положительных препаратов на бешенство, инфекционный ринотрахеит, ПГ-3 и др.
5. Подведение итогов занятия.
6. Задание к следующему занятию.

### Контрольные вопросы

1. В чем состоит МФА и его использование в диагностике вирусных болезней?
2. Какие модификации МФА применяются в вирусологии?
3. Какие задачи можно решать с помощью МФА?
4. Каковы достоинства и недостатки МФА?

**Методические указания.** При проведении занятия в качестве материала для приготовления препаратов с целью постановки прямого метода РИФ можно использовать любой материал, полученный от животных, куриных эмбрионов или культур клеток, инфицированных вирусами, с которыми работают сотрудники кафедры и имеют к этим вирусам флуоресцирующие сыворотки.

При отсутствии вышеуказанных возможностей можно воспользоваться живыми вакцинами (против ИРТ, ПГ-3 и др.). Для этого нужно предварительно получить культуры клеток ПЭК, ТБ или перевиваемую линию МДВК на покровных стеклах и заразить вакцинными штаммами. Флуоресцирующие сыворотки к указанным вирусам есть в диагностических наборах, выпускаемых биопромышленностью.

Ввиду дефицита времени демонстрацию и некоторые вопросы объяснения преподавателя можно провести в период окрашивания препаратов (25–30 мин).

## Тема 13

### МЕТОД ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

В последнее время в диагностике вирусных болезней человека и животных стали применять методы, основанные на использовании в качестве метки антител и антител ферментов. Эта группа методов носит название иммуноферментного анализа (ИФА).

Накопилось много примеров, свидетельствующих о широких возможностях использования ИФА в различных областях медицины, сельского хозяйства, промышленности и контроля окружающей среды. Однако основные направления применения ИФА: ранняя диагностика инфекционных, онкологических и других болезней, проведение массовых эпидемиологических и эпизоотологических исследований, контроль качества продукции и соблюдение санитарных норм на предприятиях медицинской, микробиологической и пищевой промышленности.

ИФА используется для выявления и идентификации вируса и антител к нему (у животных-реконвалесцентов) или исследования уровня постvakцинальных антител.

Для идентификации вирусспецифического антигена иммуноферментный тест применяют в двух вариантах: гистохимическом и твердофазном.

**Гистохимический вариант ИФА, или иммунопероксидазная реакция.** Иммунопероксидазная реакция аналогична методу иммунофлуоресценции, но отличается тем, что для постановки реакции используют антитела, меченные не флуорохромом, а ферментом, и учет результатов реакции проводят не под люминесцентным микроскопом, а под обычным световым. В этом варианте ИФА используют антитела, меченные пероксидазой, так как ее молекулярная масса (40 000) меньше, чем молекулярная масса щелочной фосфатазы (100 000) и галактозидазы (150 000), что способствует лучшему проникновению пероксидазного коньюгата сквозь клеточную мембрану. Кроме того, пероксидаза устойчива при гистологической обработке (E. Kurstak, 1971).

Материалом для выявления вирусспецифических антигенов или вирусов с помощью иммунопероксидазной реакции могут служить: мазки-отпечатки различных органов, парафиновые срезы, культура клеток, мазки крови. Использование для иммунопероксидазной реакции носоглоточных смызов несколько ограничено в связи с наличием в воспаленных клетках большого количества эндогенной пероксидазы, обуславливающей высокое фоновое окрашивание. Для инактивации эндогенной пероксидазы применяют азид натрия в сочетании с перекисью водорода и фенилгидразин. Обработку указанными реактивами проводят перед нанесением иммуноферментного коньюгата на препарат.

Иммунопероксидазную реакцию ставят в прямом и непрямом вариантах.

**Прямой пероксидазный тест.** При выявлении антигена с помощью прямого иммунопероксидазного метода используют противовирусные коньюгаты, т. е. коньюгаты, полученные из антител, выделенные из специфической сыворотки, и фермент. Коньюгаты готовят в специализированных учреждениях биологической промышленности. Для выявления вирусспецифического антигена прямым иммунопероксидазным методом проводят этапы работы, представленные на рисунке 63. Для этого культуру клеток, выращенную на покровных стеклах и инфицированную вирусом, или мазки-отпечатки в течение 10 мин фиксируют охлажденным до минус 10 – минус 20 °C ацетоном. Препараты высушивают на воздухе и наносят на них 0,2–0,3 мл иммунопероксидазного коньюгата в рабочем разведении, которое указано на ампуле. Инкубируют 1–2 ч при 37 °C во влажной камере. (Срок инкубации при необходимости может быть увеличен до 6 ч.) Препарат в течение 15 мин тщательно промывают физиологическим раствором, споласкивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Наносят на него несколько капель раствора субстрата — диминобензидинтетрахлорида (3,3-ДАБ—4НС1), инкубируют 5–10 мин и промывают 10–15 мин в физиологическом растворе, споласкивают дистиллированной водой.

В положительных случаях, т. е. при наличии антигена в исследуемом препарате, после нанесения иммунопероксидазного коньюгата образуется комплекс антиген — антитело, меченный ферментом. После нанесения на препарат раствора субстрата последний под действием фермента разлагается, образуя цветной продукт ферментативной реакции, хорошо видный в световом микроскопе.

Результаты учитывают с помощью светового микроскопа. Диминобензидинтетрахлорид под действием пероксидазы разлага-

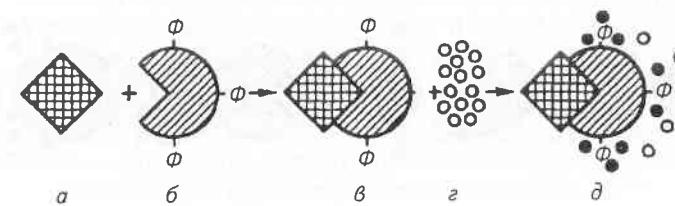


Рис. 63. Схема прямого пероксидазного метода выявления антигена:

*a* — срез ткани, содержащий антиген; *b* — антитела, меченные ферментом; *c* — комплекс антиген + антитело + фермент; *d* — субстрат; *d* — комплекс антиген + антитело + фермент, проявленный при помощи субстрата; *φ* — фермент

ется, образуя продукт реакции голубого цвета, который быстро переходит в коричневый. В препарате видны или диффузное желто-коричневое окрашивание, или гранулы коричнево-черного цвета. В контрольных препаратах окрашивания не обнаруживают.

Для приготовления субстрата 25 мг 3,3-ДАБ · 4НСl растворяют в 100 мл 0,05 М трисбуфера с pH 7,5 или в лимоннокислом буфере с pH 5,0 (0,05 М лимонная кислота, нейтрализованная 0,05 М уксуснокислым аммонием). Далее 25 мл раствора 3,3-ДАБ · 4НСl смешивают в 3 мл 0,5%-ной Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (готовят ex tempore!).

Вирусспецифический антиген в мазках и гистосрезах обнаруживают тем же способом. Однако при исследовании срезов время инкубации препарата с коньюгатом нужно продлить до 20 ч при температуре 4 °C или до 6 ч при температуре 37 °C.

**Непрямой иммунопероксидазный тест** применяют для выявления вирусспецифического антигена (рис. 64). При этом используют антивидовые иммунопероксидазные коньюгаты, приготовленные в специализированных учреждениях. Преимуществом непрямого метода является универсальность меченых антивидовых глобулинов, а также большая чувствительность его по сравнению с прямым.

Для выявления вирусспецифического антигена культуру клеток, выращенную на покровных стеклах и инфицированную вирусом, или мазки-отпечатки фиксируют в течение 10 мин охлажденным (минус 10 — минус 20 °C) ацетоном. Препараты высушивают на воздухе и наносят на них 0,2—0,3 мл специфической к искомому антигену сыворотки. Инкубируют при 37 °C 1—2 ч во влажной камере. Промывают физиологическим раствором 5 мин и высушивают на воздухе. Наносят 0,2—0,3 мл антивидового иммунопероксидазного коньюгата в рабочем разведении, указанном на ампуле, и инкубируют при 37 °C 1—6 ч. Далее следуют процедуры, которые были описаны для прямого метода.

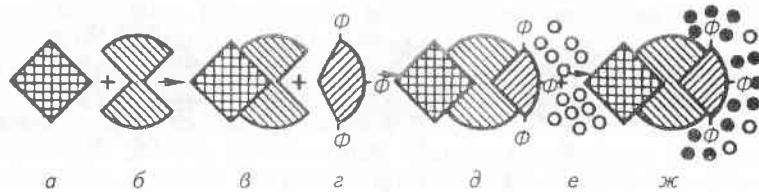


Рис. 64. Схема непрямого иммунопероксидазного метода выявления антигена:

а — срез ткани, содержащей антиген; б — специфические антитела, к антигену; в — комплекс антиген + антитело; г — вторичные антитела, меченные ферментом; д — комплекс антиген + антитело + вторичное антитело, меченный ферментом; е — субстрат; ж — комплекс, проявленный при помощи субстрата; Ф — фермент

При наличии в исследуемом материале вирусспецифического антигена после внесения специфической сыворотки образуется комплекс антиген — антитело, для выявления которого используют антивидовые или вторичные антитела, меченные ферментом; образуется более сложный, чем в первом случае, комплекс: антиген — антитело — вторичное антитело — фермент. Полученный комплекс выявляют добавлением субстрата, который под действием фермента разлагается, образуя цветной продукт ферментативной реакции. Учет результатов проводят, как и в первом случае, в световом микроскопе.

Иммунопероксидазная реакция в прямом и непрямом вариантах используется для выявления вирусов бешенства, ящура, герпесвирусов, энтеровирусов и др.

**Методы твердофазного иммуноферментного анализа.** Методы твердофазного ИФА основаны на применении антител (антигенов), фиксированных на нерастворимых носителях. В качестве носителей используют стеклянные или нейлоновые шарики, полистироловые или керамические пробирки и микропанели. В последнее время широкое использование в ИФА получили полистироловые микропанели. Применение их и автоматизация процесса постановки и учета реакции позволяют за короткое время исследовать большое число образцов сывороток на наличие антител и другого материала на наличие вирусспецифического антигена.

Твердофазный ИФА был предложен в 1971 г. E. Engvall с соавт. и A. Schufts с соавт. Он успешно используется как для обнаружения вирусспецифического антигена, так и специфических антител у животных-реконвалесцентов или иммунизированных противовирусными вакцинами.

В твердофазном ИФА используют как пероксидазные, так и щелочно-фосфатазные коньюгаты.

Для исследования большого числа образцов с помощью твердофазного ИФА необходимо иметь: полистироловые микропанели с плоским дном, автоматические пипетки с переменным или постоянным объемом от 50 до 200 мкл, промывочное устройство — автоматическое или полуавтоматическое и считающее устройство.

Необходимо отметить, что анализ может быть выполнен на микропанелях и без перечисленных выше приборов. В этом случае учет результатов реакции может быть проведен визуально, без использования специальной регистрирующей аппаратуры, но в этом случае резко снижается производительность метода.

Для выявления вирусспецифического антигена с помощью данного метода в различных биологических жидкостях наиболее часто используют метод двойных антител, или «сандвич» (рис. 65). Для этого лунки полистироловых микропанелей сенсибилизируют гамма-глобулином, выделенным из специфической к исследуемому антигену сыворотки. Концентрацию гамма-глобулина подбирают

Рис. 65. Схема определения антигена методом двойных антител («сандвич») в твердофазном ИФА:

1 — адсорбция антигена в лунках специфических антител; 2 — внесение исследуемого раствора, который соединяется с антигенами; 3 — добавление ферментомеченых специфических антител; 4 — внесение субстрата и появление цветного продукта ферментативной реакции;  $\Phi$  — фермент



рают путем титрования, используя заведомо позитивный и негативный антигены. Оптимальной концентрацией считается такая, при которой уровень оптической плотности позитивных образцов в 5–10 раз превышает уровень оптической плотности негативных образцов. Чаще всего используют концентрацию 10–30 мкг/мл.

Твердофазный иммуноферментный тест для обнаружения вирусспецифического антигена ставят по следующей схеме: 1) в лунки микропанелей вносят по 0,1 мл гамма-глобулина в нужной концентрации в натрий-карбонатном буфере с pH 9,6; 2) микропанели инкубируют в течение часа при 37 °C и далее оставляют на ночь при 4 °C; 3) наутро из лунок удаляют раствор глобулинов, микропанели промывают 3 раза по 5 мин калийфосфатным буфером с pH 7,4, содержащим 0,05 % твины-20; 4) в лунки вносят по 0,1 мл раствора, содержащего исследуемый антиген, и инкубируют при 37 °C 2 ч. В контрольные лунки вносят заведомо известные положительный и отрицательный антигены; 5) микропанели промывают; 6) далее в лунки вносят по 0,1 мл иммуноферментного коньюгата и панели инкубируют 1–2 ч при 37 °C; 7) микропанели промывают, как в п. 3 и 5; 8) далее в лунки вносят по 0,1 мл раствора субстрата: ортофенилендиамина (ОФД) или 5-аминосалициловой кислоты (для пероксидазы) и р-нитрофенилфосфата (для щелочной фосфатазы), инкубируют в темноте при комнатной температуре 5–30 мин; 9) реакцию останавливают добавлением 0,05 мл 2 н. серной кислоты ( $H_2SO_4$ ) (для пероксидазы) и 3 М NaOH (для щелочной фосфатазы); 10) реакцию учитывают визуально по разности в окраске опытных и контрольных образцов или колориметрически при длине волны 490 нм (для пероксидазы) или 405 нм (для щелочной фосфатазы).

При использовании субстрата ОФД положительные образцы имеют оранжево-коричневую окраску, а при применении 5-аминосалициловой кислоты опытные образцы окрашиваются в интенсивно-коричневый цвет, в то время как отрицательный конт-

Рис. 66. Схема определения антител непрямым методом твердофазного ИФА:

1 — адсорбция антигена в лунках специфических антител; 2 — внесение исследуемого раствора. Специфические антитела фиксируются на антигене; 3 — внесение ферментомеченного антивидового глобулина, фиксирующегося на антителах; 4 — внесение субстрата и появление цветного продукта ферментативной реакции;  $\Phi$  — фермент

роль либо совсем не окрашен, либо окрашен в слабо-желтый цвет. При использовании щелочной фосфатазы опытные образцы окрашены в желтый цвет.

За положительный результат принимают превышение оптической плотности опытных образцов над контрольными в 2–3 раза.

Определение антител непрямым методом твердофазного ИФА см. рисунок 66.

**Автоматизация иммуноферментного теста.** Результаты, получаемые с помощью иммуноферментного теста, оценивают с помощью спектрофотометрии, регистрируя процессы изменения концентрации субстрата или продуктов ферментативной реакции. Измеряемым параметром в этих случаях была или начальная скорость ферментативной реакции, или конечная оптическая плотность продукта, образовавшегося за определенный промежуток времени.

Для учета результатов реакции можно использовать анализаторы скоростей реакции и автоматические спектрофотометры, которые позволяют измерять ферментативную активность в 120 и 2000 образцах в течение часа. Процесс измерения управляет компьютером, пересчитывающим величину ферментативной активности в концентрацию определяемого соединения.

Фирмы «Дайнатек» (Швейцария) и «Флоу» (Англия) выпускают комплекты приборов для проведения иммуноферментного анализа на полистироловых микропанелях. Основная часть комплексов — оснащенные микрокомпьютерами вертикальные спектрофотометры, позволяющие проводить измерение оптической плотности продукта ферментативной реакции непосредственно в лунках микропанелей. Считывание результатов 96 анализов занимает всего 1 мин; измеряющие, промывающие и дозирующие устройства указанных приборов позволяют проводить анализ как в лабораториях, так и в полевых условиях.

Для крупных клинических центров разработаны полностью автоматизированные установки для проведения твердофазного



ИФА, в котором антигены (антитела) адсорбционно фиксированы на поверхности полистироловых пробирок. Данные системы, которые обслуживают 2 человека, позволяют анализировать до 4000 проб ежедневно.

При отсутствии специального оборудования учет результатов ИФА может эффективно проводиться на струйных спектрофотометрах, флуориметрах, фотоэлектрокалориметрах. Достоверность результатов анализа при этом несколько снижается и уменьшается число проб, которое могло бы быть проанализировано за рабочий день.

Часто ценной является качественная информация о наличии или отсутствии данного соединения в исследуемой пробе. В этих случаях учет результатов ИФА можно проводить визуально, по появлению окрашенного продукта ферментативной реакции. Эта особенность метода крайне важна при необходимости массовых исследований вдали от стационарных лабораторных центров.

#### Рецепты приготовления растворов:

1) натрий-карбонатный буфер, pH 9,6. Состоит из 1,59 г  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  и 2,93  $\text{NaHCO}_3$ , растворенных в 1 л дистиллированной воды. Раствор хранят при комнатной температуре не более 2 нед;

2) калийfosфатный буфер 0,01 М, pH 7,4. 1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  = 136 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворяют в 1 л дистиллированной воды. 1 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  = 228 г  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  растворяют в 1 л дистиллированной воды. 10 мл 1 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  + 40 мл 1 М  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  + 29 г  $\text{NaCl}$  доводят дистиллированной водой до 5 л;

3) PBS-твин, pH 7,4, для разведения вируса: 8,0 г  $\text{NaCl}$ , 0,2 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,9 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 г  $\text{KCl}$ , 0,5 мл твина-20 доводят до 1 л дистиллированной водой;

4) фосфатно-цитратный буфер, pH 5,0. Состоит из 24,3 мл 0,1 М лимонной кислоты (19,2 г лимонной кислоты растворить в 1 л дистиллированной воды), 25,7 мл 0,2 М фосфата натрия (28,4 г  $\text{NaHPO}_4$  растворить в 1 л дистиллированной воды) и 50 мл дистиллированной воды;

5) раствор субстрата ОФД: 40 мг ОФД растворяют в 100 мл фосфатно-цитратного буфера и добавляют 40 мкл (0,04 мл) 30%-ного пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Готовят перед употреблением в темной посуде;

6) раствор субстрата 5-аминосалициловой кислоты: а) 16 мг 5-аминосалициловой кислоты растворяют в горячей дистиллированной воде, pH раствора 6,0. Раствор охлаждают; б) готовят 0,5 М раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Для этого 30%-ную  $\text{H}_2\text{O}_2$  разводят 1 : 20 холодной дистиллированной водой (4 °C); в) рабочий раствор  $\text{H}_2\text{O}_2$ : 0,1 мл 0,5 М  $\text{H}_2\text{O}_2$  + 3,3 мл холодной (4 °C) дистиллированной воды; г) перед постановкой реакции смешивают охлажденные до 4 °C раствор 5-аминосалициловой кислоты (а) и рабочий (в);

7) субстрат для щелочной фосфатазы-*p*-нитрофенилфосфата (1 мг/мл): таблетку *p*-нитрофенилфосфата перед употреблением растворяют в 5 мл 10%-ного дистиллированного буфера;

8) 10%-ный дистиллированный буфер состоит из 97 мл дистиллированного амина, 800 мл дистиллированной воды, 0,2 г  $\text{NaN}_3$ , 100 мг  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . 1 М HCl добавляют до тех пор, пока pH не станет равным 9,8. Объем доводят дистиллированной водой до 1 л.

## Задания

1. Ознакомиться с набором для диагностики вирусной инфекции иммуноферментным методом и наставлением по его применению.

2. Определить титр антител в сыворотке крови, используя набор для серодиагностики вирусной инфекции иммуноферментным методом.

**Материальное обеспечение:** набор для серологической диагностики вирусной инфекции иммуноферментным методом, сыворотка крови здоровых животных (отрицательный контроль), сыворотка крови иммунизированных животных (положительный контроль и испытуемая сыворотка), дистиллированная вода, многочанальные пипетки, градуированные пипетки на 1–10 мл, резиновые груши, мерные цилиндры, колбы, фотометр.

## Примерный план занятия (4 ч)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Демонстрация набора для диагностики вирусной инфекции иммуноферментным методом и положительных результатов.
4. Самостоятельная работа студентов: а) постановка реакции ИФА согласно наставлению; б) учет результатов.
5. Подведение итогов занятия.
6. Задание к следующему занятию.

## Контрольные вопросы

1. В чем принцип ИФА и его использование в диагностике вирусных болезней?
2. Чем отличается гистохимический вариант ИФА от твердофазного?
3. Каковы достоинства и недостатки ИФА?

**Методические указания.** При проведении занятия можно использовать любой набор для диагностики вирусных инфекций животных иммуноферментным методом, с которым сотрудники кафедры работают или имеют возможность приобрести.

## Тема 14

# МЕТОД ДНК-ЗОНДОВ И ЕГО ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

Метод ДНК-зондов позволяет обнаруживать нуклеиновые кислоты (в том числе и вирусные) в любых материалах, включая патологический материал от больных животных. Он основан на способности одноцепочных молекул нуклеиновых кислот соединяться в двухцепочные, если они взаимно комплементарны. Каждая молекула нуклеиновой кислоты представляет собой цепь нуклеотидов, связанных фосфодиэфирными связями. Любой же нуклеотид можно рассматривать как структуру, состоящую из трех частей: фосфорной кислоты ( $H_3PO_4$ ), сахара (рибозы или дезоксирибозы) и азотистого основания (аденин, гуанин, цитозин, тимин или урацил). В зависимости от вида входящего в состав нуклеотидов сахара нуклеиновые кислоты делятся на дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК) и рибонуклеиновую (РНК). Нуклеотиды одного вида нуклеиновой кислоты по своему составу различаются только азотистыми основаниями, которых четыре вида (А, Т, Г, Ц для ДНК и А, У, Г, Ц для РНК).

Пуриновые основания (А и Г) способны связываться с пиримидиновыми (Т, Ц и У) водородными связями. Поэтому и соответствующие нуклеотиды могут связываться между собой парами А — Т и Г — Ц. Это свойство называется *комплементарностью*. Две одинарные полинуклеотидные цепи (нуклеиновые кислоты) способны связываться водородными связями в одну двухцепочную, если последовательность нуклеотидов одной точно соответствует последовательности нуклеотидов другой так, что их азотистые основания могут образовать пары А — Т и Г — Ц. Такие две молекулы ДНК называются взаимно комплементарными. Ими могут быть не только две молекулы ДНК или две молекулы РНК, но и ДНК с РНК (при этом вместо пары А — Т образуется А — У). Например, две молекулы ДНК, имеющие следующие последовательности нуклеотидов:

- 1) А А Г Ц А Т Г Г Ц Т ..... Ц А А А Г Т;
- 2) Т Т Ц Г Т А Ц Ц Г А ..... Г Т Т Т Ц А,

являются взаимно комплементарными. Если смесь таких нуклеиновых кислот подержать при  $55^{\circ}\text{C}$ , то примерно через 2 ч образуются двухцепочные молекулы ДНК следующего состава:

А А Г Ц А Т Г Г Ц Т ..... Ц А А А Г Т  
|| || || || || || || || || || || || || ||  
Т Т Ц Г Т А Ц Ц Г А ..... Г Т Т Т Ц А

(здесь черточками обозначено количество образовавшихся водородных связей).

Поскольку исходные одноцепочные молекулы могут происходить из разных источников, этот процесс удвоения молекул называется *молекулярной гибридизацией*. Нагрев материала, содержащего двухцепочные ДНК, до  $80^{\circ}\text{C}$  или обработка его щелочью приводят к разделению двухцепочных молекул на одноцепочные, что называется *денатурацией*.

Любой вирус включает одну специфичную для него молекулу ДНК (или РНК) со строго определенной последовательностью нуклеотидов. Чтобы обнаружить вирусную нуклеиновую кислоту в материале от больного животного, можно воспользоваться ее способностью после разделения цепей (если она двухцепочная) образовывать снова двойную цепь с комплементарной ей молекулой нуклеиновой кислоты, предварительно как-либо помеченной. Такая меченая одноцепочная молекула нуклеиновой кислоты, комплементарная молекуле нуклеиновой кислоты определенного вида, называется ДНК-зондом. Для каждого вида вируса зонд готовят заранее и вводят в него метку или в виде атомов радиоактивного фосфора ( $^{32}\text{P}$ ), или в виде биотина, дающего изменение цвета, что позволяет обнаруживать зонд, а значит, и вирусную нуклеиновую кислоту, с которой зонд соединился в результате молекулярной гибридизации.

Методика обнаружения вирусной нуклеиновой кислоты в патологическом материале включает следующие этапы:

- 1) получение ДНК-зона и его метка;
- 2) подготовка патологического материала к исследованию;
- 3) молекулярная гибридизация и удаление одноцепочных нуклеиновых кислот;
- 4) обнаружение двухцепочных нуклеиновых кислот, включивших в себя зонд (по метке);
- 5) интерпретация результатов.

Получение ДНК-зона — наиболее трудная задача. Она сводится к тому, что ДНК соответствующего вида, на который хотят получить ДНК-зонд, разрезают на фрагменты (с помощью рестриктаз). Методом электрофореза выделяют тот фрагмент, который неизменно обнаруживается в ДНК вирусов разного происхождения и является наиболее консервативным.

Из бактерий кишечной палочки выделяют те плазмиды, которые содержат ген фермента, разрушающего какой-либо антибиотик (например, ген пенициллиназы). Кольцевые плазмиды с помощью рестриктазы разрезают, превращая их в линейные, и к ним с помощью лигазы «пришивают» выделенный фрагмент вирусной ДНК. Плазмидные ДНК с вирусными вставками вводят в бактерии, которые затем клонируют в селективной среде, содержащей антибиотик, к которому бактерии стали нечувствительными. Накапливают массу бактерий и из них выделяют плазмидную ДНК (путем удаления белка). Выделенную плазмидную ДНК,

содержащую вирусные вставки, метят радиоактивным фосфором ( $^{32}\text{P}$ ) путем ник-трансляции и денатурируют путем нагрева до 80 °С. Образовавшиеся одноцепочные молекулы ДНК будут иметь фрагменты, комплементарные фрагментам одной из нитей ДНК вириуса. Это и есть ДНК-зонд.

Для получения ДНК-зонда на вириусную РНК выбирают на основе анализа генетической карты вириуса необходимый фрагмент РНК, выделяют его, а затем путем обратной транскрипции получают ДНК-фрагмент, который и встраивают в плазмиду. Обычно ДНК-зонд готовят на каждый вириус заранее, нарабатывают его и хранят до использования.

С помощью ДНК-зонда можно обнаружить вирусные нуклеиновые кислоты в любом материале от больных животных. Для этой цели пригоден как свежий материал (ткани, смывы, кровь), так и высушенный, мороженый и даже частично разложившийся.

Из подлежащего исследованию материала выделяют ДНК, для чего ее гомогенизируют, суспендируют, центрифицируют и надосадочную жидкость обрабатывают препаратаами, разрушающими белки (сначала протеиназой К, затем фенолом с хлороформом). После полного удаления белков осаждают ДНК при минус 70 °С, осадок отмывают спиртом и подвергают денатурации путем кипячения или обработки щелочью.

Полученные пробы из разных исследуемых материалов наносят на микропористую капроновую или нейлоновую мембрану (фильтр), расчерченную простым карандашом на квадраты (для каждого материала свой номер квадрата). Также наносят отрицательный и положительный контроли. Зонд наносят на стекло, которое затем накладывают на фильтр так, чтобы получился контакт зонда с исследуемым материалом, и 20 мин выдерживают при 80 °С, после чего температуру снижают до 55 °С, при которой идет гибридизация (около 2 ч). Затем фильтр отделяют от стекла, промывают, сушат и удаляют с него все несвязавшиеся одноцепочные молекулы ДНК, обрабатывая додецилсульфатом и цитратом натрия. Методом авторадиографии устанавливают, в каких квадратах выявляется радиоактивность, и визуально оценивают ее интенсивность (путем сравнения с контролями). Потемнение фотопленки, контактировавшей с определенными квадратами, свидетельствует о наличии в материалах этих квадратов искомой нуклеиновой кислоты вириуса.

Учитывать результаты при использовании радиоактивной метки кроме авторадиографии можно и путем подсчета импульсов в счетчике.

Использование радиоактивной метки для зонда является довольно большим недостатком метода, и поэтому разрабатываются другие методы метки зонда, в том числе присоединение к зонду метки, изменяющей цвет субстрата.

Метод молекулярных зондов перспективен, так как позволяет обнаруживать нуклеиновые кислоты любых вириусов, для которых получен зонд. Однако исследования этим методом технически довольно сложны и трудно выполнимы.

Кратко метод ДНК-зондов сводится к следующему:

1. Получение одноцепочного фрагмента ДНК определенного вириуса (ДНК-зонда) и его метка.
2. Выделение из патологического материала нуклеиновых кислот и их денатурация (расплетение двухцепочных молекул на одноцепочные).

3. Контакт образовавшихся одноцепочных молекул ДНК (или РНК) с ДНК-зондом при 55 °С, приводящий к образованию двухцепочных молекул (молекулярная гибридизация) в случаях их взаимной комплементарности.

4. Удаление всех негибридизированных одноцепочных молекул нуклеиновых кислот.

5. Обнаружение (по метке) образовавшихся двухцепочных молекул нуклеиновых кислот, которые и будут указывать на наличие в материале того вириуса, на который был получен ДНК-зонд.

Достоинства метода ДНК-зондов: высокие чувствительность и специфичность, универсальность, отсутствие необходимости в стерильной работе и математической обработке результатов.

Недостатки метода: относительная технологическая сложность и трудность получения ДНК-зонда.

## Задание

Ознакомиться с методикой обнаружения вирусных нуклеиновых кислот с помощью ДНК-зондов.

**Материальное обеспечение:** микропористая капроновая мембрана (или ее аналог), расчерченная на квадраты, авторадиограмма (проявленная рентгеновская пленка); счетчик импульсов; схема метода.

## Примерный план занятия (2 ч)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Демонстрация заключительного этапа метода: а) микропористой капроновой мембранны; б) проявленной авторадиограммы; в) счетчика импульсов.
4. Задание к следующему занятию.

## Контрольные вопросы

1. Каков принцип метода молекулярных зондов?
2. Каковы достоинства и недостатки метода?

## Тема 15

### ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ И ЕЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

Ферментативная амплификация ДНК *in vitro*, впервые описанная в 1985 г. R. Saiki с соавт., благодаря высокой чувствительности, специфичности, воспроизводимости и простоте нашла широкое применение при решении задач биотехнологии, генетики, эволюции, биологии, судебной медицины, диагностики вирусных и генетических заболеваний. Этот метод генодиагностики основан на размножении в пробирках уникальных участков генов вируса или бактерий в миллионы и миллиарды раз за 2–3 ч при помощи фермента термостабильной ДНК-полимеразы.

Метод получил название полимеразной цепной реакции (ПЦР; от англ. Polymerase Chain Reaction — PCR). Сутью метода является амплификация, т. е. увеличение числа колий строго определенных фрагментов молекулы ДНК *in vitro*. Амплифицируемый участок именуют амплификоном. Его границы определяются двумя (как правило) олигонуклеотидными праймерами\* (затравками), комплементарными определенным последовательностям в составе противонаправленных нитей двухцепочной ДНК.

ПЦР основана на амплификации ДНК с помощью ДНК-полимеразы, осуществляющей синтез взаимно комплементарных цепей ДНК, начиная с двух праймеров. Праймеры комплементарны противоположным цепям ДНК в участках, ограничивающих выбранную область ДНК, и ориентированы 3'-концами навстречу друг другу и в сторону той последовательности, которую необходимо амплифицировать (рис. 67, 68). При синтезе ДНК праймеры физически встраиваются в цепь новосинтезирующихся молекул ДНК. Из рисунка 68 видно, что каждая из вновь синтезированных с помощью одного из праймеров молекул ДНК может служить матрицей для синтеза комплементарной ДНК с помощью другого праймера. Для этого надо лишь денатурировать (цепи ДНК расходятся) образовавшиеся в результате первой стадии реакции (цикл I на рис. 68) двухцепочечной молекулы ДНК, дать возможность праймерам комплементарно присоединиться к ДНК и осуществить с помощью ДНК-полимеразы элонгацию (синтез ДНК-достройки праймера). Эти три стадии: 1) денатурация ДНК (плавление); 2) комплементарное связывание праймера с ДНК-матрицей (отжиг); 3) синтез ДНК с помощью ДНК-полимеразы (достройка праймера) и составляют суть каждого цикла ПЦР. Далее этот стандартный цикл ПЦР — денатурация, отжиг, элонга-

\*Праймеры — отрезки одноцепочной ДНК длиной 20–30 нуклеотидов, комплементарные каждой из цепей ДНК-матрицы и служащие затравкой для синтеза новой цепи ДНК.

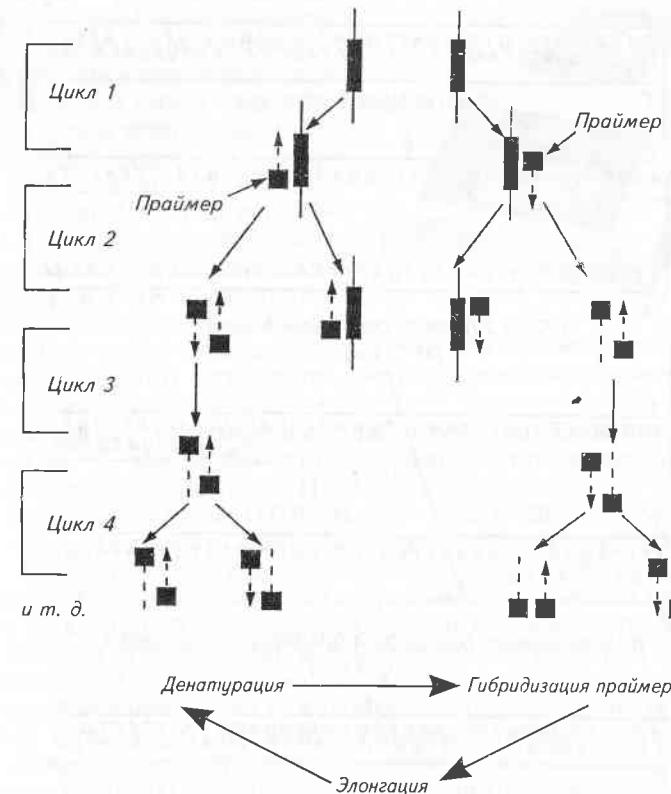


Рис. 67. Схема ПЦР. Исходная ДНК показана сплошной линией, синтезированная ДНК — пунктирной. Количество молекул ДНК, ограниченных с обеих сторон праймерами (появляются на третьем цикле), возрастает экспоненциально. Количество длинных неограниченных молекул ДНК, синтезирующихся только с исходной ДНК, возрастает арифметически (одна копия за цикл), образование таких молекул показано до третьего цикла

ция — воспроизводится многократно, и в идеале количество амплификонов растет в геометрической прогрессии. Продолжительность реакции определяется числом циклов, необходимых для синтеза ДНК амплификонов в количестве, достаточном для дальнейшего исследования или индикации. Индикация может быть произведена известными способами: электрофорезом с окрашиванием бромистым этидием, гибридизацией с изотопно или неизотопно меченными генными зондами, непосредственным колориметрическим, флуорометрическим, радиоизотопным определением при использовании в системе ПЦР меченых предшественников синтеза нукleinовых кислот.

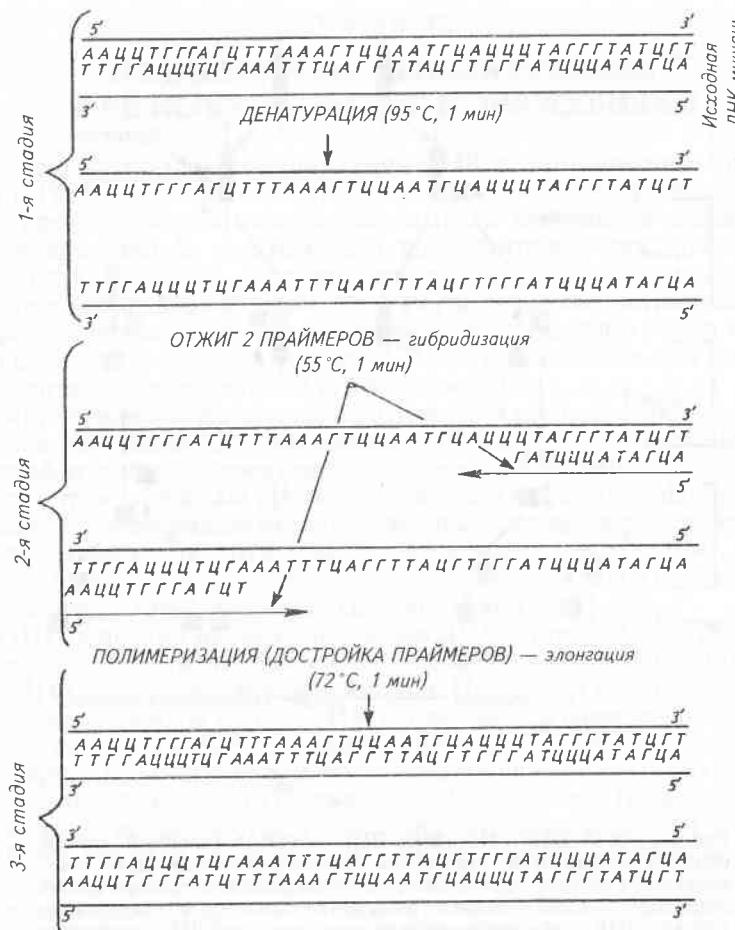


Рис. 68. Схема первого цикла ПЦР. Через два цикла будет четыре копии исходной молекулы ДНК-мишени, а через  $n$  циклов  $2^n$  копий

Основными компонентами ПЦР являются:

- фермент Таq-ДНК-полимераза;
- пара олигонуклеотидных праймеров;
- четыре типа дезоксинуклеозидтрифосфатов;
- копируемая ДНК;
- ионы  $Mg^{+2}$ .

Вспомогательными компонентами являются буферный раствор и минеральное масло.

ПЦР стала технологична с началом использования термостабильных ДНК-полимераз, выдерживающих многократный нагрев до 90 °C, что дало возможность проведения реакции в авто-

матическом режиме — амплификаторе (amplification — англ. умножение, усиление) — приборе, обеспечивающем поддержку в реакционной смеси заданной температуры в течение заданного времени (рис. 71). Таq-ДНК-полимераза синтезирует цепь ДНК до 1000 пар оснований в 1 мин. Кроме того, возможности ПЦР в идентификации ДНК- и РНК-содержащих вирусов еще больше возросли с выделением новой полимеразы (из термофильного микроорганизма *Thermus thermophilus*), обладающей как полимеразной, так и обратнотранскриптазной активностью. С помощью этого фермента упрощается выявление РНК-содержащих вирусов в ПЦР.

Праймеры для ПЦР имеют длину 20–30 нуклеотидов. Праймер должен быть комплементарен выбранному месту в матрице. Особенно жесткие требования предъявляются к комплементарности 3'-концевой части праймера, в то время как в средней и 5'-концевой его части допустимы нуклеотидные замены. Чем больше нуклеотидов в праймере, тем специфичнее ПЦР; короткие праймеры часто «ошибаются».

Поскольку праймеры каждый раз встраиваются в амплифицируемые фрагменты ДНК-матрицы (амплификоны), то они в реакционной смеси ПЦР присутствуют в избытке. Как правило, праймеры для ПЦР-детекции инфекционных возбудителей создаются на консервативных участках их ДНК, которые редко подвергаются генетическим перестройкам. Поиски таких участков осуществляют при помощи специальных компьютерных программ.

ПЦР предусматривает инкубацию исследуемых образцов при трех температурах, соответствующих трем этапам цикла амплификации — денатурации, отжигу и достройке цепей ДНК. Время инкубации и температура варьируют в зависимости от длины амплифицируемой последовательности, длины праймеров и содержания в них ГЦ-пар. Обычно время одного цикла находится в пределах 5–10 мин.

Дезоксинуклеозидтрифосфаты: дАТФ, дТТФ, дГТФ и дЦТФ в реакционной смеси содержатся в эквивалентных концентрациях, так как избыток какого-либо из них увеличивает ложное спаривание нуклеотидов в ПЦР.

Магний необходим для функционирования фермента Таq-ДНК-полимеразы.

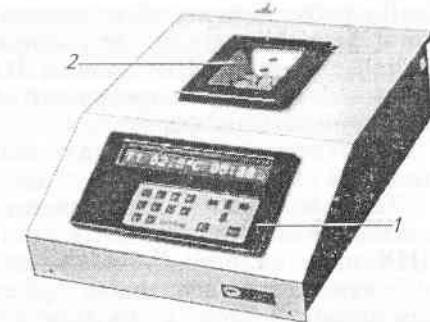


Рис. 69. Амплификатор:

1 — щит управления; 2 — место для проб

Буфер должен обеспечивать оптимальные условия для работы фермента. Наиболее распространен трис-НСl-буфер, который удерживает рН во время ПЦР между 6,8 и 7,8, содержит желатин или бычий сывороточный альбумин и неионные детергенты для стабилизации фермента.

Минеральное масло насливается на поверхность реакционной смеси для предотвращения испарения в процессе ПЦР.

Технология индентификации ДНК-содержащих вирусов заключается в следующем: из исследуемого материала выделяется ДНК-матрица; в пробирке смешивают ДНК, праймеры, дезоксирибонуклеозидтрифосфаты, буфер и ДНК-полимеразу\*. На первом этапе пробирка с инкубационной смесью нагревается до температуры денатурации ДНК (90–100 °C), при этом две цепи ДНК расходятся. Затем проба инкубируется при температуре гибридизации праймеров с ДНК-матрицей (55–65 °C) и на последнем этапе ДНК-полимераза осуществляет комплементарное достраивание нитей ДНК-матрицы с помощью дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (72 °C). В результате проведенного цикла происходит удвоение искомого генетического материала. В следующем цикле синтез осуществляется с 4 копий, далее с 8 и т. д. до 20–30 циклов. В результате получают миллионы копий специфического участка ДНК вируса, бактерии или клетки крови. Индикацию амплифицированного генетического материала проводят одним из вышеуказанных методов.

В ПЦР любая из вновь синтезированных цепей ДНК служит матрицей для синтеза молекул ДНК, соответствующих по длине и последовательности участку ДНК, выбранному для амплификации. Праймеры ориентированы таким образом, что синтез с помощью полимеразы протекает только между ними, удваивая количество копий заданного участка ДНК (такие молекулы появляются уже после второго цикла, см. рис. 67, 68). Оптимальное расстояние между праймерами (длина амплифицируемого участка) составляет 200–500 пар нуклеотидов. Практически удается амплифицировать фрагменты ДНК длиной до 3–4 тыс., хотя можно достичь и большего (до 10 тыс. пар нуклеотидов). Следовательно,

теоретически за 20 циклов ПЦР можно получить амплификацию заданного участка ДНК в  $2^{20}$ , т. е. примерно в миллион раз. В то же время длинные неограниченные копии ДНК могут синтезироваться только с исходных, «родительских» цепей ДНК, и за 20 циклов ПЦР может образоваться лишь 20 таких копий каждой из «родительских» цепей, это очень мало по сравнению с количеством основного продукта.

Кинетика ПЦР имеет экспоненциальный характер только на начальном этапе (20–25 циклов), после чего начинается выход на плато (после 40–45 циклов) в силу истощений дезоксинуклеозидтрифосфатов, праймеров и нарастающего температурного повреждения Таq-ДНК-полимеразы, конкуренции за фермент амплификонов, когда их число начнет превышать число молекул Таq-ДНК-полимеразы. При содержании в ПЦР-пробирке около 10 молекул ДНК-матриц, как правило, достаточно 35 циклов.

В качестве исходной матрицы для ПЦР может быть использована ДНК (или  $\lambda$ ДНК, полученная с помощью предварительной обратной транскрипции РНК), выделенная как из свежеполученных клеток и тканей, так и из замороженных, высушенных или фиксированных препаратов, имеющих частично деградированные нуклеиновые кислоты, т. е. объекты, ранее недоступные для анализа. Так, с помощью ПЦР была амплифицирована, клонирована и секвенирована ДНК египетской мумии, продемонстрирована возможность анализа специфических участков ДНК при наличии одного волоса, клетки, сперматозоида в целях идентификации личности и пола хозяина.

Подготовка пробы материала (выделение ДНК и РНК) должна проводиться в условиях, исключающих перекрестное загрязнение исследуемых проб выделяемыми нуклеиновыми кислотами. Для исключения ложноположительного результата необходимо обязательное использование чистых перчаток, одноразовых пробирок и наконечников к автоматическим пипеткам, предварительной ультрафиолетовой обработки помещения и рабочих поверхностей столов и приборов.

Замечательным свойством ПЦР является возможность не только амплифицировать нужную ДНК, но и вносить в нее при этом необходимые изменения. Эта возможность обусловлена тем, что, с одной стороны, праймеры физически входят в состав ДНК-продукта, а с другой — последовательность праймера, особенно вблизи его 5'-конца, может отличаться от последовательности ДНК-мишени. Праймер, содержащий на 5'-конце некомплементарный довесок длиной до 45 нуклеотидов, эффективно работает в ПЦР. Это обстоятельство открывает необычные возможности для молекулярной биологии и генной инженерии.

Метод ПЦР оказался необычайно удобным для изучения и диагностики наследственных и вирусных заболеваний, когда серологические тесты или культивирование вируса затруднены или

\* Типичный состав и концентрации компонентов смеси ПЦР в объеме 100 мкл:

- а) ПЦР-буфер х 10 (десятикратный) — 10 мкл;
- б) раствор четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов в воде, рН 7,0 (10 мМ) — 8 мкл;
- в) праймер 1 (5 нМ в 200 мкл) — 1–5 мкл;
- г) праймер 2 (5 нМ в 200 мкл) — 1–5 мкл;
- д) Таq-ДНК-полимераза 5 ед/мкл — 0,5 мкл;
- е) MgCl<sub>2</sub> (25 мМ);
- ж) амплифицируемая ДНК-матрица — не более 1 мкг на пробирку;
- з) дистиллированная вода — до конечного объема 100 мкл.

малоэффективны, когда вирус имеет высокую антигенную изменчивость, что осложняет применение иммунологических методов диагностики, а для практической ветеринарии и медицины раннее выявление инфекции очень актуально.

#### Достоинства ПЦР:

1) быстрота анализа. Все процедуры ПЦР занимают 1–2 рабочих дня при параллельной обработке 10–12 образцов;

2) надежность анализа. Под этим подразумевается защищенность от ложноположительных и ложноотрицательных результатов. При аккуратной работе с образцами и реактивами, при использовании всех контролей, надежного оборудования и жестко стандартизованных реактивов методы диагностики вирусных инфекций, основанные на ПЦР, являются высоконадежными;

3) чувствительность анализа. Этот параметр характеризуется наименьшей концентрацией клеток или вирусных частиц в пробе, дающей положительный результат анализа, и определяется сочетанием следующих трех факторов: эффективного выделения нуклеиновой кислоты возбудителя, чувствительности собственно ПЦР и чувствительности выбранного метода индикации. ПЦР позволяет достичь предельно возможной чувствительности: от нескольких копий до одного возбудителя в пробе;

4) специфичность анализа. Под этим подразумевается выявление возбудителей конкретного вида (группы видов, рода) на фоне других вирусов и клеток организма-хозяина. С этой точки зрения возможности ПЦР-диагностик умов идеальны. Специфичность метода равна 100 %;

5) для ПЦР-анализа пригоден любой материал, в том числе и гистологические препараты;

6) количество исследуемого материала, как правило, составляет несколько десятков микролитров;

7) метод позволяет определить число копий возбудителя в пробе и тем самым контролировать виремию или бактериемию в процессе лечения;

8) исследуемый материал может быть дезинфицирован химической или термической обработкой в момент его забора, и, следовательно, исключается возможность инфицирования персонала в процессе проведения ПЦР;

9) простота исполнения и возможность полной автоматизации.

Ввиду того, что чувствительность ПЦР может достигать математически возможного предела (детекции одной копии ДНК-матрицы), существует высокая степень опасности получения ложно-положительных результатов в силу переноса через предметы и реагенты как самой ДНК-матрицы (реже), так и амплификонов (очень часто), получаемых в больших количествах во многих пробирках в течение ежедневной работы; они очень легко переносятся с аэрозолями и через приборы. Поэтому детекция про-

дуктов ПЦР должна проводиться в изолированной комнате со-трудником, не производящим обработку клинических образцов и не готовящим реактивы для ПЦР. Приготовление основных растворов также должно производиться в отдельной чистой комнате. Все растворы должны храниться и использоваться в небольших размерах. Необходимо неуклонно выполнять специальные требо-вания к планировке и режиму работы ПЦР генодиагностической лаборатории. Оптимальная планировка помещений такой лабора-тории представлена на рисунке 70.

В настоящее время, несмотря на значительные успехи науки, вирусные заболевания сельскохозяйственных животных по-пре-жнему наносят экономический ущерб. Для быстрой диагностики и раннего обнаружения вирусов незаменимой оказалась ПЦР. Эта реакция успешно была использована при диагностике вирусной диареи, чумы, инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, ящура, чумы свиней, болезни Аусеки, болезни Марека, инфекционного бронхита птиц и др.

ПЦР является не только мощным инструментом, дополняю-щим круг уже существующих приемов вирусологической диаг-ностики, она способна качественно изменить методологию ре-шения ряда прикладных проблем ветеринарной вирусологии и эпизоотологии. Кроме того, данный метод обладает большими возможностями и может использоваться в фундаментальных ис-следованиях вирусных инфекций. Метод открывает широкие перспективы по изучению перестроек в геноме вирусов, в планировании различных интересующих фрагментов генома, направленном мутагенезе, в изучении структуры и функции от-дельных вирусных генов, в исследованиях, связанных с эволюци-ей и изменчивостью вирусов.

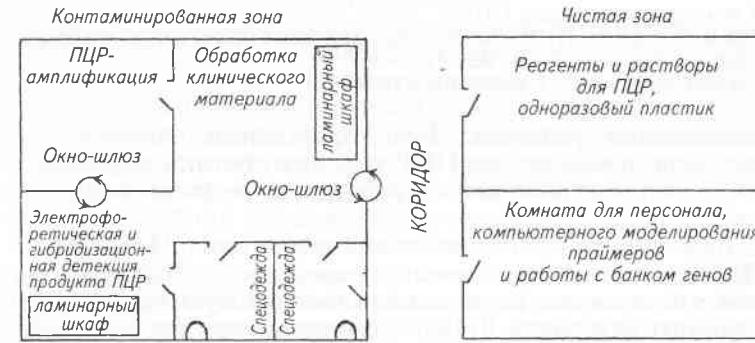


Рис. 70. Примерная планировка помещения ПЦР-диагностической лабора-тории

## Задания

1. Ознакомиться с набором ПЦР для диагностики вирусной инфекции (для любого вириуса) и аппаратом-амплификатором.
2. Провести индикацию и идентификацию вириуса в исследуемом материале с помощью ПЦР.

**Материальное обеспечение:** диагностикум для ПЦР на любую вирусную инфекцию, включающий все необходимые реактивы и материалы; амплификатор, микрощентрифуга типа Эппендорф 10–12 тыс. мин<sup>-1</sup>; камера для электрофореза в геле и источник напряжения до 100 В/1000 мА/200 Вт; трансиллюминатор ультрафиолетовый; встряхиватель пробирок типа Эппендорф («Вортекс»); настольный микротермостат для пробирок типа Эппендорф; штатив для пробирок типа Эппендорф; автоматические пипетки на 1–10, 5–40, 40–200 и 200–1000 мкл; одноразовые наконечники к автоматическим пипеткам; пробирки типа Эппендорф на 1,5, 0,5 и 0,2 мл; pH-метр; аналитические весы; спектрофотометр или спектрофлуориметр; фотоаппарат; лабораторный вакуумный насос.

### Примерный план занятия (12 ч)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Демонстрация: а) набора для ПЦР; б) амплификатора; в) положительных результатов ПЦР.
4. Самостоятельная работа студентов: а) выделение ДНК из исследуемого материала; б) постановка ПЦР; в) учет результатов ПЦР.
5. Подведение итогов занятия.
6. Задание к следующему занятию.

### Контрольные вопросы

1. В чем состоит принцип ПЦР?
2. Как используется ПЦР в диагностике вирусных инфекций и ее возможности в области фундаментальных исследований?
3. Каковы достоинства и недостатки ПЦР?

**Методические указания.** При проведении занятия можно использовать любой набор ПЦР для диагностики вирусных инфекций, с которым работают сотрудники кафедры или имеют возможность его приобрести.

Занятия требуют предварительной подготовки. На одном занятии ПЦР поставить практически невозможно. Ввиду дефицита времени имеет смысл использовать уже готовую выделенную из исследуемого материала ДНК, объяснив студентам теоретически метод ее выделения.

В первый день занятия ставят ПЦР, на второй день проводят ее учет методом электрофореза в агаровом геле.

## Тема 16

### РЕШЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЗАДАЧ

Цель занятия — привить первичные навыки диагностической работы с практическим использованием ранее изученных общих методов работы с вириусами.

Процесс постановки диагноза называется диагностикой. Диагностика складывается из наблюдений и исследований больных животных, исследований патологического материала от больных животных, анализа и оценки результатов исследований, выводов и заключений о причинах и форме болезни, о состоянии больного организма.

Пока не разработаны эффективные методы специфической терапии вирусных болезней, борьба с ними сводится в основном к действиям профилактического и диагностического характера. Поэтому диагностика играет одну из решающих ролей в системе мероприятий по борьбе с болезнями животных вирусной этиологии.

Быстро и правильно поставленный диагноз обеспечивает успех ликвидации вспышки (эпизоотии) вирусной болезни, так как позволяет четко уяснить конкретную эпизоотологическую ситуацию и своевременно принять целенаправленные меры по оздоровлению. Ошибочный же диагноз или задержка его постановки могут повлечь за собой распространение вспыхнувшей болезни, усложнение мероприятий по ее ликвидации и, как результат, значительные экономические потери, особенно при вспышках быстро распространяющихся (например, ящура) или тяжело протекающих (например, чумы свиней) инфекций. Поэтому диагноз на вирусное заболевание должен быть поставлен как можно быстрее и как можно точнее. К сожалению, эти два требования нередко становятся взаимоисключающими, так как чем быстрее поставлен диагноз, тем он менее точен, и наоборот.

В подавляющем большинстве случаев для постановки диагноза требуются сбор, изучение, анализ и сопоставление целого комплекса различных данных. Поэтому диагноз — это результат длительной, кропотливой и вдумчивой работы. Обычно в комплекс изучаемых сведений входят следующие: эпизоотологические данные о вспышке болезни, клинические симптомы болезни, патологоанатомические изменения органов и тканей, результаты лабораторных исследований патологического материала от животных.

Как правило, постановка диагноза на вирусные инфекции состоит из двух этапов: клинико-эпизоотологической (долабораторной) диагностики, проводимой непосредственно в хозяйстве и большей частью позволяющей поставить лишь предварительный диагноз, и лабораторной диагностики, проводимой обычно в специализированной лаборатории (или отделе лаборатории) и позволяющей поставить окончательный диагноз.

На первом этапе диагностики используют данные, которые можно быстро собрать непосредственно в хозяйстве. К таковым относятся клинические симптомы болезни и эпизоотологические сведения с привлечением результатов вскрытия (патологоанатомические изменения). Эпизоотологические данные включают сведения об охвате болезнью данного поголовья животных, о скорости и территориальном распространении болезни, видах заболевших животных, динамике выявления больных и т. д.

Симптомами болезни называются признаки ее, обнаруживаемые при клиническом исследовании больного. Они включают изменения (по сравнению с нормой) температуры тела, частоты и формы дыхания, частоты пульса, нарушения аппетита, поведения, состояния кожных покровов и слизистых оболочек, состояния и функционирования органов пищеварения, выделения и т. д.

Патологоанатомические изменения обычно устанавливают при вскрытии павших или вынужденно убитых животных. Различают макроскопически наблюдаемые изменения (по сравнению с нормой) формы, размера, цвета, консистенции, положения органов животного, появление узелков, кровоизлияний, везикул и других образований, не встречающихся в норме, а также микроскопические изменения в клетках и тканях, обнаруживаемые гистологическими методами.

Полученных данных обычно бывает достаточно, чтобы решить вопрос: инфекционная или неинфекционная болезнь? При инфекционной болезни внимательный анализ и сопоставление собранных сведений позволяют предположить, с какой болезнью мы имеем дело. При этом ориентируются на то, что каждая из них (вирусной и невирусной этиологии) сопровождается определенным комплексом характерных клинических симптомов, своими эпизоотологическими особенностями и патологоанатомическими изменениями. В таком клинико-эпизоотологическом диагнозе в редких случаях можно быть полностью уверенным. Чаще всего он является лишь предварительным, ориентировочным, особенно при инфекционных болезнях вирусной этиологии, в случае которых сходные эпизоотологические данные, клинические симптомы и патологоанатомические изменения обычно наблюдаются при нескольких заболеваниях, и это обстоятельство не позволяет с абсолютной уверенностью распознать болезнь.

Положение еще больше осложняется, если болезнь вызвана не одним, а двумя и более этиологическими факторами (например, двумя вирусами или вирусом и бактерией), что встречается не так уж редко. Все же бывают случаи, когда по клиническим, эпизоотологическим и патологоанатомическим данным можно уверенно поставить диагноз. Например, если болезнь поражает крупный рогатый скот и свиней, очень быстро распространяется, поражая сразу целые стада, характеризуется появлением афт во рту и слю-

нотечением, а также поражением межкапытной щели, заканчивается в основном выздоровлением и не поражает лошадей, можно уверенно говорить о том, что это вспышка ящура (остается выяснить тип и вариант возбудителя).

Несмотря на сугубо ориентировочный характер предварительного диагноза, он играет весьма важную роль, так как может быть поставлен в короткий срок и сразу же ориентирует ветеринарных специалистов только на несколько болезней из многих возможных.

Окончательный диагноз на вирусную болезнь в большинстве случаев может быть поставлен только с учетом результатов лабораторных исследований. Обычно лабораторным исследованиям подвергают патологический материал, собранный от больных или павших животных. Задача исследования патматериала сводится к обнаружению в нем вирусных агентов и установлению их вида. Активные формы вирусов удается обнаружить путем биопробы на чувствительных к данному вирусу лабораторных объектах и в очень редких случаях — в реакции гемагглютинации. О нахождении вируса в организме животного могут свидетельствовать противовирусные антитела в сыворотке крови и вирусные антигены в патматериале. Их обнаружение и идентификация осуществляются с помощью серологических реакций. В ряде случаев о наличии в организме вирусов удается судить по обнаружению в патматериале вирусных телец-включений или вирионов. Те и другие обнаруживаются с помощью микроскопических методов.

Все методы лабораторной диагностики вирусных инфекций можно разделить на три группы:

**э к с п р е с с - м е т о д ы.** Основаны главным образом на обнаружении в патматериале следов пребывания вирусов. Позволяют относительно быстро установить наличие вируса, но не все они отличаются высокой достоверностью;

**в и р у с о л о г и ч е с к и е м е т о д ы.** Основаны на изоляции активных форм вирусов из патматериала и их идентификации в серологических реакциях. Отличаются длительными и трудоемкими исследованиями, но дают точный ответ о возбудителе болезни, хотя и ретроспективно;

**с е р о л о г и ч е с к и е м е т о д ы.** Основаны на установлении динамики титра антител в парных сыворотках крови больных животных. Дают высокодостоверные результаты, но тоже ретроспективно.

От больных животных берут тот патологический материал, в котором предполагается наибольшая концентрация вируса. От трупов (павших или вынужденно убитых животных) патматериал необходимо брать не позднее 1—2 ч после клинической смерти или убоя (позже начинается бактериальное обсеменение, и взять материал стерильно невозможно). В качестве патматериала чаще

всего берут кусочки (в несколько кубических сантиметров) тех органов, которые:

а) имеют видимые отклонения от нормы (по форме, размеру, цвету, консистенции, наличию необычных образований);

б) могут быть поражены и содержать вирус, о чем судят по клинической картине перед смертью;

в) наиболее часто содержат вирус — печень, селезенка, легкие, головной мозг, лимфатические узлы, почки.

В лаборатории полученный патматериал освобождают от консерванта, взвешивают или измеряют и делят не менее чем на 2–3 порции. Затем, приняв во внимание содержание сопроводительного письма, количество материала, его состояние и качество, составляют план исследований. Предусматривают изучение материала не менее чем двумя методами с таким расчетом, чтобы получить по возможности быстрый ответ и затем подтвердить его более надежными методами, что дает высокую степень уверенности в правильности результата. Для этого и необходимо деление материала на порции (одну порцию оставляют еще в резерве).

В зависимости от предполагаемых методов исследования из патматериала готовят срезы, отпечатки, мазки или суспензию.

**Экспресс-методы.** Наиболее быстро удается найти в патматериале вирусные антигены (белки вирусов), вирусные геномы (нуклеиновые кислоты вирусов), тельца-включения и вирионы. Методы их обнаружения объединяются в группу экспресс-методов, а постановка диагноза с их помощью называется экспресс-диагностикой.

**Обнаружение вирусных антигенов.** Для обнаружения в патматериале вирусных антигенов можно воспользоваться любой серологической реакцией, используя в качестве антигена патматериал (непосредственно или после соответствующей обработки), а в качестве антител — гипериммунные сыворотки с заведомо известными антителами (готовятся заранее). Это можно сделать лучше всего с помощью реакций иммунофлуоресценции (РИФ), связывания комплемента (РСК) или диффузионной преципитации (РДП) в агаровом геле, а также методом иммуноферментного анализа, или реакцией непрямой гемагглютинации (РНГА).

Метод иммунофлуоресценции позволяет уже через 2–4 ч получить ответ на вопрос, имеется ли в патматериале антиген определенного вида вируса. Достоинства метода кроме быстроты получения ответа: простота техники, минимальная потребность в компонентах, нетребовательность к чистоте исследуемого материала, высокая чувствительность, универсальность. Недостатки РИФ: возможность случаев неспецифического свечения и перекрестных реакций между родственными антигенами.

Вирусный антиген в патматериале может быть обнаружен и с помощью РСК. Однако эта реакция менее чувствительна, чем

РИФ. Для ее постановки необходимо иметь определенный минимум патматериала с достаточной концентрацией (титром) в нем вирусного антигена. Кроме того, из патматериала необходимо получить суспензию, осветлить ее и подвергнуть обработке по освобождению от антикомплémentарности (выбор метода обработки зависит от вида и состояния патматериала, а также от имеющихся в лаборатории возможностей). РСК — довольно трудоемкая реакция и требует точного предварительного титрования компонентов. Несмотря на это, она находит довольно широкое применение в практике.

Еще менее чувствительна РДП.

Названные серологические реакции позволяют относительно быстро (не более чем за 2–3 дня) обнаружить в патматериале антигены вирусов и одновременно установить их видовую принадлежность. Лучшей из них следует признать РИФ.

**Обнаружение вирусных нукleinовых кислот.** Обнаружить в патматериале вирусные нуклеиновые кислоты можно с помощью ДНК-зондов или методом полимеразной цепной реакции. ДНК-зонд — это одноцепочный участок вирусной ДНК, нарабатываемый путем встраивания в бактериальную плазмиду и содержащий радиоактивную (или другую) метку. Будучи приведен в контакт с патологическим материалом, содержащим предварительно денатурированные молекулы вирусной ДНК, образует с ними двойные цепи по принципу комплементарности. После удаления всех одноцепочных молекул ДНК вновь образовавшиеся двухцепочные молекулы обнаруживаются по радиоактивной (или другой) метке. Их обнаружение указывает на наличие в патологическом материале нуклеиновой кислоты (генов) того вируса, на который был получен зонд.

В случае применения полимеразной цепной реакции наработка одноцепочных участков вирусной ДНК осуществляется методом амплификации.

**Обнаружение тельца-включений.** О присутствии некоторых вирусов в организме животного можно судить по обнаружению в патматериале вирусных тельца-включений. Последние представляют собой скопления (колонии) зрелых вирионов в клетках, где шла их репродукция, или массы клеточного материала, измененного под влиянием репродукции вируса. Часто тельца-включения представляют собой комбинацию того и другого. Тельца-включения, образуемые разными вирусами, различаются между собой, и это позволяет по их обнаружению судить о присутствии определенного вируса. Известно около 100 видов вирусов, которые при репродукции в клетках образуют тельца-включения, но практическое значение имеют весьма немногие из них.

Наибольшее диагностическое значение имеют тельца-включения, образуемые вирусом бешенства в цитоплазме нервных клеток млекопитающих и называемые тельцами Бабеша—Негри.

Тельца-включения образуются вирусами оспы овец (тельца Борреля), оспы птиц (тельца Боллингера), чумы собак (тельца Лектуа), инфекционного ларинготрахеита кур (тельца Зейфрида) и многими другими вирусами. Однако вследствие непостоянства их нахождения и отсутствия специфических методов выявления (применяют обиные обзорные окраски) тельца-включения практически имеют лишь вспомогательное диагностическое значение (за исключением телец Бабеша—Негри).

Обнаружение вирионов (элементарных телец вирусов). Вирионы можно обнаружить в патматериале с помощью электронной микроскопии. Только вирусы млекопитающих и птиц, имеющие вирионы размером более 250 нм, могут быть обнаружены в патматериале с помощью световой микроскопии. Этот метод, получивший название вирусоскопии, сводится к тому, что у больного животного срезают папиллу (или везикулу) и делают мазки на предметном стекле. Высохшие мазки окрашивают аммиачным серебром по Морозову и исследуют под микроскопом с масляной иммерсией. Метод вирусоскопии на оспу очень прост, но требует значительного опыта по распознаванию элементарных телец. Положительная вирусоскопия в сочетании с положительной биопробой достаточны для постановки диагноза на оспу.

Биопроба и иммунологическая проба. К методам экспресс-диагностики примыкает и биопроба, хотя отнести ее к экспресс-методам можно только условно (тоже иммунологическая проба). Биопроба — это экспериментальное заражение материалом от больных животных лабораторных или естественно восприимчивых животных (хотя в более широком толковании это заражение любых живых объектов). Ставить биопробу имеет смысл только в тех случаях, когда можно надеяться на получение характерной клинической картины болезни или характерных патологоанатомических изменений. Таких болезней совсем немногого. В частности, при подозрении на болезнь Аусески ставят биопробу на кроликах, на бешенство — на мышатах, на везикулярный стоматит — на морских свинках или белых мышах, на ящур — на новорожденных мышатах и морских свинках, на чуму крупного рогатого скота — на телятах, на контактную эктому и оспу овец — на ягнятах, на инфекционный ларинготрахеит и инфекционный бронхит — на цыплятах. Иммунологическая проба включает биопробу на иммунных и неиммунных животных, что позволяет идентифицировать и дифференцировать болезнь. Так, на чуму крупного рогатого скота иммунологическую пробу ставят на телятах, на африканскую чуму свиней — на подсвинках.

Биопроба и особенно иммунологическая проба на естественно восприимчивых животных — дорогостоящие и часто трудно выполнимые, поэтому их ставят редко. Биопробу на лабораторных животных применяют чаще, но и она не всегда гарантирует точный ответ.

Оценивая методы экспресс-диагностики в целом, следует отметить, что все они позволяют сравнительно быстро получить ответ на вопрос о наличии и виде вируса в патологическом материале, а значит, и в организме животного, от которого взят материал. В этом и состоит их главное достоинство. Однако степень достоверности полученного ответа, как правило, не очень высока, поэтому экспресс-диагноз нуждается в подтверждении другими методами. В этой связи полученный на исследование патматериал только частично расходуют на исследование экспресс-методами, с тем, чтобы другую его часть исследовать иными, в основном вирусологическими методами. Практически оба направления исследования начинают одновременно, но ответ получают вначале от экспресс-методов, а затем от других методов, которые должны подтвердить правильность экспресс-диагноза или уточнить его.

**Вирусологические методы.** Сюда относятся методы, предполагающие обнаружение (индикацию) в патматериале активных форм вирусов и последующую их идентификацию. Индикация вирусов обычно осуществляется путем биопробы на чувствительных живых лабораторных объектах, а идентификация — в серологических реакциях. Вирусологическими эти методы можно назвать только условно в связи с поисками активного вируса (истинно вирусологическая задача), так как задачи других методов лабораторной диагностики — также обнаружение и идентификация вирусов, но в неактивной форме, или только «следов» их пребывания в организме.

Для исследования вирусологическими методами патматериал должен быть взят стерильно, а вирус в нем хорошо законсервирован. В лаборатории из него готовят взвесь (сuspension), которую последовательно освобождают от частиц материала (центрифугированием) и от бактерий и грибов (антибиотиками или фильтрацией).

Обнаружение вируса. Полученной супензией, которая предположительно должна содержать вирус, заражают чувствительные лабораторные объекты, в качестве которых используют лабораторных животных, куриные эмбрионы, культуры клеток. Пути и методы заражения определяются тропизмом предполагаемого вируса (или вирусов), выбор объекта зависит от происхождения патматериала и чувствительности объектов к предположительно находящемуся в материале вирусу.

При выборе лабораторного объекта, на котором предполагается произвести индикацию вируса, руководствуются данными клинико-эпизоотологического диагноза, видом животного, от которого получен патматериал, и видом самого патматериала. Совокупность этих данных в огромном большинстве случаев позволяет выбрать необходимую лабораторную систему и метод ее заражения. Так, в патматериале, полученном от больных птиц, целесооб-

разно искать вирус путем заражения куриных эмбрионов. При этом исходят из того простого рассуждения, что если скоро вирус размножался в организме взрослой курицы, то и в менее защищенном курином эмбрионе он должен, безусловно, размножаться (бывают и исключения). Если патматериал получен от млекопитающих, то имеет смысл пытаться обнаружить в нем вирус путем заражения культур клеток, полученных из органов того же вида животного, от которого был взят патматериал. При этом исходят из того же предположения, что вирус в патматериале уже адаптирован к клеткам определенного вида животных и можно надеяться получить ЦПД относительно быстро.

Наиболее трудно подобрать вид лабораторных животных для индикации вируса в патматериале. Здесь остается ориентироваться только на предварительный диагноз, который должен определять наиболее вероятный вид (или виды) возбудителя инфекции, и, основываясь на свойствах таковых, подобрать чувствительный к возбудителю вид лабораторных животных. Что касается пути экспериментального заражения лабораторных животных, то надо стремиться, чтобы вирус попадал в тот же тип клеток, в каком он присутствовал в патматериале (т. е. суспензией мозга надо заражать в мозг, суспензией печени — внутрибрюшинно, суспензией легких или смытом верхних дыхательных путей — в нос и т. д.), учитывая тропизм вирусов.

Все же, несмотря на вышесказанное, при обнаружении вирусов в патматериале довольно часто случается, что в первом пассаже лабораторные системы не дают видимой реакции на вирус. Это происходит потому, что вирус оказался недостаточно адаптированным к лабораторной системе или его количество недостаточно для проявления специфической реакции. В таком случае первый пассаж считают «слепым». Из зараженных лабораторных систем собирают вирусодержащий материал и им заражают новую партию тех же лабораторных систем, т. е. производят второй пассаж вируса. Если и второй пассаж не покажет реакции на вирус, его тоже считают «слепым» и проводят третий. Иногда только на 10-м пассаже вирус начинает проявлять специфическое действие, так как он к этому моменту уже достаточно адаптировался к лабораторной системе и накопился в количестве, обеспечивающем характерную для данной системы реакцию на вирус. Обычно же ведут 3—4 «слепых» пассажа.

**Выделение вируса.** Материал, полученный от характерно реагирующей на заражение лабораторной системы, считается выделенным вирусом и может быть использован для изучения его свойств.

**Идентификация вируса.** Итак, тем или иным путем активный вирус в патматериале обнаружен. Теперь надо установить, какой это вирус, идентифицировать его. В ряде случаев уже в процессе индикации удается составить представление, с каким виру-

сом имеют дело. Этому помогают учет вида животного, от которого получен патматериал, вид чувствительной лабораторной системы, характер проявления действия вируса на лабораторный объект и др.

Еще точнее и надежнее установить вид вируса можно после изучения таких его свойств, как способность вызывать гемагглютинацию и гемадсорбцию, чувствительность к эфиру. Но окончательно идентифицировать обнаруженный вирус можно только с помощью одной из подходящих серологических реакций. Изучаемый вирус в этом случае служит антигеном, а в качестве специфических сывороток используют заранее подготовленные и хранимые в лаборатории (в консервированном виде) антисыворотки к различным, но часто встречающимся вирусам.

Естественно, что для изучения свойств обнаруженного вируса и использования его в качестве антигена необходимо получить достаточное количество суспензии этого вируса. Поэтому перед идентификацией обнаруженный вирус размножают путем нескольких пассажей на той же лабораторной системе, на которой он был обнаружен.

Выбор серологической реакции для окончательной идентификации вируса определяется в основном свойствами самого вируса и в меньшей степени наличием возможностей поставить ту или иную серологическую реакцию. Так, если вирус проявил гемагглютинирующие свойства, его идентификацию проще всего и вполне надежно можно осуществить в реакции торможения гемагглютинации. Если вирус выделяли на культуре клеток и он проявил гемадсорбирующие свойства, есть смысл идентифицировать его в реакции торможения гемадсорбции.

При отсутствии же названных свойств у выделенного вируса надежно идентифицировать его можно в реакции нейтрализации на том лабораторном объекте, на котором он был обнаружен. Однако при этом учитывается, что РН довольно трудоемкая, длительная и подчас дорогостоящая. Поэтому можно воспользоваться реакцией диффузионной пропицации в агаровом геле. Эта реакция проста по технике, быстро дает ответ, требует крайне малого количества ингредиентов, но она отличается низкой чувствительностью и поэтому может быть использована только в том случае, когда и антиген, и сыворотка взяты в высоких титрах (а это не часто удается получить).

Можно также воспользоваться РСК. Однако она достаточно трудоемка и требовательна к компонентам, для нее пригодны только растворимые антигены и к тому же свободные (или освобожденные) от антисывороточных свойств. Поэтому РСК пригодна не для каждого вируса.

Наиболее универсальна для идентификации выделенного вируса реакция иммунофлуоресценции (РИФ). При наличии меченых флуорохромом специфических сывороток на предполагаемый

вирус можно довольно легко и быстро его идентифицировать. Аналогичные возможности при наличии соответствующих диагностических препаратов дают РНГА и метод ИФА.

Доказательство этиологической роли выделенного вируса. Если серологическая реакция подобрана и обнаруженный вирус идентифицирован, то еще остается доказать его этиологическую роль в заболевании животного (животных). Такая роль может считаться доказанной, если будет установлено нарастание титра антител к выделенному вирусу в парных сыворотках от животных, послуживших источником получения патологического материала. А это требует дополнительных исследований. Иногда для доказательства этиологической роли выделенного вируса в заболевании животных пытаются воспроизвести это заболевание на здоровых животных (обычно молодняке) того же вида путем заражения их выделенным вирусом. Однако этот метод кроме дороговизны имеет и тот недостаток, что далеко не всегда гарантирует возможность воспроизведения болезни. В целом диагноз на основании вирусологических исследований патматериала может считаться достаточно уверенным. Однако он сопряжен с длительными и трудоемкими исследованиями.

**Методы серологической диагностики.** Серологическим исследованиям подлежат сыворотки крови больных животных. Обычно используют парные сыворотки, для получения которых от каждого животного кровь берут дважды с интервалом в 2—3 нед. Для получения парных сывороток кровь необходимо брать в начале и в конце болезни, но практически уловить эти сроки удается редко. Брать кровь и получать из нее сыворотки необходимо в асептических условиях, чтобы сыворотки были стерильными. Хранить их до исследования необходимо под пробками в холодильнике или в замороженном (минус 25 °С и ниже) состоянии.

Задача сводится к установлению в парных сыворотках титра антител к вирусам, которые предположительно могли быть возбудителями болезней животных, от которых получены сыворотки. Основанием для предположения, к каким вирусам искать антитела, служит предварительный диагноз, поставленный по данным эпизоотологических наблюдений, клинических симптомов и патологоанатомических изменений. Наличие в сыворотках антител и их титры определяют в серологических реакциях с использованием антигенов предполагаемых вирусов (таковые должны быть в лаборатории, их готовят заблаговременно на биофабриках). Такие биопрепараты называют специфическими антигенами, а иногда — стандартными, эталонными вирусами.

Выбор серологической реакции определяется тем, какая из них наиболее пригодна для работы с данным вирусом, а также возможностями лаборатории и квалификацией персонала. При этом также учитываются быстрота получения ответа и трудоем-

кость работы. Проще всего задача решается, если вирус, к которому ищут в сыворотках антитела, обладает гемагглютинирующими свойствами. В этом случае поиск и титрование антител имеют смысл производить в *реакции торможения гемагглютинации* (РТГА) как наиболее простой по технике и быстро дающей ответ.

Простотой техники использования и быстротой отличается также *реакция диффузной преципитации в агаровом геле* (РДП). Но она требует, чтобы антиген и антитело были в высоком титре, так как в противном случае полосы преципитации получаются неяркие или совсем не получаются. К тому же в этой реакции затруднительно произвести уверенное титрование антител. Все это заставляет использовать РДП только в случаях, когда необходимо получить быстрый ответ о наличии антител к неагглютинирующему вирусу и не требуется точного определения титра антител в сыворотках, т. е. только для предварительной ориентировки.

*Реакция непрямой гемагглютинации* (РНГА) является высокочувствительным и универсальным тестом для определения титра антител к различным вирусам в сыворотках крови. Ответ она дает быстро. Но для ее постановки необходимо иметь резерв консервированных эритроцитов, сенсибилизованных разными вирусами.

*Имуноферментный анализ* (ИФА) позволяет определять титр антител и с учетом воспроизведения его микрометодом с использованием современного лабораторного оборудования дает возможность проводить широкомасштабные эпизоотологические исследования.

*Реакция связывания комплемента* (РСК) может быть использована для определения титра антител ко многим вирусам, если этап связывания комплемента вести длительно на холоде. Однако РСК требует наличия соответствующим образом подготовленных антигенов, отличается трудоемкостью и требовательностью к точности дозировки компонентов. Тем не менее подавляющее большинство практических работников владеет техникой постановки РСК и широко ее использует в диагностической работе.

Наиболее достоверные результаты по титрованию антител практически к любым вирусам (кроме бешенства и чумы свиней) дает *реакция нейтрализации* (РН). К тому же она позволяет обнаруживать вируснейтрализующие антитела, которые непосредственно создают в организме защиту против вирусов. Но эта реакция требует для постановки значительного времени, она трудоемка, требует стерильных условий.

После установления титра антител в парных сыворотках результаты интерпретируют, исходя из динамики титра. Считается, что нарастание в 4 раза и более титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой уверенно свидетельствует об активном инфекционном процессе, протекающем в организме животного в период взятия у него крови. При этом болезнь была вызва-

на тем возбудителем, к которому было найдено повышение титра антител в парных сыворотках.

Недостаток метода серологической диагностики — его ретроспективность, так как к моменту постановки диагноза животное, от которого получены парные сыворотки, уже или выздоровело, или пало. Однако поставленный серологическими методами диагноз дает уверенные представления о болезни и имеет важное значение для мероприятий по ликвидации вспышки вирусной болезни или ее эпизоотии. (Хотя для самих животных, от которых получены парные сыворотки, диагноз уже и потерял значение.)

Последовательность этапов лабораторной диагностики вирусных болезней животных, их целевое назначение и методическое решение отражены в схеме, представленной на первом развороте практикума.

Однако в каждом конкретном случае методы выполнения отдельных этапов различны, что зависит от таких факторов, как вид животного, тропизм и другие биологические свойства вируса, вызвавшего заболевание, обеспеченность лаборатории необходимыми диагностическими препаратами.

Врач-вирусолог лаборатории изучает изложенные в сопроводительном письме клинико-эпизоотологические данные, знакомится с предварительным диагнозом, поставленным ветеринарным врачом хозяйства.

**Пример решения диагностической задачи.** В хозяйстве откормочного типа через 15—20 дней после формирования сборного стада крупного рогатого скота заболели телята. Заболевание протекало со следующими клиническими признаками: повышение температуры тела до 41,5 °С, слезотечение, слизистые истечения из носовой полости, у некоторых животных понос, затрудненное дыхание, кашель. Летальность — 3 %.

На вскрытии павших и вынужденно убитых животных установлено: увеличены и гиперемированы заглоточные, бронхиальные и средостенные лимфатические узлы; слизистая оболочка трахеи и бронхов гиперемирована, покрыта слизистым экссудатом; легкие гиперемированы с участками уплотнения; слизистая оболочка кишечника катарально воспалена, у некоторых телят эрозии в ротовой полости.

Предварительный диагноз — инфекционный ринотрахеит (ИРТ) крупного рогатого скота, или парагрипп (ПГ-3) крупного рогатого скота. Список предполагаемых болезней по описанному симптомокомплексу можно было бы продолжить.

На исследование направлены следующие патматериалы: смывы со слизистой оболочки носа, горлани, конъюнктивы, прямой кишечник, парные сыворотки; от трупа кусочки слизистой оболочки носа, трахеи, легких, селезенки, почек, пораженного участка кишечника, средостенные и мезентеральные лимфоузлы.

Пользуясь справочной литературой и утвержденными Наставлениями по диагностике ИРТ и ПГ-3 врач составляет план диагностических исследований для дифференциальной лабораторной диагностики двух предполагаемых заболеваний.

1. Обнаружение вируса:

а) получить мазки-отпечатки из патматериала и исследовать их в РИФ (прямым или непрямым методом) со специфическими (или со стандартными) мечеными сыворотками (SS) к вирусу ПГ-3 и вирусу ИРТ;

б) обнаружить в патматериале активный вирус биопробой на чувствительной к обоим вирусам культуре клеток (ПЭК, ТБ). Реакция биопробы на заражение — ЦПД при размножении вирусов ИРТ или ПГ-3 и РГ-3 с эритроцитами морской свинки при размножении в культуре клеток вируса ПГ-3.

2. Выделение вируса. В случае положительной биопробы выделенным вирусом будет вирусодержащая культуральная жидкость.

3. Идентификация, т. е. установление вида выделенного вируса, производится серологическими реакциями с использованием специфических (или стандартных) сывороток в РИФ и РН для вируса ИРТ и, что менее трудоемко, реакцией торможения гемагглютинации (РТГАд) для вируса ПГ-3.

4. Доказательство этиологической роли выделенного вируса имеет целью установить является ли выделенный вирус причиной болезни. Для ответа на этот вопрос серологическими реакциями определяют титры антител в парных сыворотках, полученных от больных животных. В качестве антигена в реакции на этом этапе диагностики используют выделенный вирус. Решение поставленного вопроса для диагностики ИРТ проводится в РН, а для ПГ-3 — в РТГА.

5. Ретроспективную серологическую диагностику проводят в том случае, если из патматериала выделить вирус не удалось или эту работу не проводили. Объектом исследований служат парные сыворотки, полученные от больных животных, и специфический (или стандартный, эталонный) антиген, изготовленный биофабрикой. Для диагностики ИРТ этот этап исследований проводится в РНГА или ИФА, а для вируса ПГ-3 — в РНГА или РТГА.

Этиологическая роль в возникновении заболевания выделенного вируса в исследованиях по п. 4 или стандартного вируса в исследованиях по п. 5 считается установленной, если во второй сыворотке титр антител к вирусу возрос в 4 раза и больше по сравнению с титром антител в первой сыворотке.

Результаты лабораторной диагностики в дополнение к клинико-эпизоотологическим исследованиям позволяют поставить окончательный диагноз.

Описанный выше план лабораторных исследований может быть записан в форме таблицы (табл. 16), что сделает его более наглядным.

## 16. Примерный план дифференциальной лабораторной диагностики ИРГ и ПГ-3 крупного рогатого скота

| Предварительный диагноз                          | Этапы диагностики  |                          |                  |                                  |  |  |            |
|--|--------------------|--------------------------|------------------|----------------------------------|--|--|------------|
|  | обнаружение вируса |                          | выделение вируса | идентификация выделенного вируса | доказательство этиологической роли выделенного вириуса | ретроспективная серологическая диагностика |            |
|  | экспресс-метод     | биопроба                 |                  |                                  |  |  |            |
| Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота | РИФ с SS-ИРГ       | Культура клеток, ПЭК, ТБ | ЦПД              | На культуре клеток               | РИФ, РН  | РН   | РНГА, ИФА  |
| Парагрипп крупного рогатого скота                | РИФ с SS-ПГ-3      | Культура клеток, ПЭК, ТБ | ЦПД, РГАд        | На культуре клеток               | РТГАд  | РТГА                                       | РНГА, РТГА |

### Задание

Пользуясь справочной литературой, продолжить перечень инфекций, которые могут быть включены в список «Предварительный диагноз» при описанных на с. 174 признаках болезни. Разработать примерный план их дифференциальной диагностики, внести как продолжение в таблицу 16.

### Примерный план занятия (2 ч)

1. Контрольные вопросы.
2. Разбор и контроль усвоемости изложенной в практикуме (с. 174) диагностической задачи и методики ее решения.
3. Самостоятельная работа студентов: а) изучение справочной литературы с целью постановки предварительного диагноза по заданным клиническим симптомам и патологоанатомическим изменениям; б) составление примерного плана лабораторных исследований полученного патматериала с целью дифференцировать каждое из предполагаемых заболеваний.
4. Коллективный разбор результатов работы.
5. Подведение итогов занятия.

### Контрольные вопросы

1. Как поставить предварительный диагноз на вирусные болезни животных?
2. Чем руководствоваться при отборе патматериала?
3. Какова цель лабораторных исследований и каковы основы методического их выполнения?

**Методические указания.** Решение диагностической задачи должно быть тщательно проработано преподавателем.

Разбор результатов работы студентов целесообразно провести в форме открытой дискуссии с вовлечением студентов всей группы. При этом решающее мнение должно оставаться за преподавателем.

На последующих занятиях студентам могут быть предложены другие диагностические задачи. При этом преподаватель должен использовать в них такие комплексы клинических признаков и патологоанатомических изменений, которые давали бы основание подозревать не одну, а несколько инфекций, для того чтобы возникла необходимость в их дифференцировке лабораторными методами.

# ЧАСТНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ

## Тема 1

### ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА БЕШЕНСТВА

Бешенство — острая инфекционная болезнь, протекающая с тяжелым поражением нервной системы, как правило, с летальным исходом. Восприимчивы человек и все млекопитающие животные.

Бешенство распространено повсеместно. Возбудителя инфекции передают собаки, кошки, дикие грызуны и хищники, а также летучие мыши.

Продолжительность инкубационного периода зависит от места и силы укуса, количества и вирулентности попавшего в рану вируса, резистентности покусанного животного. Инкубационный период длится от 1—3 нед до года и даже более.

Болезнь протекает остро. Клинические признаки ее в основном одинаковы у всех животных, но наиболее типичны они у собак, у которых может наблюдаться как буйное, так и тихое (паралитическое) течение болезни. У крупного рогатого скота бешенство может протекать атипично (потеря аппетита, атония рубца, паралич глотки, слюнотечение). Стадии возбуждения может не быть. Патологоанатомические изменения неспецифичны. У мясосъедных (в основном у собак) в желудке можно обнаружить несъедобные предметы.

Вирус бешенства обладает выраженной нейропробазией. Проникая с периферии (место укуса) по нервным стволам в центральную нервную систему центростремительно после репродукции распространяется в организме центробежно по периферическим нервам и попадает в разные органы, включая слюнные железы.

Вирус относится к семейству Rhabdoviridae, роду Lyssavirus. Вирионы имеют форму стержня с обрубленным концом. Вирион вируса — РНК-содержащий со спиральным типом симметрии, имеет липопротеидную оболочку. Низкие температуры консервируют вирус. Температура 60 °С убивает его через 5—10 мин, солнечный свет — за 5—7 дней. Растворы формалина, фенола, соляной кислоты (5%-ные) инактивируют вирус за 5—10 мин.

Вирион вируса бешенства содержит гликопротеидный (наружный) и нуклеокапсидный (внутренний) антигены. Гликопротеидный антиген индуцирует образование вируснейтрализующих антител, а нуклеокапсидный — комплементсвязывающих и пропитирующих антител.

Эпизоотические штаммы вируса бешенства в иммунобиологическом отношении родственны, но различаются по вирулентности.

В организме вирус локализуется главным образом в центральной нервной системе, а также в слюнных железах и слюне. Культивируется на мышах, кроликах, морских свинках и других животных, а также в первичных культурах клеток (почки сирийского хомячка, эмбриона овец, телят и др.) и перевиваемых клетках (ВНК-21, КЭМ-1 и др.). Размножение вируса в культурах клеток не всегда проявляется ЦПД. К вирусу бешенства после предварительной адаптации восприимчивы и куриные эмбрионы. Вирус индуцирует образование цитоплазматических телец-включенияй, которые чаще всего обнаруживаются в клетках аммонова рога, мозжечка, коры головного мозга.

Источником инфекции являются больные животные. Они передают вирус во время укуса. Плотоядные животные могут заражаться при поедании головного и спинного мозга погибших от бешенства животных. Доказана возможность заражения бешенством аэрогенным путем (в местах, где имеются летучие мыши). До 60-х годов основным источником распространения бешенства были собаки и кошки, позднее лисицы, волки, корсаки и другие дикие животные.

Диагноз на бешенство ставят на основании эпизоотологических, клинических данных и результатов лабораторных исследований, имеющих решающее значение.

При работе с больными животными и инфекционным материалом необходимо строго соблюдать меры личной безопасности: надевать резиновые перчатки, халаты с нарукавниками, резиновый или полиэтиленовый фартук, резиновые сапоги, защитные очки, защитную маску на лицо.

Вскрывать подозрительных на заболевание бешенством животных в полевых условиях запрещено.

**Получение патматериала.** Для исследования на бешенство направляют в лабораторию свежие трупы мелких животных целиком, а от крупных и средних животных — голову с двумя первыми шейными позвонками. Трупы мелких животных перед отправкой на исследование обрабатывают инсектицидами.

Патологический материал упаковывают в пластмассовые мешки, вкладывают в плотно закрывающиеся ящики с влагоглощающей прокладкой, пропитанной дезинфектантом. Материал и сопроводительное письмо, в котором указаны отправитель и его адрес, вид животного, анамнестические данные и обоснование подозрения в заболевании животного бешенством, дата и подпись врача, отправляют с нарочным.

**Лабораторная диагностика.** Она включает: обнаружение вирусного антигена в РИФ и РДП, телец Бабеша—Негри и биопробы на белых мышатах.

**РИФ.** Для данной реакции биопромышленность выпускает флуоресцирующий антирабический гамма-глобулин.

**Методика постановки РИФ.** На обезжиренных предметных стеклах готовят тонкие отпечатки или мазки из различных отделов головного мозга левой и правой стороны (аммонов рог, кора полушарий, мозжечок и продолговатый мозг). Готовят не менее двух препаратов каждого отдела мозга. Можно также исследовать спинной мозг, подчелюстные слюнные железы. Для контроля делают препараты из мозга здорового животного (обычно белой мыши).

Препараты высушивают на воздухе, фиксируют в охлажденном ацетоне (минус 15 — минус 20 °C) от 4 до 12 ч, высушивают на воздухе, наносят флуоресцирующий гамма-глобулин, помещают во влажную камеру при 37 °C на 25—30 мин, затем тщательно промывают физиологическим раствором или фосфатным буфером с pH 7,4, споласкивают дистиллированной водой, высушивают на воздухе, наносят нефлуоресцирующее иммерсионное масло и просматривают под люминесцентным микроскопом. В препаратах, содержащих антиген вируса бешенства, наблюдаются разной величины и формы флуоресцирующие желто-зеленым цветом гранулы в нейронах, но чаще вне клеток (см. рис. 61). В контроле подобного свечения не должно быть, нервная ткань обычно светится тусклым сероватым или зеленоватым цветом. Интенсивность свечения оценивают в крестах. Отрицательным считают результат при отсутствии специфической флуоресценции.

Материал от животных, вакцинированных против бешенства, нельзя исследовать в РИФ в течение 3 мес после прививки, так как может быть флуоресценция антигена вакцинного вируса.

В РИФ не подлежат исследованию ткани, консервированные глицерином, формалином, спиртом и т. д., а также материал, имеющий признаки даже незначительного загнивания.

**РДП в агаровом геле.** Метод основан на свойстве антител и антигенов диффундировать в агаровом геле и при встрече образовывать видимые визуально линии преципитации (комплекс антиген + антитело). Применяют для обнаружения антигена в мозге животных, павших от уличного вируса бешенства, или при экспериментальной инфекции (биопроба).

**Методика постановки.** Реакцию ставят на предметных стеклах, на которые наливают 2,5—3 мл расплавленного 1,5%-ного раствора агара\*. После застывания в агаре делают лунки диаметром 4—5 мм по трафарету, помещенному под предметное стекло с агарам. Агаровые столбики вынимают ученическим пером. Лунки в агаре заполняют компонентами по схеме (рис. 71).

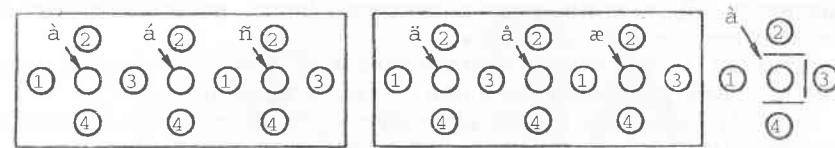


Рис. 71. Схема РДП при диагностике бешенства:

*a* и *b* — левое и правое полушария мозга; *c* и *d* — левый и правый аммоновы рога; *e* — мозжечок; *j* — продолговатый мозг; 1, 2, 3, 4 — разведения антирабического глобулина

От крупных животных исследуют все отделы головного мозга (левой и правой стороны), от средних (крысы, хомяки и др.) — какие-либо три отдела мозга, у мышей — весь мозг. С помощью пинцета из мозга готовят пастообразную массу, которую и помещают в соответствующие лунки.

Контроли с положительным и отрицательным антигенами ставят на отдельном стекле по тому же трафарету.

После заполнения лунок компонентами препараты помещают во влажную камеру и ставят в термостат при 37 °C на 6 ч, затем при комнатной температуре — на 18 ч. Учет результатов ведут в течение 48 ч.

Реакцию считают положительной при появлении одной или 2—3 линий преципитации любой интенсивности между лунками, содержащими супспензию мозга и антирабический гамма-глобулин.

Бактериальная нестерильность и загнивание мозга не препятствуют использованию его для РДП. Материал, консервированный глицерином, формалином и другими средствами, для РДП непригоден.

**Выявление телец Бабеша — Негри.** На предметных стеклах делают тонкие мазки или отпечатки из всех отделов головного мозга (как для РИФ), не менее двух препаратов с каждого отдела мозга, и окрашивают по одному из методов (по Селлерсу, Муромцеву, Манну, Ленцу и т. д.).

**Пример окраски по Селлерсу:** на свежий, невысохший препарат наливают краситель\*, покрывая им весь препарат, выдерживают 10—30 с и смывают фосфатным буфером (pH 7,0—7,5), высушивают в вертикальном положении при комнатной температуре (в затемненном месте) и просматривают под микроскопом с масляной иммерсией.

Положительным результатом считают наличие телец Бабеша — Негри — четко очерченных овальных или продолговатых гранули-

\*Агаровый гель: агар Дифко — 15 г, натрия хлорид — 8,5 г, 1%-ный раствор метилового оранжевого в 50%-ном этиловом спирте — 10 мл, мертиолят — 0,01 г, дистиллированная вода — 1000 мл.

\* Одна часть 1%-ного раствора основного фуксина, смешанная с двумя частями 1%-ного метиленового синего.

рованных образований розово-красного цвета, расположенных в цитоплазме клеток или вне их.

Данный метод имеет диагностическое значение только при обнаружении типичных специфических включений.

**Биопроба.** Она более эффективна по сравнению со всеми указанными выше методами. Ее ставят при получении отрицательных результатов предыдущими методами и в сомнительных случаях.

Для биопробы отбирают белых мышей массой 16—20 г, нервную ткань из всех отделов головного мозга растирают в ступке со стерильным песком, добавляют физиологический раствор до получения 10%-ной суспензии, отстаивают 30—40 мин и используют надосадочную жидкость для заражения мышат. При подозрении на бактериальное загрязнение добавляют на 1 мл суспензии 500 ЕД пенициллина и стрептомицина и выдерживают 30—40 мин при комнатной температуре.

На одну биопробу заражают 10—12 мышат: половину интракраниально по 0,03 мл, половину подкожно в область носика или в верхнюю губу по 0,1—0,2 мл.

Зараженных мышат помещают в стеклянные банки (лучше аквариумы) и наблюдают за ними в течение 30 дней, ведя ежедневную регистрацию. Гибель мышей в течение 48 ч считают неспецифической и не учитывают в оценке результатов. При наличии вируса бешенства в патматериале с 7—10-го дня после заражения у мышей наблюдают следующие симптомы: взъерошенность шерсти, своеобразную горбатость спины, нарушение координации движений, паралич задних, затем передних конечностей и гибель. У павших мышей головной мозг исследуют в РИФ (см. рис. 61 д, е), с помощью световой микроскопии проводят обнаружение телец Бабеша—Негри (рис. 72) и ставят РДП.

Биопробу на бешенство считают положительной, если в препаратах из мозга зараженных мышат обнаруживают телец Бабеша—Негри или выявляют антиген методами РИФ или РДП. Отрицательный диагноз — отсутствие гибели мышат в течение 30 дней.

Рекомендуют для ранней диагностики методом биопробы (особенно это важно, когда исследуемое животное покусало человека) использовать для заражения не 10—12 мышат, а 20—30, и начиная с третьего дня после заражения ежедневно забивать по 1—2 мышонка для исследования их головного мозга в РИФ. Это позволяет (в положительных случаях) сократить срок исследования на несколько дней.

В лабораторной практике иногда ставят метод так называемой специфической биопробы. Сущность его в том, что мыши заболевают при заражении мозговой тканью больных бешенством животных и не заболевают, если эту ткань предварительно обработать антирабической сывороткой (10 мин при 37°C).

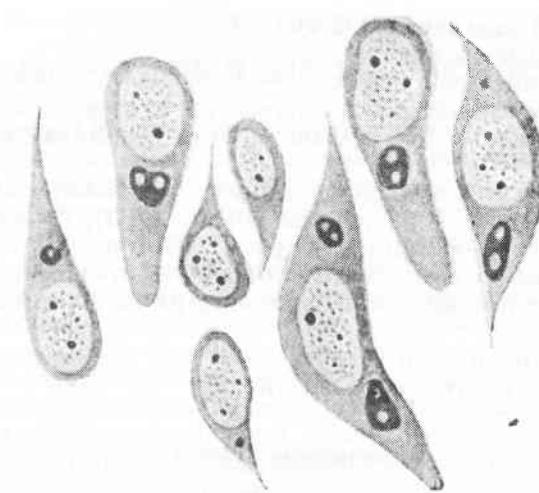


Рис. 72. Тельца Бабеша—Негри в нейронах аммонова рога

Некоторые исследователи рекомендуют проводить приживленную диагностику бешенства методом иммунофлуоресцентного исследования отпечатков роговицы подозреваемых в заболевании бешенством животных, но эффективность этого метода невысока.

Обычно в лаборатории проводят исследование в следующей последовательности: из головного мозга делают мазки-отпечатки для РИФ и обнаружения телец Бабеша—Негри, ставят РДП, при получении отрицательных результатов делают биопробу.

При высококвалифицированном выполнении РИФ получают 99—100 % совпадения с биопробой. Тельца Бабеша—Негри выявляют лишь в 65—85 % случаев бешенства, в РДП — 45—70 %.

### Задания

1. Изучить методы лабораторной диагностики бешенства.
2. Освоить постановку РИФ на бешенство: а) приготовить отпечатки из головного мозга белых мышей; б) обработать полученные препараты прямым методом иммунофлуоресценции; в) просмотреть в люминесцентном микроскопе заведомо положительные препараты.

**Материальное обеспечение:** люминесцентный микроскоп, термостат, масло иммерсионное нефлуоресцирующее, кюветы, предметные стекла, емкость для физиологического раствора и дистиллированной воды, чашки Петри, фильтровальная бумага, карандаши по стеклу, пинцеты, набор инструментов для вскрытия черепной полости и извлечения головного мозга у белой мыши, эфир, положительные препараты на бешенство (в РИФ, РДП, тельца Бабеша—Негри), белые мыши.

## Примерный план занятия (2 ч)

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Самостоятельная работа студентов: а) приготовление отпечатков из головного мозга мышей; б) фиксация и окрашивание препаратов в РИФ.

4. Демонстрация: а) наборов, выпускаемых биопромышленностью для диагностики бешенства (РИФ, РДП); б) препаратов с тельцами Бабеша—Негри (гистосрезы), РИФ и РДП.

5. Продолжение самостоятельной работы студентов: а) отмытие и просушивание препаратов; б) просмотр их под люминесцентным микроскопом.

6. Подведение итогов занятия.

7. Задание к следующему занятию.

### Контрольные вопросы

1. Назовите основные свойства вируса бешенства.
2. Расскажите о симптомах и эпизоотологических особенностях болезни, вызываемой вирусом бешенства.
3. Какие методы лабораторной диагностики бешенства вы знаете?
4. Каковы правила работы с материалом, полученным от животных, подозреваемых в заболевании бешенством?

**Методические указания.** Ввиду дефицита времени к данному занятию необходимо заранее подготовить следующий демонстрационный материал: а) положительные мазки-отпечатки для РИФ, которые можно приготовить из мозга мышей, зараженных вирусом фикс, но лучше и более эффективны мазки из мозга с уличным вирусом бешенства, которые можно взять в ветеринарной лаборатории; б) препараты с тельцами Бабеша—Негри (гистосрезы); в) поставить РДП, используя компоненты из диагностического набора на бешенство или любой другой материал, дающий положительную реакцию в РДП.

На занятии, возможно, нет необходимости всем студентам вскрывать белых мышей, так как они это делали при прохождении темы «Лабораторные животные». Лучше использовать заранее вскрытых мышей, из головного мозга которых студенты сделают мазки-отпечатки. Пока препараты окрашиваются, преподаватель демонстрирует все методы лабораторной диагностики.

Для данного занятия при отработке метода РИФ берут здоровых мышей. В дальнейшем эти препараты будут служить контролем (отрицательным), а препараты от больных мышей (положительные) демонстрируют параллельно в другом люминесцентном микроскопе.

По другому варианту заранее вскрывают белую мышь, зараженную вирусом фикс, из мозга которой студенты будут делать препараты.

## Т е м а 2

### ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ОСПЫ

Оспой болеют более 23 видов млекопитающих, 5 видов птиц и 16 видов насекомых. Одни вирусы оспы вызывают болезнь у животных только определенных видов, другие — нескольких видов. У одних животных оспа вызывается только одним возбудителем, у других кроме своего (генунинного) еще двумя-тремя вирусами.

Клинически оспа у всех животных протекает хотя и неодинаково, но очень сходно. Поражения наблюдаются на слизистых оболочках и коже преимущественно на бесшерстных (бесперьевых) участках тела с одновременной генерализацией процесса. В типичном случае поражения кожи и слизистых оболочек состоят в образовании розеол (покраснений), переходящих в папулы (припухлости) и везикулы (пузырьки). Последние превращаются в пустулы, разрывы которых сопровождаются вытеканием жидкости, засыхающей в виде корок с эрозиями под ними (струп). После заживления эрозий корки отпадают и остаются небольшие рубцы.

Из признаков генерализации процесса для оспы характерны лихорадка, вялость, потеря аппетита, отек подкожной клетчатки. У кур — дифтероидные наложения в дыхательных путях.

Вирусы оспы образуют вирионы, размер которых достигает  $260 \times 390$  нм. Они являются гигантами среди вирионов других вирусов. Их можно видеть не только под электронным, но и под световым микроскопом.

Оспа легко передается от больных животных здоровым различными путями. Легко удается и экспериментальное заражение животных. Некоторые вирусы оспы способны размножаться на хорионикаллантоисной оболочке куриных эмбрионов, образуя характерные некротические узелки — осины (их морфология у разных вирусов неодинакова). Размножаются осипенные вирусы и на первичных культурах клеток своего вида животных с образованием ЦПД. Подобно другим вирусам, антигены осипенных вирусов обнаруживаются в различных материалах с помощью МФА и РДП.

Диагноз на оспу обычно нетрудно поставить на основании симптомов болезни с учетом эпизоотологических данных. Однако рекомендуется подтвердить клинико-эпизоотологический диагноз данными лабораторных исследований, основанных на свойствах вирусов оспы.

**Лабораторная диагностика.** Из лабораторных методов универсальным можно считать вирусоскопию — обнаружение в материале от больных животных вирионов осипенных вирусов с помощью световой микроскопии. Для этого с участка кожи или слизистой оболочки с осипенным поражением (лучше на стадиях папулы или везикулы) готовят мазки на предметных стеклах. Мазки окра-

шивают различными методами, из которых наибольшее признание получил метод серебрения по М. А. Морозову.

Окраска мазков на оспу по М. А. Морозову. Готовят три реактива.

*Реактив № 1* (жидкость Руге): 1 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл 40%-ного раствора формальдегида и 100 мл дистиллированной воды соединить в одном сосуде.

*Реактив № 2* (протрава): 5 г танина растворить в 100 мл дистиллированной воды и добавить 1 мл жидкой карболовой кислоты (фенола). Чтобы превратить кристаллическую карболовую кислоту в жидкую, ее надо расплавить на водяной бане при 56 °С. Танин следует применять только хороших сортов. Для испытания на чистоту 1 г танина растворить в 5 мл воды и добавить 10 мл 90%-ного спирта. В течение 1 ч не должно появиться помутнения (декстрин, камель). Не должно быть помутнения (сахар, соли) и при последующем добавлении 5 мл эфира.

*Реактив № 3* (раствор аммиачного серебра): растворить 5 г кристаллического азотнокислого серебра в 100 мл дистиллированной воды. От общего раствора отлить в другой сосуд небольшую (при мерно десятую) часть. К оставшемуся раствору по каплям добавить крепкий (25%-ный) раствор аммиака. Вначале образуется плотный буро-черный осадок, который при дальнейшем добавлении аммиака растворяется. Задача состоит в том, чтобы не довести до полного растворения осадка, а добиться получения слегка мутного (опалесцирующего) раствора. Если это не удалось и раствор стал полностью прозрачным, по каплям надо добавить раствор азотнокислого серебра из отлитой вначале части до помутнения основного раствора. Добавляя по каплям в основной раствор то аммиак, то азотнокислое серебро, надо добиться опалесценции. Полученный опалесцирующий раствор надо развести дистиллированной водой 1 : 10 и использовать для окраски препаратов. Раствор очень стоек, но его надо хранить в темноте в склянке с притертой пробкой.

Методика окрашивания по М. А. Морозову: обрабатывают препарат реактивом № 1 3—5 мин, промывают дистиллированной водой; опускают в реактив № 2 с подогревом (до появления пара) на 1—2 мин, тщательно отмывают дистиллированной водой; обрабатывают реактивом № 3 при легком подогреве до появления темно-коричневой окраски (1—2 мин), тщательно отмывают дистиллированной водой; сушат на воздухе и исследуют с масляной иммерсией под микроскопом. Результат: на желтом фоне мелкие темно-коричневые тельца округло-овальной формы, лежащие скоплениями, рядами или дифузной массой, но раздельно. Эти тельца и есть вирионы оспенных вирусов (рис. 73).

Окрашивать удобно над эмалированными кюветами (18 × 24 см) с положенными на их края «мостиками» (две пипетки на 1—2 мл, со-

единенные на обоих концах резиновыми трубками подходящего диаметра). Для каждого реактива нужна своя пипетка (можно использовать помеченные глазные пипетки, вставляемые в проволочные гнезда флаконов с реактивами).

Достоинства метода вирусоскопии: быстрота получения ответа, простота и доступность техники исполнения. Недостатки его: метод дает четкие результаты только при исследовании мазков визулярной жидкости (при исследовании пустул и корок результаты значительно снижаются), не позволяет дифференцировать разные вирусы оспенной группы и нелегко отличать вирионы от сходных по форме клеточных элементов (во всяком случае, исследователь должен обладать значительным опытом).

**Биопроба.** Это второй широко применяемый при диагностике оспы метод. Биопроба на оспу всегда удается на естественно восприимчивых животных и на первичных культурах клеток этих же видов животных. К вирусам осповакцины, оспы коров и оспы лошадей чувствительны кролики, а куриные эмбрионы чувствительны не только к вирусу оспы кур, но и к вирусам осповакцины, оспы коров, верблюдов и голубей. Все оспенные вирусы дермотропные, и поэтому экспериментальное заражение ими удается при введении внутрикожно (рис. 74).

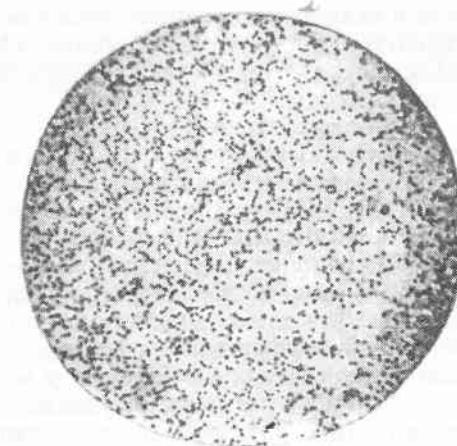


Рис. 73. Вирусоскопия. Вирионы вируса оспы в окраске по М. А. Морозову (по С. С. Марениковой)

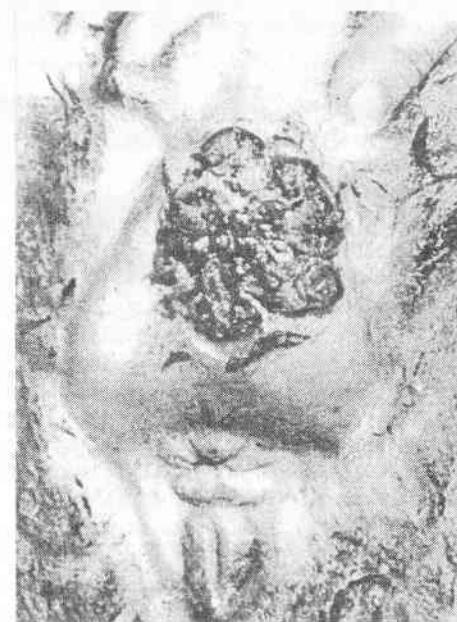


Рис. 74. Биопроба на оспу овец заражением в подхвостовую складку (по Н. И. Троценко)

или в скарифицированную кожу, а также на хорионаллантоисную оболочку куриных эмбрионов. (Методика внутрикожного заражения животных, а также куриных эмбрионов описана в соответствующих темах.)

Методика заражения петуха в скарифицированный гребень чрезвычайно проста и состоит в нанесении на кожу гребня неглубоких (не до крови) царапин с помощью инъекционной иглы или сломанной пастеровской пипетки с последующим втиранием в скарифицированный гребень супензии вируса ватным тампоном (на палочке) или постриженной зубной щеткой.

Петуха можно легко заразить оспой кур также в перьевые фолликулы. Для этого на голени петуха выщипывают перья и сразу же втирают в обнажившиеся фолликулы супензию вируса (тампоном или щеткой). Если в исследуемом материале был вирус оспы кур, то на 5–7-й день после заражения на гребне появляются характерные осины (рис. 75), а на голени — типичный для оспы фолликулит (рис. 76). В мазках из свежих осин или фолликулов нетрудно обнаружить методом вирусоскопии вирионы вируса оспы.

Заржение кролика в предварительно выбритый и скарифицированный участок кожи не отличается от заражения петуха в скарифицированный гребень.

Что касается МФА и РДП, то методика их использования при оспе принципиально не отличается от описанной в соответствующих темах.

### Задание

Поставить биопробу на оспу и произвести вирусоскопию.



Рис. 75. Оспенные поражения на гребне петуха

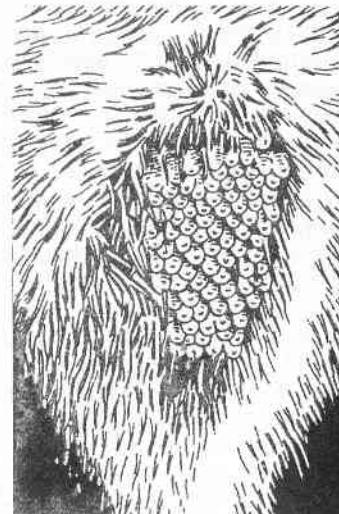


Рис. 76. Оспенный фолликулит у петуха

**Материальное обеспечение:** вирус оспы и чувствительные к нему живые объекты (петух, голуби, кролик); постриженная и простилизованная зубная щетка; стерильный ватный тампон на палочке; обезжиренные предметные стекла; лезвия безопасной бритвы; пинцеты; наборы реактивов № 1, 2, 3; иммерсионное масло; микроскопы с осветителями; горелки; дистиллированная вода.

### Примерный план занятия (2 ч)

1. Предварительное (за 5–7 дней до занятия) со всей группой заражение оспой петуха, кролика и т. д.
2. Контрольные вопросы.
3. Объяснение преподавателя.
4. Демонстрация: а) результатов биопробы; б) методики получения мазков.
5. Самостоятельная работа студентов: а) получение мазков на оспу; б) окраска полученных мазков по М. А. Морозову; в) микроскопирование мазков; г) зарисовка результатов.
6. Подведение итогов занятия.
7. Задание к следующему занятию.

### Контрольные вопросы

1. Как вы можете охарактеризовать вирусы оспы?
2. Каковы эпизоотологические и клинические особенности проявления оспы у животных разных видов?
3. Какие методы диагностики оспы вы знаете?

**Методические указания.** Наиболее сложным в подготовке занятия по данной теме является подбор вируса оспы и чувствительного к нему живого объекта.

Для заражения петухов (в скарифицированный гребень и перьевые фолликулы) пригоден вакцинный штамм вируса оспы кур НР-1. Более доступен вирус оспы голубей — штамм Нью-Джерси, применяемый в качестве вакцины против оспы кур. Однако с этим вирусом эффективную биопробу можно поставить только на голубях. Вирус осповакцины, применяющийся до недавнего времени для вакцинации людей против оспы, дает неплохие результаты при внутрикожном заражении кроликов. Наименее желательны, но наиболее доступны для биопробы на оспу куриные эмбрионы. При заражении на хорионаллантоисную оболочку любым из названных вирусов развивается отек ее и образуются характерные узелки (осины).

Подготовка реактивов для окраски мазков по М. А. Морозову большой сложности не представляет. Для окраски целесообразно подготовить наборы, состоящие из реактивов № 1, 2 и 3, иммерсионного масла и бензина в пенициллиновых флаконах с глазной пипеткой, прикрепленной к каждому флакону. Все флаконы одного набора можно поставить в чашку Петри (крышку) и выдавать один набор на двоих.

### Тема 3

## ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ВИРУСА ГРИППА ПТИЦ И ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ В РТГА

**Ньюкаслская болезнь** — широко распространенное заболевание птиц, наносящее значительный экономический ущерб. Однако встречается и другое очень сходное с ним заболевание — грипп птиц. Для организации специфической профилактики и борьбы с названными болезнями необходимо четко их дифференцировать.

**Ньюкаслская болезнь** — высококонтагиозное заболевание кур и индеек. В зависимости от вирулентности эпизоотического штамма, иммунологического состояния, возраста птицы и сопутствующих инфекций болезнь может протекать остро, субклинически или латентно.

Симптомы ньюкаслской болезни довольно разнообразны. На фоне угнетения и слабости наблюдаются признаки поражения респираторного тракта: истечения из носовой полости, кашель, удышье. Водянистые зеленоватые фекалии с примесью крови — результат геморрагического воспаления пищеварительного тракта. Возможно появление признаков поражения центральной нервной системы: параличи ног, крыльев. При стертом течении болезни отмечают изменения герминативного тракта, что ведет к прекращению яйценоскости до 3 нед. В случаях острого течения болезни смертность среди цыплят может достигать 90 %.

При вскрытии павших птиц обнаруживают катаральное воспаление, гиперемию и кровоизлияния в слизистых оболочках верхних дыхательных путей, пищевода, желудка и кишечника. На границе железистого и мышечного желудков кровоизлияния видны в виде пояса. Головной мозг отечен и гиперемирован.

Вирус ньюкаслской болезни относится к семейству Paramyxoviridae (рис. 77). Антигенное единство вируса в значительной степени облегчает лабораторную диагностику болезни. Вирус агглютинирует эритроциты кур, морской свинки, мыши, человека. Отдельные штаммы вируса, кроме того, агглютинируют эритроциты овец, лошадей.

**Грипп птиц** — острое высококонтагиозное заболевание домашних и диких птиц. Из домашних птиц к гриппу чувствительны куры, утки, индейки, гуси.

Грипп кур клинически проявляется угнетением, отказом от корма, затрудненным дыханием, истечениями из ротовой и носовой полостей, нарушением координации движений, парезами и параличами конечностей, посинением гребня и сережек, иногда осповидными высыпаниями на них. Возможны отек головы и шеи, диарея, признаки поражения нервной системы. При гриппе кур, особенно субтипа, называвшегося ранее классической чумой птиц, погибает от 1 до 70—80 % больных, что зависит от вирулент-

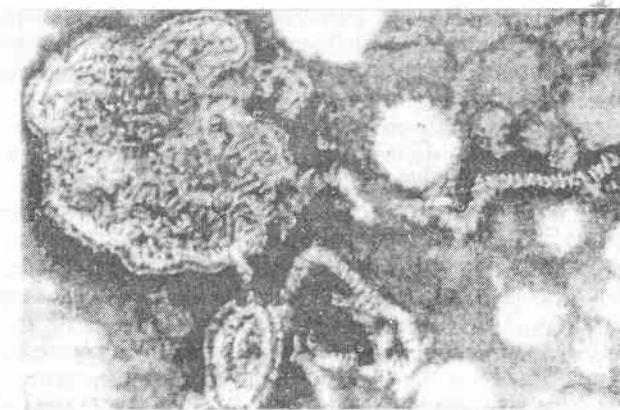


Рис. 77. Вирион вируса ньюкаслской болезни и фрагменты рибонуклеопротеидного тяжа вне вириона (по Ю. В. Пантелееву)

ности штамма вируса, возраста и вида птицы, условий содержания и сопутствующих инфекций.

При вскрытии павших от гриппа кур обнаруживают катаральный конъюнктивит, ринит, синусит, трахеит, катарально-геморрагическое воспаление с кровоизлияниями слизистой оболочки желудка и кишечника. В отдельных случаях наблюдаются поражения яйцеводов и яичников.

Вирус гриппа птиц относится к семейству Orthomyxoviridae роду *Influenzavirus A*. Среди вирусов гриппа А, инфицирующих птиц, идентифицировано 15 различных субтипов гемагглютинина и 9 субтипов нейраминидазы. Однако в настоящее время идентифицирован только один вид вируса гриппа А. Грипп отдельных видов птиц имел раньше другие названия, например классическая чума птиц. Вирус гриппа имеет общий для рода А S-антител, выявляемый в РСК, и V-антител (гемагглютинин и нейраминидаза), определяющий серологический вариант и выявляемый в РТГА, РН. Вирусы гриппа птиц агглютинируют эритроциты кур, морских свинок, кроликов, лошадей, овец и других животных.

Из сказанного видно, что клинические симптомы и патолого-анатомические изменения при ньюкаслской болезни и гриппе птиц очень сходны и дифференцировать эти заболевания удается лишь лабораторными методами.

Для их выполнения в лабораторию направляют головной мозг, легкие и селезенку. Вирус удается выделить из трупов или от большой птицы только в период вспышки болезни. Поэтому для исследования патматериал необходиимо отбирать в начале вспышки, в течение первых 3—5 дней.

С целью обнаружения антител к предполагаемым вирусам в лабораторию направляют по 25 проб сыворотки крови от птиц од-

ногого птичника. Через 2—3 нед от тех же (по номерам) птиц направляют для исследования еще 25 проб. Кровь от кур берут с соблюдением правил асептики, а получив сыворотку, консервируют ее добавлением мертиолата в соотношении 1 : 20 000.

**Дифференциальная лабораторная диагностика вирусов гриппа птиц (ГП) и ньюкаслской болезни (НБ).** Проводят ее по следующему плану: выделение вируса на куриных эмбрионах, дифференциация вируса гриппа птиц от вируса ньюкаслской болезни по реакции торможения гемагглютинации.

При подозрении на грипп птиц или ньюкаслскую болезнь сначала пытаются обнаружить вирус методом капельной реакции гемагглютинации. Для этого каплю приготовленной из патологического материала суспензии соединяют с одной каплей 5%-ной суспензии эритроцитов кур. Положительная гемагглютинация указывает на присутствие в патматериала гемагглютинирующего вируса.

**Выделение вируса.** С целью обнаружения вируса биопробой и его выделения суспензию из патматериала вводят 9—11-дневным куриным эмбрионам в аллантоисную полость. При размножении в них вируса ньюкаслской болезни или вируса гриппа птиц эмбрионы гибнут через 20—76 ч в зависимости от вирулентности штамма вируса. При вскрытии павших эмбрионов отмечают множественные кровоизлияния на темени, теле и лапах зародыша.

Аллантоисную жидкость павшего эмбриона отсасывают, устанавливают капельной реакцией гемагглютинации присутствие в ней вируса и используют при дальнейших исследованиях как материал, содержащий выделенный вирус.

Если при первом заражении не удается выделить вирус, то делают до трех последовательных «слепых» пассажей. При этом используют для заражения аллантоисную жидкость эмбрионов, давших в предыдущем пассаже отрицательную реакцию.

Если выделенный вирус при дальнейших исследованиях окажется вирусом ньюкаслской болезни, необходимо выяснить, является ли он вакцинным или эпизоотическим. На патогенность полевого изолята будет указывать положительная биопроба на 3—6 непривитых цыплятах в возрасте 30 и более дней. Цыплята заражают внутримышечно 0,2 мл аллантоисной жидкости или суспензии (1 : 100) органов погибшей птицы. При наличии полевого вируса птица погибает через 4—6 дней.

**Дифференциация** вируса ГП от вируса НБ в РТГА. На этапе обнаружения и выделения с помощью куриных эмбрионов не представляется возможным дифференцировать вирус ГП от вируса НБ, так как признаки размножения вирусов в курином эмбрионе сходны. Специфическое действие вирусы проявляют только в серологической реакции. Для дифференциации этих вирусов наиболее подходит РТГА — реакция торможения

гемагглютинации с эритроцитами кур. Выбор данной реакции определяется тем, что оба вируса обладают способностью агглютинировать эти эритроциты, а взаимодействие только со специфической сывороткой позволит их четко дифференцировать. Кроме того, реакция легко выполняется (не требует стерильности) и дает быстрый ответ.

Специфические, т. е. содержащие определенные антитела, сыворотки получают на биофабриках и направляют в лаборатории в составе диагностических наборов.

При дифференциации вирусов ньюкаслской болезни (НБ) и гриппа птиц (ГП) в РТГА используют две специфические сыворотки, одна из которых содержит антитела к вирусу НБ, а другая — к вирусу ГП, точнее, к определенному его субтипу. Необходимость установления субтипа вируса гриппа диктуется тем, что переболевание птицы одним из них иммунологически не защищает ее от других субтипов.

Дифференциация вирусов в РТГА может быть проведена постановкой ее в одной из двух модификаций.

Согласно первой выделенный вирус титруют в РГА и готовят для РТГА рабочее разведение его с титром 4 ГАЕ. Затем берут две специфические сыворотки биофабричного производства и определяют титры антител в обеих сыворотках в присутствии выделенного вируса (табл. 17).

#### 17. Пример результатов дифференциации вирусов НБ и ГП в РТГА с разведениями сывороток

| Компоненты реакции              | Разведение сыворотки |       |       |        |        |        |         |         |         |
|---------------------------------|----------------------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
|                                 | 1 : 2                | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 32 | 1 : 64 | 1 : 128 | 1 : 256 | 1 : 512 |
| Вирус Х + сыворотка к вирусу НБ | +++                  | +++   | +++   | +++    | +++    | +++    | +++     | +++     | +++     |
| Вирус Х + сыворотка к вирусу ГП | —                    | —     | —     | —      | —      | +      | ++      | +++     | +++     |

Примечание. +, — интенсивность гемагглютинирующей активности.

В приведенном примере гемагглютинирующая активность неизвестного вируса подавлена (тормозится) антителами, содержащимися в специфической сыворотке к вирусу гриппа птиц.

Это является косвенным доказательством образования комплекса антиген + антитело (выделенный вирус + антитела специфической сыворотки). В то же время добавление к вирусу сыворотки, содержащей антитела к вирусу ньюкаслской болезни, никак не отразилось на гемагглютинирующей способности вируса, т. е. комплекса не образовалось. Это дает основание утверждать, что неизвестный вирус, выделенный из патологического материала, является вирусом гриппа птиц.

Вторая модификация заключается в том, что используются двукратные разведения неизвестного выделенного вируса и постоянные дозы специфических сывороток, содержащих антитела к вирусам ньюкаслской болезни и гриппа птиц. При этом обе используемые сыворотки берутся в реакцию в одинаковых титрах. Компоненты реакции объединяются в одинаковых объемах (например, 0,2 мл) (табл. 18).

#### 18. Схема постановки РТГА для дифференциации вирусов ньюкаслской болезни (НБ) и гриппа птиц (ГП) с разведениями вируса

| № ряда | Компоненты реакции, мл  | Разведение вируса |       |       |        |        |        |         |         |
|--------|-------------------------|-------------------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|
|        |                         | 1 : 2             | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 32 | 1 : 64 | 1 : 128 | 1 : 256 |
|        | Физиологический раствор | 0,2               | 0,2   | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2     | 0,2     |
| 1      | Вирус Х                 | 0,2               |       |       |        |        |        |         |         |
|        | Сыворотка к вирусу НБ   | 0,2               | 0,2   | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2     | 0,2     |
| 2      | Физиологический раствор | 0,2               | 0,2   | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2     | 0,2     |
|        | Вирус Х                 | 0,2               |       |       |        |        |        |         |         |
|        | Сыворотка к вирусу ГП   | 0,2               | 0,2   | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2     | 0,2     |
| 3      | Физиологический раствор | 0,2               | 0,2   | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2     | 0,2     |
|        | Вирус Х                 | 0,2               |       |       |        |        |        |         |         |
|        | Физиологический раствор | 0,2               | 0,2   | 0,2   | 0,2    | 0,2    | 0,2    | 0,2     | 0,2     |

Одновременно ставят контроли специфических сывороток и контроль эритроцитов на отсутствие спонтанной гемагглютинации.

После экспозиции 40–60 мин, в течение которых взаимодействуют специфические компоненты реакции, в каждую лунку добавляют по 0,2 мл 1%-ной звезды куриных эритроцитов. Через 30–40 мин учитывают результаты реакции (табл. 19).

#### 19. Пример результатов дифференциации вирусов ньюкаслской болезни (НБ) и гриппа птиц (ГП) в РТГА с разведениями вируса

| Компоненты реакции                | Разведение вируса |       |       |        |        |        |         |         |         |
|-----------------------------------|-------------------|-------|-------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|
|                                   | 1 : 2             | 1 : 4 | 1 : 8 | 1 : 16 | 1 : 32 | 1 : 64 | 1 : 128 | 1 : 256 | 1 : 512 |
| Вирус Х + сыворотка к вирусу НБ   | +++               | +++   | ++    | +      | -      | -      | -       | -       | -       |
| Вирус Х + сыворотка к вирусу ГП   | +++               | +++   | +++   | +++    | +++    | +++    | ++      | +       | -       |
| Вирус Х + физиологический раствор | +++               | +++   | +++   | +++    | +++    | +++    | ++      | +       | -       |

В приведенном примере гемагглютинирующий титр неизвестного вируса в контрольном ряду равен 128 ГАЕ, в ряду с сывороткой к вирусу ГП — также 128 ГАЕ, а с сывороткой к вирусу НБ — 8 ГАЕ. Значит, сыворотка к вирусу ГП не изменяет титр исследуемого вируса, а сыворотка к вирусу НБ — снижает в 16 раз. Это возможно только в том случае, если антитела в сыворотке к вирусу НБ и исследуемый вирус гомологичны. Значит, выделенный вирус является вирусом ньюкаслской болезни.

Таким образом, вирус ньюкаслской болезни и вирус гриппа птиц, вызывая сходно проявляющиеся болезни птиц и однотипно обнаруживающиеся при биопробе на куриных эмбрионах, четко дифференцируются РТГА. При сомнительных результатах РТГА вирус идентифицируют в реакции нейтрализации.

#### Задание

Дифференцировать в РТГА неизвестный гемагглютинирующий вирус, установив, является ли он вирусом НБ или ГП.

**Материальное обеспечение:** вирус ньюкаслской болезни, специфическая сыворотка к этому вирусу, специфическая сыворотка к вирусу гриппа птиц, физиологический раствор, пипетки на 1–2 мл, плексигласовые панели, 1%-ная звесь куриных эритроцитов, стакан с дезинфицирующим раствором, груша резиновая, карандаши по стеклу.

#### Примерный план занятия (2 ч)

- Объяснение преподавателя.
- Самостоятельная работа студентов: а) получение двукратных разведений вируса; б) разлив сывороток.
- Контрольные вопросы.
- Самостоятельная работа студентов по разливу суспензии эритроцитов.
- Объяснение преподавателя.
- Демонстрация диагностического набора для идентификации вирусов НБ и ГП, диагностического набора антигенов и сывороток для диагностики гриппа птиц, результатов дифференциации вирусов НБ и ГП в РТГА и их интерпретация.
- Самостоятельная работа студентов по учету результатов РТГА и их интерпретации.
- Подведение итогов занятия.
- Задание к следующему занятию.

#### Контрольные вопросы

- В чем сходны вирусы НБ и ГП и вызываемые ими болезни?
- Какова методика обнаружения и выделения вируса от больных и павших кур?
- Каков принцип дифференциации вирусов НБ и ГП?
- Как ставят РТГА с разведениями вируса при дифференциации двух вирусов и как оценивают ее результаты?

**Методические указания.** В качестве дифференцируемого вируса удобно использовать вирус ньюкаслской болезни, штамм Н или Ла-Сота в титре примерно 64 ГАЕ. Специфические сыворотки к вирусам НБ и ГП могут быть взяты из специально приобретенного для этой цели диагностического набора или получены гипериммунизацией лабораторных животных, например кроликов. Для гипериммунизации можно использовать соответствующие вакцины или аллантоинскую жидкость зараженных ими куриных эмбрионов.

И наконец, при наличии лишь одной специфической сыворотки, а именно гомологичной используемому вирусу, вторая сыворотка может быть имитирована.

## Тема 4

### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТИПА ВИРУСА ЯЩУРА В РСК

Реакция связывания комплемента (РСК) — одна из традиционных серологических реакций, применяемых для диагностики многих вирусных болезней. Само название в значительной мере отражает суть метода, состоящего из двух отдельных этапов. На первом этапе участвуют антиген и антитело (один из этих ингредиентов заранее известен), а также определенное количество предварительно оттитрованного комплемента. При соответствии антигена и антитела их комплекс связывает комплемент, что выявляют на втором этапе с помощью индикаторной системы (смесь бараньих эритроцитов и антисыворотки к ним — гемолизина). Если комплемент связался при взаимодействии антигена и антитела, то лизиса эритроцитов не происходит (положительная РСК). При отрицательной РСК несвязанный комплемент способствует гемолизу эритроцитов (рис. 78).

РСК часто используют в диагностической практике для обнаружения и идентификации вирусов, обнаружения и титрования антител в сыворотках крови.

Основными компонентами РСК служат антигены (известные или выявляемые), антитела (известные антисыворотки или исследуемые сыворотки), комплемент, гемолитическая сыворотка и эритроциты барана; в качестве разбавителя используют изотонический раствор хлорида натрия ( $\text{pH } 7,2\text{--}7,4$ ) или различные буферные растворы. Антигены и сыворотки могут обладать антикомплектарностью, т. е. способностью адсорбировать комплемент, что задерживает гемолиз и искачет результаты реакции. Чтобы избавиться от антикомплектарности, антигены очищают различными методами: ацетоном, фреоном, эфиром, хлороформом и т. д. в зависимости от вида ткани, используемой в качестве антигена и вируса. Сыворотки освобождают от антикомплемен-

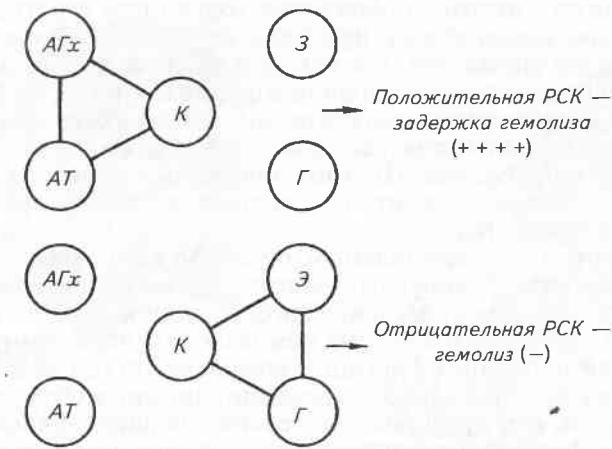


Рис. 78. Схема РСК:  
АГx — исследуемый антиген; AT — специфические антитела; K — комплемент; Э — эритроциты барана; Г — гемолизин

тарности путем прогревания, обработкой комплемента и другими методами.

Антигены для РСК готовят из органов зараженных животных, из аллантоинской или амниотической жидкости зараженных куриных эмбрионов, а также из жидкой среды инфицированных культур клеток.

Подготовка антигена для РСК при вирусных инфекциях значительно отличается от его подготовки при бактериальных инфекциях. Это обусловлено рядом специфических свойств вирусов.

Во-первых, для освобождения вирусного антигена из клетки приходится часто дополнительно обрабатывать инфекционный материал с целью разрушения клеток и освобождения антигена.

Во-вторых, большей термолабильностью вирусных антигенов по сравнению с бактериальными. У большинства вирусов комплементфиксирующий антиген связан с инфекционной частицей, и разрушение его идет параллельно с потерей инфекционности. Поэтому материалы для получения антигена необходимо брать от павших животных только в первые часы после гибели их, а лучше при жизни. Консервирование вирусодержащего материала различными дезинфицирующими средствами часто не дает положительных результатов, так как многие из них вызывают разрушение вирусного антигена.

В-третьих, неравномерностью фиксации комплемента при различном соотношении концентраций антиген + антитело. Ком-

плекс антиген + антитело образуется только при строгих количественных соотношениях их; при избытке антител фиксация комплемента резко снижается, так как активный комплекс антиген + + антитело представлен в основном в форме антител и активная поверхность комплемента незначительна. То же самое наблюдается и в зоне избытка антигена, где подавление фиксации комплемента происходит еще быстрее. Поэтому для установления оптимальной зоны фиксации комплемента необходимо предварительное титрование антигена и антител.

В-четвертых, незначительным объемом комплекса антиген + + антитело. Размер вирусных частиц, вступающих в комплекс, очень ничтожен, и поэтому площадь фиксации комплемента незначительна. С увеличением объема комплекса антиген + антитело путем удлинения периода фиксации комплемента (до 18 ч при 4 °C) повышается чувствительность реакции, но снижается ее специфичность, так как при продолжительном периоде фиксации увеличивается фиксация комплемента неспецифическими антигенами (тканевыми).

И наконец, в-пятых, высокой прокомплементарной активностью вирусного антигена. Для исключения неспецифической фиксации комплемента необходима более полная очистка вирусного антигена от тканевых фрагментов.

Большой помехой для использования РСК в диагностике вирусных болезней животных и человека является неравномерное накопление вирусного антигена в различные периоды болезни и особенно при разных инфекциях.

РСК применяют для определения типов и подтипов (вариантов) вируса ящура, вызывающих заболевание животных, для проверки производственных штаммов вируса ящура при изготовлении вакцин и лабораторных штаммов в научно-исследовательской работе.

**Ящур** — остро протекающая высококонтагиозная болезнь парнокопытных, проявляющаяся лихорадкой, везикулярным поражением слизистых оболочек рта, кожи венчика и вымени, у молодых животных поражением миокарда и скелетных мышц.

Ящур регистрируется во многих странах мира.

Инкубационный период продолжается 1—3 дня, иногда до 7—10 дней. Самый характерный признак данного заболевания у животных — везикулярное поражение слизистых оболочек рта и кожи венчика и вымени.

У крупного рогатого скота и свиней ящур протекает остро и, как правило, у взрослых животных доброкачественно. Заболевание быстро распространяется среди животных. Вначале отмечают ухудшение аппетита, повышенную саливацию (рис. 79), повышение температуры тела (до 40,5—41,5 °C). На 2—3-й день на внутренней поверхности губ и языке появляются афты (рис. 80). У не-



Рис. 79. Слюнотечение у больной ящуром коровы

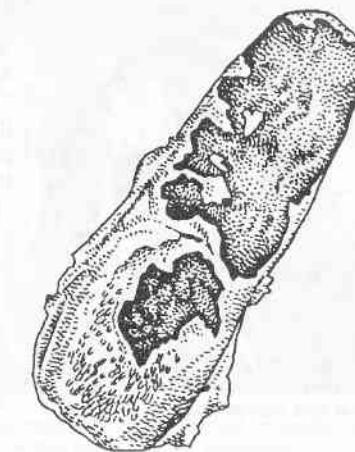


Рис. 80. Эрозии на языке у больной ящуром коровы (по С. И. Войнову и М. Б. Карпович)

которых животных афты образуются в области межкопытной щели и на вымени (рис. 81, 82). Заболевание конечностей сопровождается хромотой. Через сутки афты разрываются и образуются эрозии (рис. 83). Через 2—3 недели эрозии заживают, и животное выздоравливает. У свиней, овец и коз поражение наблюдают чаще



Рис. 81. Поражения венчика копыт у свиньи при ящуре (по С. И. Войнову и М. Б. Карпович)



Рис. 82. Афты на сосках вымени у больной ящуром коровы (по Мареку, Мочи и др.)

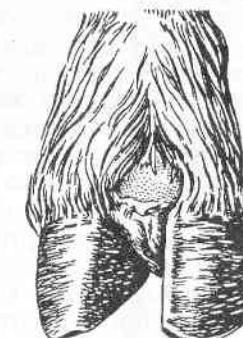


Рис. 83. Поражения в области межкопытной щели у коровы при ящуре (по Скоморохову)

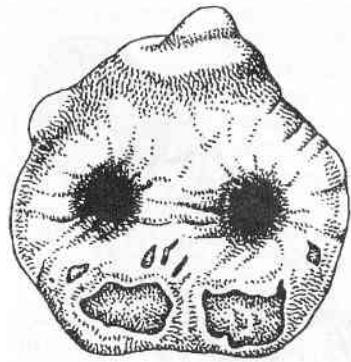


Рис. 84. Афты и эрозии на пятаке у свиньи при ящуре (по Скоморохову)

на конечностях и реже на слизистых оболочках рта (рис. 84). Довольно часто поражается вымя. У молодняка ящур обычно протекает злокачественно (гибель 80 % и более), как правило, афт нет, отмечают геморрагическое воспаление кишечника и дегенеративные изменения в мышце сердца («тигровое сердце»), подобные изменения находят в скелетных мышцах.

Вирус относится к семейству Picornaviridae, роду Aphthovirus, РНК-содержащий, не имеет суперкапсидной оболочки. Вирионы — мелкие частицы икосаэдрической формы.

Вирус ящура сравнительно устойчив к факторам внешней среды. В стенках афт он сохраняет вирулентность 67 дней, в навозной жиже — 39, в сточных водах — до 103 дней. Лучшие дезинфицирующие средства — 2- или 3%-ные горячие растворы гидрокарбоната натрия и 1%-ный раствор формальдегида.

В естественных условиях к вирусу ящура восприимчивы домашние и дикие парнокопытные. Вирус от больных животных можно выделить уже в инкубационный период (из молока, спермы, слюны). Наибольшее количество его содержится в эпителии и жидкости везикул. Экскреты и секреты больных животных инфекционны более 10 дней. Переболевание может сопровождаться длительным вирусоносительством. Около 50 % выздоровевшего крупного рогатого скота могут выделять вирус в течение 8 мес, а некоторые — до двух лет.

Вирус культивируется на естественно восприимчивых и лабораторных животных: новорожденных мышатах и крольчатах, морских свинках, хомяках 60-дневного возраста (рис. 85—87). Хорошо размножается в культуре клеток почек чувствительных животных, в культуре эксплантантов эпителия языка крупного рогатого скота и в некоторых перевиваемых линиях клеток (ВНК-21, СПЭВ и др.), с выраженным ЦПД (рис. 88).

Гемагглютинирующими свойствами вирус не обладает.

В настоящее время известно семь антигенных типов вируса ящура: А, О, С, Сат-1, Сат-2, Сат-3 и Азия-1. Внутри типов существуют варианты или подтипы. Так, тип А имеет 32 варианта, тип О — 11, тип С — 5, Сат-1 — 7, Сат-2 — 3, Сат-3 — 4, Азия-1 — 2. Антигенные типы, установленные в РСК, различаются и иммунологически. Переболевшие животные приобретают выраженный иммунитет к гомологичному вирусу. Следовательно, для специ-



Рис. 85. Вскрытая афта на лапке у морской свинки, зараженной ящуром (по С. И. Войнову и М. Б. Карпович)

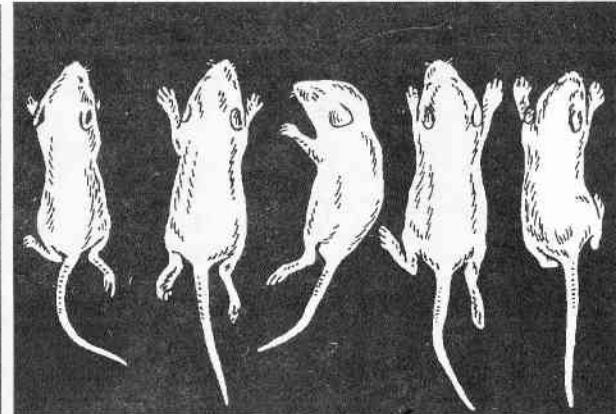


Рис. 86. Парезы и параличи ног у мышат, зараженных вирусом ящура (по М. Б. Карпович)

фической профилактики ящура на каждый тип вируса должна быть вакцина.

В организме естественно восприимчивых животных вирус индуцирует образование вируснейтрализующих, комплементсвязывающих и преципитирующих антител.

Источником инфекции служат больные животные и вирусносители. Весьма существенна эпизоотологическая роль диких восприимчивых животных.

Диагностировать ящур по клиническим признакам довольно легко, но для врача хозяйства важно знать, каким типом вируса вызвано заболевание, чтобы применять вакцину соответствующего типа. Определение типа вируса ящура проводят в лаборатории.

Диагноз на ящур ставят на основании эпизоотологических данных (высокая контагиозность и избирательное поражение только парнокопытных), клинических признаков (везикулярное поражение слизистых

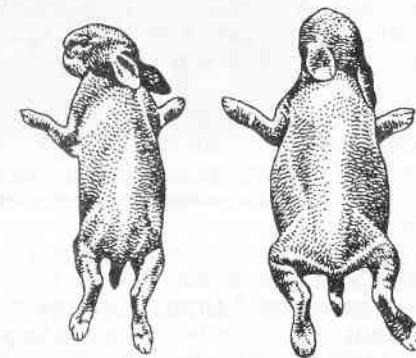


Рис. 87. Парезы и параличи конечностей у крольчат, зараженных вирусом ящура (по М. Б. Карпович)

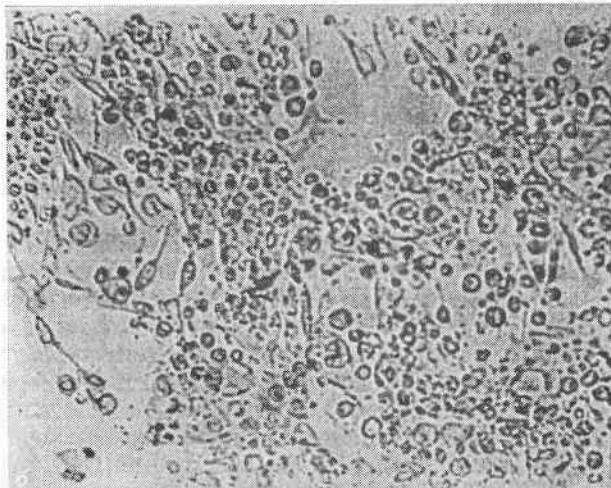
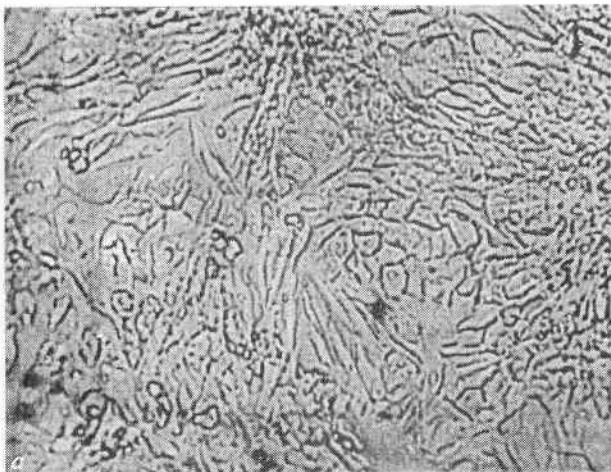


Рис. 88. Культура клеток почки крольчонка, незараженная (а) и зараженная (б) вирусом ящура (по М. Б. Карпович)

оболочек рта, кожи конечностей и вымени), патологоанатомических изменений (при гибели молодняка — поражение кишечника и мышц сердца) и результатов лабораторных исследований.

Отбор проб. Для лабораторных исследований отбирают от 2—3 больных животных в количестве не менее 5 г стенки и содержимое афт на слизистой оболочке языка (у крупного рогатого скота), на пятаке (у свиней), на коже венчика и межпальцевой

щели (у крупного и мелкого рогатого скота, свиней, верблюдов и др.). При отсутствии афт берут кровь в момент температурной реакции у животных, из трупов молодняка животных всех видов — лимфатические узлы головы и заглоточного кольца, поджелудочную железу и мышцу сердца. Для исследования на вирусоносительство берут пищеводно-глоточную слизь (специальным зондом).

Получение материала необходимо производить так, чтобы предупредить вынос вируса за пределы неблагополучного очага и лаборатории, обезопасить персонал, работающий с инфекционным материалом. Для этого: а) ветврач хозяйства должен иметь определенные навыки взятия материала от больных животных; б) необходимо подготовить все для отбора материала — пинцеты, ножницы, салфетки, толстостенные флаконы, лейкопластырь, резиновые пробки, 50%-ный раствор стерильного глицерина на изотоническом растворе хлорида натрия, термос с охлаждающей смесью, дезраствор — 2%-ный раствор NaOH или 1%-ный раствор уксусной или молочной кислоты; спецодежду — халаты, комбинезоны, косьники или шапочки, маски, резиновые сапоги, перчатки и т. д. Все необходимое помешают в контейнер и едут в неблагополучный очаг, где переодеваются, прежде чем войти в помещение с больными животными; в) после взятия материала от больных животных инструменты, маску, перчатки погружают в дезраствор, наружную поверхность флаконов и термоса обрабатывают дезраствором. В санпропускнике снимают всю одежду и принимают душ.

В носовой полости у людей вирус ящура переживает до 7 дней, следовательно, в течение этого времени после посещения неблагополучного хозяйства нежелательно иметь контакт со здоровыми парнокопытными животными.

Пробы материала без признаков разложения помешают во флаконы с завинчивающимися или притертymi пробками и замораживают, а при отсутствии условий замораживания — заливают консервирующей жидкостью (50%-ным стерильным раствором глицерина на изотоническом растворе NaCl). На флаконы наклеивают этикетки с указанием вида животных, наименования материала, его количества, даты отбора. Флаконы ставят в металлический непроницаемый контейнер, опечатывают и помешают в термос со льдом, который тоже опечатывают. К материалу прилагают сопроводительное письмо, в котором указывают: дату взятия материала, от животных какого вида и какой материал, сообщают эпизоотическую обстановку по ящуру в хозяйстве, имя и подпись врача. Материал отправляют с нарочным.

Для работы с вирусом ящура в лаборатории выделяют отдельную комнату (бокс с предбоксником), где должны быть все необходимые оборудование и материалы для проведения диагностической работы (подготовка материала, постановка РСК, биопробы

и т. д.). При работе в боксе полностью сменяют спецодежду и обувь, надевают резиновые перчатки и маску. После работы ничего не обеззараженного из бокса выносить нельзя. Посуду и инструменты кипятят, спецодежду погружают в контейнер для автоклавирования, столы, пол, стены обрабатывают дезинфицирующим раствором с последующим облучением УФЛ.

В лаборатории ведут строгий учет поступившего материала и его расход с точностью до 1 мг. Поступивший в лабораторию материал хранят до исследования и в период использования в закрытом на ключ и опечатанном холодильнике. По окончании работы составляют акт на уничтожение оставшегося от исследования материала и животных после биопробы.

**Лабораторные исследования.** При подозрении ящура проводят:

обнаружение и идентификацию антигена вируса ящура в РСК (определение его типовой и вариантной принадлежности);

обнаружение и титрование антител к вирусу ящура у переболевших животных (реконвалесцентов) в реакции радиальной иммунодиффузии (РРИД) и непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ).

**Обнаружение и идентификация антигена вируса ящура с помощью РСК.** Компоненты реакции: испытуемые антигены из эпизоотических штаммов вируса от заболевших животных; сыворотки морских свинок, гипериммунизированных стандартными типовыми и вариантными штаммами вируса ящура (биофабричного производства); антигены контрольные — из типовых и вариантных штаммов вируса ящура (биофабричного производства); комплемент — свежая или сухая нормальная сыворотка морских свинок; гемолизин биофабричного производства; эритроциты барана — в виде 2%-ной взвеси на физиологическом растворе; 0,85%-ный раствор химически чистого натрия хлорида на дистиллированной воде; набор специфических сывороток и антигенов к другим вирусам, вызывающим везикулярные поражения\*.

РСК ставят в различных объемах: общий объем 1 мл — каждый компонент берут в объеме 0,2 мл; общий объем 0,5 мл — каждый компонент в объеме 0,1 мл или микрометром: общий объем 0,125 мл — каждый компонент в объеме 0,025 мл.

**Приготовление антигена вируса ящура.** Стенки афт от больных животных отмывают от консервирующей жидкости физиологическим раствором (рН 7,4–7,6), высушивают фильтровальной бумагой, взвешивают, измельчают и тщательно растирают в фарфоровой ступке со стерильным битым нейтральным стеклом до получения однородной массы, к которой добавляют

двойное по отношению к массе афт количество физиологического раствора (рН 7,4–7,6), т. е. на 1 г афт 2 мл раствора. Полученную 33%-ную суспензию экстрагируют при комнатной температуре в течение 2 ч, промораживают при минус 10 — минус 20 °C в течение 5–18 ч. После размораживания центрифицируют при 3–5 тыс. мин<sup>-1</sup> 30–15 мин. Надосадочную жидкость инактивируют при 58 °C 40 мин. После инактивации, если жидкость с хлопьями, ее повторно центрифицируют при 3 тыс. мин<sup>-1</sup> 10–15 мин и затем используют в качестве антигена в РСК.

**Подготовка гемолизина.** Гемолизин титруют при получении его новой серии. Титрование проводят по общепринятой методике. Выпускаемый биофабриками гемолизин иногда консервирован глицерином (1 : 1), поэтому для приготовления основного разведения гемолизина (1 : 1000) берут 0,2 мл гемолизина и 9,8 мл физиологического раствора (1 : 100), затем из этого разведения готовят разведение 1 : 1000 (к 1 мл гемолизина 1 : 100 добавляют 9 мл физиологического раствора). Из основного раствора (1 : 1000) готовят все последующие по указанной схеме (табл. 20). Получив необходимые разведения гемолизина, проводят его титрование по схеме таблицы 21.

#### 20. Схема приготовления разведений гемолизина

| Компоненты                  | Разведение гемолизина |          |          |          |          |          |          |          |
|-----------------------------|-----------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|                             | 1 : 1500              | 1 : 2000 | 1 : 3000 | 1 : 4000 | 1 : 5000 | 1 : 6000 | 1 : 7000 | 1 : 8000 |
| Гемолизин<br>1 : 1000, мл   | 1,0                   | 1,0      | 1,0      | 1,0      | 1,0      | 1,0      | 1,0      | 1,0      |
| Физиологический раствор, мл | 0,5                   | 1,0      | 2,0      | 3,0      | 4,0      | 5,0      | 6,0      | 7,0      |

#### 21. Схема титрования гемолизина

| Компоненты  | Разведение гемолизина     |          |          |          |          |          |          |          |
|---|---------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|   | 1 : 1500                  | 1 : 2000 | 1 : 3000 | 1 : 4000 | 1 : 5000 | 1 : 6000 | 1 : 7000 | 1 : 8000 |
| Гемолизин, мл   | 0,5                       | 0,5      | 0,5      | 0,5      | 0,5      | 0,5      | 0,5      | 0,5      |
| Физиологический раствор (вместо антигена и сыворотки), мл | 1,0                       | 1,0      | 1,0      | 1,0      | 1,0      | 1,0      | 1,0      | 1,0      |
| Комплмент в разведении 1 : 20, мл                         | 0,5                       | 0,5      | 0,5      | 0,5      | 0,5      | 0,5      | 0,5      | 0,5      |
| Эритроциты, 2%-ная взвесь, мл                             | 0,5                       | 0,5      | 0,5      | 0,5      | 0,5      | 0,5      | 0,5      | 0,5      |
| Учет титрования, мл                                       | —                         | —        | —        | ++       | +++      | ++++     | ++++     | ++++     |
|   | Водяная баня 37 °C 10 мин |          |          |          |          |          |          |          |

\* При исследовании материала от свиней в РСК включают специфические антигены и сыворотки к вирусу везикулярной болезни свиней.

При титровании гемолизина необходимы: 1) контроль эритроцитов для исключения спонтанного гемолиза (0,5 мл 2%-ной супензии эритроцитов + 2 мл физиологического раствора); 2) контроль гемолизина для исключения гемолиза эритроцитов без комплемента (0,5 мл разведения 1 : 1000 гемолизина + 0,5 мл 2%-ной супензии эритроцитов + 1,5 мл физиологического раствора); 3) контроль комплемента для исключения гемолиза эритроцитов без участия гемолизина (0,5 мл разведения 1 : 20 комплемента + 0,5 мл 2%-ной супензии эритроцитов + 1,5 мл физиологического раствора); 4) контроль гемолитической системы (0,5 мл разведения 1 : 1000 гемолизина + 0,5 мл 2%-ной супензии эритроцитов + 0,5 мл разведения 1 : 20 комплемента + 1,0 мл физиологического раствора).

В результате титрования устанавливают предельный титр гемолизина, т. е. его минимальное количество, способное вызвать лизис эритроцитов (гемолиз) в присутствии комплемента. На приведенной схеме это количество гемолизина получено в разведении 1 : 3000. В первых трех контролях должна быть полная задержка, в четвертом контроле — полный гемолиз.

В главный опыт берут гемолизин в 4-кратной концентрации от его предельного титра (рабочее разведение). Например, предельный титр гемолизина 1 : 3000, его рабочее разведение будет 1 : 750. А если он консервирован глицерином (1 : 1), то для приготовления рабочего разведения берут 2 : 750 или 0,2 мл цельного гемолизина и 74,8 мл физиологического раствора.

**Приготовление гемолитической системы (гемосистемы).** Смешивают гемолизин в рабочем разведении с равным количеством 2%-ной взвеси эритроцитов барана. Перед использованием гемосистему выдерживают в термостате при 37 °C 30 мин для сенсибилизации эритроцитов.

**Приготовление 2%-ной супензии эритроцитов барана.** На 2 мл осадка отмытых эритроцитов добавляют 98 мл физиологического раствора.

**Титрование комплемента.** Комплемент титруют в день постановки главного опыта в гемолитической системе по указанной схеме (табл. 22).

Титром комплемента считается то его наименьшее количество, которое вызывает полный гемолиз эритроцитов. При определении типа вируса ящура используют комплемент с титром не ниже 2,5 %.

Для постановки главного опыта РСК комплемент берут с излишком в 1 % или в две условные единицы от титра его в гемосистеме. Например, титр комплемента в гемосистеме 2 %, в главный опыт берут 3 %, для приготовления рабочей дозы к 3 мл нативного цельного комплемента добавляют 97 мл физиологического раствора.

## 22. Схема титрования комплемента

| Компоненты  | Содержание цельного комплемента, % |     |      |     |      |     |      |     |      |
|---|------------------------------------|-----|------|-----|------|-----|------|-----|------|
|   | 0,5                                | 1,0 | 1,5  | 2,0 | 2,5  | 3,0 | 3,5  | 4,0 | 4,5  |
| Комплемент в разведении 1 : 20, мл                        | 0,05                               | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,35 | 0,4 | 0,45 |
| Физиологический раствор, недостающий до 0,5, мл           | 0,45                               | 0,4 | 0,35 | 0,3 | 0,25 | 0,2 | 0,15 | 0,1 | 0,05 |
| Гемолитическая система, мл                                | 1,0                                | 1,0 | 1,0  | 1,0 | 1,0  | 1,0 | 1,0  | 1,0 | 1,0  |
| Физиологический раствор (вместо антигена и сыворотки), мл | 1,0                                | 1,0 | 1,0  | 1,0 | 1,0  | 1,0 | 1,0  | 1,0 | 1,0  |
| Учет титрования   | ++++                               | +++ | ++   | -   | -    | -   | -    | -   | -    |
|   | Водяная баня 15 мин при 37–38 °C   |     |      |     |      |     |      |     |      |

Приготовление разведений комплемента, определение его активности и вычисление рабочей дозы требуют в подготовке РСК наибольшего внимания. Правильно избранная рабочая доза комплемента — непременное условие нормального течения реакции, что обеспечивает достоверность результатов. Избыток комплемента ведет к частичной или полной потере возможности выявить специфический антиген или антитело. Недостаток комплемента вызывает задержку гемолиза и при отсутствии специфического антигена и антитела.

**Сыворотки.** При определении типа вируса ящура позитивные типоспецифические ящурные сыворотки используют в рабочем титре, который представляет собой удвоенный предельный титр. Так, если предельный титр сыворотки, указанный на этикетке, равен 1 : 40, то рабочий титр — 1 : 20.

**Антитела.** Типоспецифические ящурные антигены (выпускаемые так же, как и специфические сыворотки биофабриками) используют в удвоенных титрах. Так, если на этикетке указан предельный титр 1 : 6, то удвоенный титр его 1 : 3.

В качестве испытуемого антигена используют патологический материал (стенки и содержимое афт больных ящуром животных, тушки больных и павших при постановке биопробы мышат и крольчат), культуральную вирусодержащую жидкость. (Методику приготовления антигена см. на с. 204.) Испытуемый антиген в реакции исследуют цельным (33%-ная взвесь) и в разведениях 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8.

В пограничных зонах страны при угрозе проникновения ящура других типов (Сат-1, Сат-2, Сат-3 и Азия-1) в контроль и главный опыт по определению типов включают сыворотки и антигены вируса ящура, регистрируемые в сопредельном государстве.

Постановка главного опыта для определения типа вируса ящура. Одновременно с главным опытом (табл. 23) ставят контроль всех специфических ящурных антигенов и сывороток согласно схеме. Компоненты разливают в следующем порядке: 1) специфические сыворотки в рабочем титре по 0,2 мл для каждой сыворотки — один ряд пробирок по вертикали; 2) специфические антигены в рабочем титре по 0,2 мл — в первые семь рядов по горизонтали, для каждого антигена один ряд; 3) испытуемый антиген в разведениях по 0,2 мл — для каждого разведения один ряд пробирок по горизонтали; 4) физиологический раствор по 0,2 мл — в последний ряд по горизонтали (контроль сывороток) вместо антигена и в последний ряд по вертикали (контроль антигенов) вместо сывороток; 5) комплемент по 0,2 мл в рабочем разведении — во все пробирки главного опыта. Пробирки осторожно встряхивают и помешают в водяную баню на 20 мин при 37—38 °С; 6) во все пробирки наливают по 0,4 мл гемолитической системы. Пробирки снова встряхивают и помешают в водяную баню на 30 мин при 37—38 °С.

Учет реакции ведут через 5—10 мин после водяной бани, и окончательный результат получают через 10—12 ч. Степень задержки гемолиза оценивают в крестах: (++++) — 100%-ная задержка гемолиза; (+++) — 75%-ная задержка гемолиза; (++) — 50%-ная задержка гемолиза; (+) — 25%-ная задержка гемолиза; (−) — полный гемолиз.

Если испытуемый антиген гомологичен специфическим антителам, то будет задержка гемолиза и реакция положительная; если же гомологичные антитела отсутствуют, реакция отрицательная и наблюдается полный гемолиз.

При производственной необходимости после определения типовой принадлежности вируса ящура устанавливают его подтип (вариант). Для этого ставят РСК по той же методике, но используют вариантовые сыворотки и антигены установленного типа, причем вариантовые сыворотки используют в предельном титре, а антигены — в удвоенном.

Антиген (исследуемый) относят к тому варианту, с сывороткой которого он дает положительную реакцию в более высоких разведениях (табл. 24).

Когда доставленное количество вирусного материала из хозяйства недостаточно для исследования в РСК, проводят его расплодку на культуре клеток или на 3—6-дневных мышатах-сосунках, или взрослых морских свинках. Мышатам исследуемую супензию вводят подкожно в области спины в дозе 0,1—0,2 мл, морским свинкам — внутрикожно в подушечки обеих задних конечностей в дозе 0,2—0,5 мл. За животными наблюдают 5—7 дней.

23. Схема главного опыта при определении типа вируса ящура

| Антиген            | Рабочий тип антигена | Сыворотка                 |                           |                           |                                   |                                  |                                  |                                  | Контроль антигена |
|--------------------|----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|-------------------|
|                    |                      | A, титр 1:30<br>тигр 1:30 | O, титр 1:40<br>тигр 1:40 | C, титр 1:20<br>тигр 1:20 | Азия-1,<br>тигр 1:30<br>тигр 1:30 | Саг-1,<br>тигр 1:30<br>тигр 1:30 | Саг-2,<br>тигр 1:20<br>тигр 1:20 | Саг-3,<br>тигр 1:30<br>тигр 1:30 |                   |
|                    |                      | 1:15                      | 1:20                      | 1:10                      | 1:15                              | 1:15                             | 1:10                             | 1:15                             |                   |
| A, титр 1:4        | 1:2                  | ++++                      | —                         | —                         | —                                 | —                                | —                                | —                                |                   |
| O, титр 1:6        | 1:3                  | —                         | ++++                      | —                         | —                                 | —                                | —                                | —                                |                   |
| C, титр 1:8        | 1:4                  | —                         | —                         | +++                       | —                                 | —                                | —                                | —                                |                   |
| Азия-1, титр 1:8   | 1:4                  | —                         | —                         | —                         | +++                               | —                                | —                                | —                                |                   |
| Саг-1, титр 1:8    | 1:4                  | —                         | —                         | —                         | —                                 | +++                              | —                                | —                                |                   |
| Саг-2, титр 1:6    | 1:3                  | —                         | —                         | —                         | —                                 | —                                | +++                              | —                                |                   |
| Саг-3, титр 1:4    | 1:2                  | —                         | —                         | —                         | —                                 | —                                | —                                | +++                              |                   |
| Испытуемый антиген | II                   | ++++                      | —                         | —                         | —                                 | —                                | —                                | —                                |                   |
|                    |                      | 1:2                       | +++                       | —                         | —                                 | —                                | —                                | —                                |                   |
|                    |                      | 1:4                       | ++                        | —                         | —                                 | —                                | —                                | —                                |                   |
|                    |                      | 1:8                       | —                         | —                         | —                                 | —                                | —                                | —                                |                   |
| Контроль сывороток |                      | —                         | —                         | —                         | —                                 | —                                | —                                | —                                |                   |

Примечание. По представленным результатам все стандартные антигены и сыворотки активны и типоспецифичны. Испытуемый антиген относится к типу A.  
4. Р. В. Белоусова и др.

**24. Примерный результат РСК при определении вариантовой принадлежности эпизоотического штамма вируса ящура**

| Вариантные антигены                 | Разведение антигенов | Вариантные сыворотки в предельных титрах |                |                 |                 | Контроль антигенов |
|-------------------------------------|----------------------|--|----------------|-----------------|-----------------|--------------------|
|                                     |                      | A <sub>ct</sub>                          | A <sub>7</sub> | A <sub>20</sub> | A <sub>22</sub> |                    |
| A <sub>ct</sub> , титр 1 : 4        | 1 : 2                | ++++                                     | —              | —               | —               | —                  |
| A <sub>7</sub> , титр 1 : 8         | 1 : 4                | —  | ++++           | —               | —               | —                  |
| A <sub>20</sub> , титр 1 : 6        | 1 : 3                | —  | —              | ++++            | —               | —                  |
| A <sub>22</sub> , титр 1 : 8        | 1 : 4                | —  | —              | —               | ++++            | —                  |
| Антиген испытуемый (эпизоотический) | Ц                    | ++++                                     | ++++           | ++++            | ++++            | —                  |
|                                     | 1 : 2                | ++++                                     | ++++           | ++++            | ++++            | —                  |
|                                     | 1 : 4                | +++                                      | ++             | ++              | ++++            | —                  |
|                                     | 1 : 8                | ++                                       | +              | +               | ++++            | —                  |
|                                     | 1 : 16               | +  | ±              | ±               | ++++            | —                  |
|                                     | 1 : 32               | —  | —              | —               | +++             | —                  |
| Контроль сывороток                  |                      | —  | —              | —               | —               | —                  |

**Заключение.** Испытуемый штамм относится к варианту A<sub>22</sub>.

В случае гибели мышат из их тушек готовят антиген для РСК. У морских свинок в положительных случаях на лапках образуются афты; стенки афт и их содержимое используют в РСК. При необходимости проводят 2–3 «слепых» пассажа. Пробу исследуемого материала считают отрицательной, если в третьем пассаже не будет отмечено дегенерации клеток и падежа белых мышей, а при исследовании полученных из них суспензий в РСК не будет обнаружен антиген вируса ящура.

**Ретроспективная диагностика ящура.** Материалом для исследования на наличие антител к вирусу ящура служат сыворотки крови животных, подозреваемых в переболевании ящуром или другими везикулярными болезнями. Сыворотки крови должны быть взяты не ранее 7 дней с момента появления у животных признаков везикулярного заболевания. На исследование следует направлять 5–10 проб сыворотки от каждой возрастной группы животных. При сомнительных результатах первичного исследования необходимо отобрать кровь повторно от тех же животных спустя 7–10 дней.

Сыворотку, полученную общепринятым методом, консервируют антибиотиками (по 500 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина) или замораживают при минус 20 °С. На исследование направляют не менее 5 мл сыворотки от каждого животного в термосе со льдом.

В лаборатории сыворотку исследуют с помощью реакции радиальной иммунодиффузии (РРИД) и реакции непрямой иммунофлуоресценции (НРИФ).

**РРИД.** Сущность реакции заключается в формировании зоны специфической пропитации вирусных антигенов антителами, включенными в состав агарового геля. РРИД является типоспецифичной.

Для постановки реакции расплавленный агар (2%-ный) смешивают с равным объемом нагретой (до 50–55 °С) испытуемой сыворотки в разведениях 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 и т. д. до 1 : 320 и наливают (по 4 мл) на предметное стекло. В застывшем агаре вырезают лунки (диаметр 4–7,7 мм), которые заполняют эталонными типовыми антигенами. Затем стекла помещают во влажную камеру при температуре 37 °С. Учет результатов проводят через 6–7 ч и окончательно через 18 ч.

Положительная реакция характеризуется образованием кольца пропитации в виде опалесцирующей зоны вокруг лунки с антигеном, гомологичным возбудителю, вызвавшему заболевание.

Антитела, обнаруженные в испытуемой пробе сыворотки, относят к тому серотипу, с антигеном которого они дали положительную реакцию. Их титром считают максимальное разведение испытуемой сыворотки, с которым наблюдается положительная реакция.

После переболевания животных титры антител обычно превышают 1 : 160.

**НРИФ.** Данная реакция основана на том, что наличие антител в сыворотке крови переболевших животных выявляет специфическое свечение (комплекса антиген + антитело), а при использовании сывороток от вакцинированных животных свечение комплекса не наблюдается.

Техника постановки реакции заключается в следующем. На препарат из культуры клеток ВНК-21, ПЭК, ПЭС, инфицированных вирусом ящура любого типа, наносят испытуемую сыворотку (в разведении 1 : 10 и 1 : 20), инкубируют во влажной камере при 37 °С 30 мин, отмывают несвязавшиеся антитела, подсушивают на воздухе и окрашивают смесью рабочих разведений флуоресцирующей антивидовой сыворотки и бычьего альбумина, меченного родамином, инкубируют во влажной камере при 37 °С 30 мин, отмывают, подсушивают и просматривают под люминесцентным микроскопом (объектив × 40, окуляр × 4 или × 5).

Положительная реакция характеризуется зеленым или изумрудно-зеленым свечением цитоплазмы клеток.

Реакция сопровождается постановкой соответствующих контролей.

Диагностический результат считают положительным при обнаружении специфического свечения хотя бы в одной из 5–10 сывороток, присланых из данного хозяйства.

Для определения уровня обнаруженных таким образом антител в испытуемой сыворотке проводят ее титрование. Для этого испытуемую сыворотку разводят от 1:40 до 1:1280 и каждым разведением обрабатывают заведомо инфицированный препарат, как было указано выше. О титре постинфекционных антител в сыворотке судят по предельному ее разведению, которое способно давать положительную НРИФ. Наличие специфического свечения в препаратах, обработанных испытуемой сывороткой в разведениях 1:10, 1:20 и 1:40, свидетельствует о том, что сыворотка была получена в период острого переболевания животного ящуром, т. е. с момента его заболевания прошло около 7 дней, а в разведениях 1:80 и выше — что сыворотка взята от животного-реконвалесцента.

Результаты исследования на ящур оформляют в виде протокола, в котором указывают дату исследования, наименование хозяйства, материала, краткие эпизоотологические данные и т. д. и обязательно наименования компонентов, используемых в исследовании, характеристику контролей.

### Задания

1. Ознакомить студентов с методами лабораторной диагностики ящура.
2. Приготовить антиген для РСК из патматериала (кусочки кожи с венчиком), взятого от больных животных с подозрением на ящур.
3. Поставить главный опыт РСК с целью определения типовой принадлежности вируса ящура.
4. Провести учет реакции и дать заключение.

**Материальное обеспечение:** исследуемый патологический материал (кусочки кожи с области венчика во флаконах с 50%-ным раствором глицерина); стандартные типовые антигены (типа А, О, С); стандартные типовые сыворотки (к типам А, О, С); гемолизин; комплемент; 2%-ная взвесь эритроцитов барана; изотонический раствор — 0,85%-ный раствор NaCl; штативы; пробирки; пипетки на 1, 2 и 5 мл; водяная баня; таблицы по теме; сосуд с дезинфицирующим раствором (2%-ный раствор NaOH); ступки фарфоровые стерильные; стерильное битое стекло; кюветы; чашки Петри; фильтровальная бумага 10×10 см; пинцеты; ножницы.

### Примерный план занятий (6 ч)

#### 1-е занятие.

1. Контрольные вопросы.
2. Объяснение преподавателя.
3. Демонстрация диагностических наборов, выпускаемых биологической промышленностью для диагностики ящура.
4. Самостоятельная работа студентов: приготовление антигена для РСК из патологического материала.

#### 2-е и 3-е занятия.

1. Объяснение преподавателя: а) сущность РСК и ее особенности при диагностике вирусных болезней; б) методика постановки РСК при определении типа вируса ящура.

2. Демонстрация учета титрования комплемента в гемолитической системе.

3. Самостоятельная работа студентов: постановка главного опыта РСК.

4. Объяснение преподавателя (в периоды между этапами РСК):  
а) методика определения вариантовой принадлежности вируса ящура; б) методы ретроспективной диагностики ящура.

5. Самостоятельная работа студентов с помощью преподавателя: учет результатов РСК.

6. Подведение итогов занятия.

7. Задание к следующему занятию.

### Контрольные вопросы

1. Каковы основные свойства вируса ящура?
2. Расскажите о правилах работы с ящурным материалом.
3. Каковы симптомы и эпизоотологические особенности болезни, вызываемой вирусом ящура?
4. Какие методы лабораторной диагностики ящура вы знаете?

**Методические указания.** Продолжительность данного занятия 6 ч. Распределить время можно следующим образом. В первые 2 ч — объяснение преподавателя, демонстрация (см. по плану) и самостоятельная работа студентов — приготовление антигена для РСК. В качестве патматериала можно использовать кусочки кожи от убитого животного или эмбриона коровы, взятого из отдела культур клеток. Ткань массой 2—3 г должна быть уже положена в пенициллиновые флаконы, залита 50%-ным раствором глицерина и помешана в термос с охлаждающей смесью. В следующие 4 ч — объяснение преподавателя, демонстрация диагностических наборов (см. по плану) и самостоятельная работа студентов — постановка главного опыта РСК.

При этом целесообразно учебную группу разделить на подгруппы по 4—5 человек, и каждая подгруппа должна поставить РСК. Студенты получают от преподавателя все компоненты РСК уже в рабочих разведениях, кроме испытуемого антигена.

Преподаватель предварительно проводит разведения всех компонентов (набор диагностикумов для РСК, выпускаемый биопромышленностью) до рабочего разведения и проверяет их в РСК.

Учет и интерпретацию результатов в РСК желательно проводить с каждой подгруппой, записывая их результаты на доске по схеме и с коллективным обсуждением.

С целью экономии компонентов можно для студентов приготовить неудвоенные разведения стандартных сывороток и антигенов. Кроме того, вполне достаточно исследуемый материал исследовать только с сыворотками к типам А, О и С.

При приготовлении демонстрации РРИД и НРИФ используют компоненты из диагностических наборов, выпускаемых ВНИИИ, или подбирают другие вирусы, которые бы давали в этих реакциях эффективные результаты.

## Тема 5

### ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ПАРАГРИППА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Парагрипп крупного рогатого скота — остро протекающая контагиозная вирусная болезнь, главным образом телят, характеризующаяся поражением органов дыхания.

Возбудитель болезни — РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Paramyxoviridae. Парагриппозные вирусы неоднородны в отношении антигенных структуры. Они подразделяются на четыре серологических типа, поражающих человека и животных. Вирус, вызывающий заболевание крупного рогатого скота, относится к третьему серотипу и потому носит название вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота (ПГ-3).

Вирус ПГ-3 широко распространен среди крупного рогатого скота, что подтверждается обнаружением антител у 95 % обследованных животных. Однако клинически ПГ-3 проявляется обычно при воздействии на организм стрессовых факторов, к которым относятся транспортировка, скученное содержание в помещениях с плохой вентиляцией и т. д.

Характерные клинические признаки парагриппозной инфекции у телят: повышение температуры тела до 40–41,5 °C, сухой резкий кашель, учащенное дыхание, угнетение, снижение аппетита, серозное, а затем слизисто-гнойное истечение из носовой полости, симптомы бронхопневмонии. Продолжительность болезни 7–12 дней. На исход болезни влияют факторы, осложняющие течение болезни (стрессовые воздействия, условно-патогенные микроорганизмы). У взрослого поголовья и телят с материнскими антителами преобладает бессимптомное течение болезни.

При вскрытии павших животных отмечают катаральное воспаление слизистых оболочек респираторного тракта и верхушечных долей легких. На верхушечных, сердечных и добавочных долях легких обнаруживают серовато-красные очаговые уплотнения. Заглоточные, шейные и средостенные лимфатические узлы гипертрофированы, содержат участки некроза.

Предположительный диагноз на парагриппозную инфекцию опирается на сведения о наличии стресса, эпизоотической ситуации, клинических признаков и патологоанатомических изменений. Лабораторные исследования подтверждают предположительный диагноз.

Лабораторная диагностика парагриппа основана: а) на индикации специфического антигена в патматериале в реакции иммунофлуоресценции; б) на выделении вируса и его идентификации в реакции торможения гемадсорбции или реакции задержки гемагглютинации; в) ретроспективной диагностике — установлении прироста антител в парных сыворотках к специальному антигену вируса ПГ-3.

**Взятие и подготовка материала для исследования.** В лабораторию для исследования направляют патологический материал от больных животных, взятый в период максимального проявления у них клинических признаков (чаще с 1-го по 7-й день болезни), а от вынужденно убитых или павших животных — не позднее чем через 1–2 ч после их гибели.

Учитывая, что вирус выделяется с носовой слизью, от больных животных берут мазки со слизистой оболочки носовой полости или непосредственно носовой секрет (пропитыванием поролонового тампона). Этот материал предназначается для обнаружения вируса с помощью РИФ и для выделения вируса. Кроме того, от больных и переболевших животных берут пробы крови для получения парных сывороток.

От павших и вынужденно убитых животных берут кусочки носовой перегородки, трахеи, легких, селезенки, почки, регионарные лимфатические узлы и при поносах — кусочки тонкого кишечника.

Флаконы с патматериалом доставляют в лабораторию в термосе со льдом. В лаборатории флаконы с тампонами встряхивают 2–3 мин, тампоны отжимают и удаляют, а содержимое флакона центрифицируют при 2000 мин<sup>-1</sup> 10 мин. Надосадочную жидкость отсасывают в стерильную пробирку, куда вносят 500 ЕД/мл пенициллина и 500 мкг/мл стрептомицина, выдерживают при 4 °C 2–4 ч и используют для выделения вируса, заражая культуры клеток. Из осадка, в котором содержатся клетки слизистых оболочек, готовят мазки для исследования методом иммунофлуоресценции.

Из сосков со слизистых оболочек павших животных вначале делают мазки, а затем термолизисом (замораживанием и оттаиванием) клеток способствуют выходу из них вируса в добавленный к тканям физиологический раствор. Далее полученную взвесь обрабатывают способом, описанным для тампонов, и используют для выделения вируса. Из легкого и лимфатических узлов готовят отпечатки.

Из кусочков органов готовят 10–20%-ную суспензию для выделения возбудителя.

**Индикация парагриппозного антигена в патологическом материале методом иммунофлуоресценции.** Парагриппозный вирус созревает на поверхности клетки и сравнительно медленно освобождается от нее, поэтому отторгаемые в ходе воспалительного процесса клетки эпителия носовых ходов и ротоносоглотки больного животного, как правило, содержат специфический вирусный антиген и зрелые вирионы. Специфический антиген в отторгнутых клетках эпителия верхних дыхательных путей обнаруживают методом

иммунофлуоресценции в мазках и отпечатках, приготовленных из патологического материала.

Полученные препараты подсушивают на воздухе, фиксируют в ацетоне 5 мин и окрашивают флуоресцирующими сыворотками, имеющимися в наборе диагностических препаратов, выпускаемых биологической промышленностью. Каждой сывороткой окрашивают по 4 препарата из каждого органа. В качестве контроля используют препараты, в которых иммунофлуоресценция подавлена соответствующей вирусу сывороткой до нанесения на антиген флуоресцирующих антител.

Если в препарате находится антиген вируса парагриппа, то он выявляется в виде ярких зеленовато-желтых, различных по величине гранул или в виде диффузного свечения в цитоплазме. Вирусный антиген считают обнаруженным, если наблюдают по 3—5 и более флуоресцирующих клеток не менее чем в трех полях зрения.

Обычно половину мазков от одного животного обрабатывают парагриппозными сыворотками, а половину — другими меченными сыворотками, содержащими антитела к вирусам, способным также, как вирус парагриппа, вызывать кишечно-респираторный синдром у крупного рогатого скота (аденовирусу, респираторно-синцитиальному вирусу, вирусу диареи, вирусу инфекционного ринотрахеита и др.).

**Выделение вируса парагриппа.** Материалом для выделения вируса служат надосадочные жидкости (центрифугаты) смывов со слизистых оболочек больных животных и суспензии их органов. Эффективность выделения вируса возрастает при однократном замораживании и оттаивании проб тканей перед получением из них суспензий. Многократное замораживание и оттаивание материала, а также длительное его хранение резко снижают возможность выделения вируса из-за его малой устойчивости.

Вирус может быть выделен заражением куриных эмбрионов в аллантоисную полость. При этом размножившийся вирус обнаруживается в реакции гемагглютинации и заражением экстрафетами нальными жидкостями куриного эмбриона чувствительных культур клеток.

Наиболее пригодны для выделения вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота первично-трипсизированные культуры клеток почек эмбриона коров и почек новорожденных телят.

Перед заражением монослоем 3 раза отмывают от сыворотки раствором Хенкса. Затем на культуру клеток наносят инфицированный материал по 0,2 мл на пробирку и выдерживают в термостате 60—90 мин при температуре 37 °С. После адсорбции вируса на поверхности клеток вируссодержащую суспензию удаляют, а зараженные культуры заливают средой 199 без сыворотки, или 0,5%-ным раствором гидролизата лактальбумина с добавлением 2—3%-ной сыворотки крови телят, не содержащей антител к вирусу ПГ-3. Зараженную культуру клеток инкубируют при 37 °С до

7—14 сут. Ежедневно пробирки просматривают под микроскопом с целью выявления цитопатического действия и ставят реакцию гемадсорбции.

Все штаммы ПГ-3 вызывают очаговое округление и зернистое перерождение пораженных клеток, образование синцития и симпластов. Симплсты образуются в результате слияния нескольких клеток. Цитологическими исследованиями через 24—72 ч после заражения в цитоплазме клеток могут быть обнаружены эозинофильные тельца-включения.

При отсутствии ЦПД в первых пассажах или слабом его проявлении проводят три последовательных пассажа. Каждый пассаж проверяют в реакции гемадсорбции с эритроцитами морской свинки.

Тест гемадсорбции для обнаружения накопившегося в культуре клеток вируса парагриппа воспроизводится на 1—7-й день после заражения культуры исследуемым материалом, т. е. до появления видимых цитопатических изменений. В первых пассажах вируса, когда ЦПД еще не проявляется, гемадсорбция является основным методом его индикации в культуре клеток.

Реакцию гемадсорбции ставят в пробирках с культурой клеток на 3—7-й день после заражения ее исследуемым материалом. В пробирки вносят по 0,2 мл 0,5%-ной вззвеси эритроцитов морской свинки. Пробирки выдерживают в горизонтальном положении клеточным слоем вниз при комнатной температуре в течение 10—15 мин, после чего их слегка встряхивают для отделения от клеток неадсорбированных эритроцитов, удаляют вззвесь эритроцитов, затем микроскопируют.

При наличии вируса парагриппа в материале реакция гемадсорбции положительна: поверхность зараженных клеток усыпана плотно прикрепившимися неподвижными эритроцитами (рис. 89). Для парагриппозных вирусов характерен диффузный тип реакции гемадсорбции. В незараженных культурах эритроциты медленно проплывают в поле зрения или совсем не обнаруживаются.

Использование в реакции гемадсорбции стерильных растворов и стерильно полученных эритроцитов позволяет при отрицательном teste гемадсорбции продолжать после добавления питательной среды инкубацию культур клеток. В противном случае использованные для данного теста пробирочные культуры утрачивают стерильность и исключаются из дальнейшего эксперимента.

При отсутствии гемадсорбции и цитопатических изменений сразу проводят следующий пассаж вируса, считая первый пассаж «слепым». В качестве материала для второго пассажа используют культуральную жидкость от первого пассажа и суспензированый в ней детрит инфицированных клеток, подвергнутых замораживанию и оттаиванию. При отсутствии гемадсорбции в культурах клеток пятого пассажа результат исследования считают отрицательным.

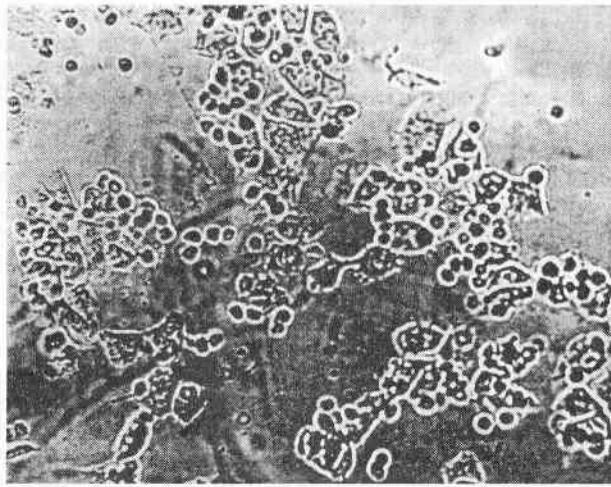


Рис. 89. Гемадсорбция в перевиваемой культуре клеток МДВК, зараженной вирусом ПГ-3 крупного рогатого скота

**Идентификация вируса парагриппа крупного рогатого скота.** Чтобы убедиться, что обнаруженный по ЦПД или гемадсорбции вирус является парагриппозным, ставят реакции торможения гемадсорбции и торможения гемагглютинации со специфической к вирусу ПГ-3 сывороткой, содержащейся в диагностическом наборе биофабричного производства.

Набор сухих диагностикумов для диагностики парагриппа-3 крупного рогатого скота представляет собой ампулы или флаконы с лиофильно высушеными: а) антигеном ПГ-3 для РТГА; б) специфической к вирусу ПГ-3 сывороткой для РТГА и РТГАд; в) флуоресцирующей сывороткой для реакции иммунофлуоресценции; г) контрольной (отрицательной) сывороткой для РТГА и РТГАд. Перед работой ампулы вскрывают и сыворотки разводят в соответствии с прилагаемым к набору наставлением по его применению.

Реакция торможения гемадсорбции для идентификации вируса парагриппа крупного рогатого скота ставится так. 15 пробирочных культур заражают внесением в них по 0,2 мл вируссодержащего материала, давшего в предыдущем пассаже положительную реакцию гемадсорбции. С целью получения возможно более быстрого ответа реакция может быть поставлена на части пробирочных культур того же пассажа, в котором впервые установлена положительная реакция гемадсорбции. Через 3–7 дней после заражения из пробирок удаляют питательную среду, клетки отмывают раствором Хенкса, в пробирки вносят по 0,5 мл специфической к вирусу ПГ-3 гипериммунной сыворотки в разведении

1 : 10. В три контрольные пробирки наливают по 0,8 мл раствора Хенкса. Пробирки оставляют на 30 мин при комнатной температуре в горизонтальном положении для контакта клеток с антителами. Затем во все пробирки заливают по 0,2 мл 0,5%-ной суспензии эритроцитов морской свинки. После 30-минутной экспозиции при 22 °С проводят учет реакции гемадсорбции, которая отсутствует в тех пробирках, где вирус нейтрализовался специфической сывороткой.

Реакция торможения гемагглютинации для идентификации вируса парагриппа ставится в панелях с лунками из оргстекла. Вначале вирус титруют в РГА с 1%-ной суспензией эритроцитов морской свинки при комнатной температуре. Результаты титрования учитывают через 60–90 мин при полном оседании эритроцитов в контрольных лунках. Парагриппозный вирус обычно имеет низкий гемагглютинирующий титр (1 : 8—1 : 64). Из титрованного вируса готовят его рабочее разведение с титром 4 ГАЕ и контролируют его в РГА.

Основной опыт реакции торможения гемагглютинации при идентификации вируса парагриппа состоит в том, что в первом ряду готовят в объеме 0,2 мл двукратные разведения специфической сыворотки до указанного на этикетке ампулы титра, во втором ряду аналогично разводят отрицательную сыворотку. В каждую лунку обоих рядов вносят по 0,2 мл рабочего разведения вируса. Одновременно ставят контроль эритроцитов (0,2 мл эритроцитов и 0,4 мл физиологического раствора). Панели встряхивают и после 60–90-минутного контакта сыворотки с вирусом в каждую лунку добавляют по 0,2 мл 1%-ной взвеси эритроцитов.

Реакцию учитывают через 60–90 мин.

Идентификация вируса считается завершенной, если специфическая сыворотка тормозит гемагглютинирующую активность вируса.

**Ретроспективная диагностика парагриппа крупного рогатого скота.** При серологической диагностике данного заболевания исследуют парные сыворотки больных животных для выявления прироста титров антител в реконвалесцентной сыворотке по сравнению с сывороткой, взятой в начале заболевания (не позднее 4–5-го дня). Интервал между взятием первой и второй сывороток 2–3 нед. Первую сыворотку замораживают и исследуют одновременно со второй в течение 3 дней после ее получения.

Для удаления неспецифических ингибиторов пробы сыворотки прогревают при температуре 56 °С в течение 30 мин.

Сыворотки исследуют в реакции торможения гемагглютинации или в реакции нейтрализации вирусных гемагглютининов. В реакциях используется антиген из набора диагностических препаратов, который представляет собой культуральный вирус парагриппа-3, имеющий гемагглютинирующий титр не менее 256 ГАЕ и не обладающий вирулентностью.

Реакцию торможения гемагглютинации ставят аналогично тому, как это делают при идентификации вируса. За титр антител принимают то наибольшее разведение сыворотки, которое полностью тормозит гемагглютинирующую активность вируса.

Четырехкратный и больше прирост титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой указывает на активный инфекционный процесс в организме, вызванный тем вирусом, на который в организме вырабатываются антитела, т. е. в данном случае на вирус парагриппа.

### Задание

Индикация вируса ПГ-3 в культуре клеток и его идентификация в РТГАд.

**Материальное обеспечение:** микроскопы; осветители; подставки для микрокопирования пробирок; физиологический раствор; сыворотка, специфическая к вирусу ПГ-3; пипетки; стакан с дезинфицирующим раствором; пробирки с культурой клеток почки эмбриона коровы (ПЭК), зараженной вирусом ПГ-3 (вакцинированный штамм) и незараженной (контрольные); 0,5%-ная взвесь эритроцитов морской свинки.

### Примерный план занятия (2 ч)

1. Контрольные вопросы.
2. Самостоятельная работа студентов: а) индикация вируса в культуре клеток по гемадсорбции и зарисовка РГАд; б) индикация вируса в культуре клеток по ЦПД и получение вируссодержащего материала; в) идентификация обнаруженного вируса в РТГАд.
3. Подведение итогов занятия
4. Задание к следующему занятию.

### Контрольные вопросы

1. Каковы основные клинические и патологоанатомические признаки парагриппа крупного рогатого скота?
2. Какой патологический материал получают от больных и павших животных для лабораторной диагностики?
3. Каковы методы обнаружения вируса парагриппа-3 (ПГ-3) в патматериале?
4. Какие приемы выделения вируса ПГ-3 вы знаете?
5. Каковы методы идентификации вируса ПГ-3?
6. Какой материал используют при ретроспективной диагностике, каковы методы его исследования при диагностике парагриппа и каков принцип интерпретации результатов?

**Методические указания.** Для организации занятия по данной теме желательно иметь пробирочную культуру клеток почки эмбриона коровы. Культуру клеток целесообразно разделить на несколько групп пробирок, достаточных для занятий в один учебный день, и заразить культуру клеток каждой такой группы одним из последовательных десятичных разведений вируса (вакцина «Паравак»). Такое заражение позволит выявлять вирус сначала в

пробирках, зараженных небольшими разведениями ( $10^{-1}$ — $10^{-3}$ ), и позже — в пробирках с разведениями  $10^{-4}$ — $10^{-5}$ . Это даст возможность в течение 3—5 дней использовать на занятиях со студентами пробирки от одного дня заражения.

Если преподаватель не имеет возможности воспользоваться культурой клеток ПЭК, то можно все рекомендуемые для занятия работы провести на культуре клеток куриного эмбриона с заражением их вакцинированным штаммом Н вируса ньюкаслской болезни. В этом случае следует использовать в реакции гемадсорбции 0,5%-ную взвесь куриных эритроцитов.

И наконец, если вообще не предоставляется возможности использовать на занятии любой гемагглютинирующий вирус и чувствительную к нему культуру клеток, то необходимо подготовить фиксированные препараты, иллюстрирующие незараженную культуру клеток и положительную реакцию гемадсорбции (см. Общая вирусология, тема 6). Фиксированные препараты могут представлять собой либо пробирочные культуры клеток с фиксирующей жидкостью, либо выращенные на покровных стеклах, окрашенные гематоксилином-эозином и заключенные в бальзам. Окрашенные препараты могут быть использованы на занятиях в течение многих лет.

**Методика окраски культуры клеток гематоксилином-эозином.** Покровное стекло с монослоем клеток (если с ЦПД, то не более 50 % дегенерированных клеток) извлекают из пробирки, отполаскивают от среды в растворе Хенкса, затем фиксируют в растворе Буэна 10—15 мин и помещают в 70%-ный этиловый спирт не менее чем на 10 мин (можно на более длительное время).

Этапы окраски препарата: 1) промыть в дистиллированной воде; 2) окрасить гематоксилином в течение 2—20 мин; 3) отмыть краску водопроводной водой. Контролировать время окраски по восприятию ее ядрами клеток; 4) промыть препарат в водопроводной воде с добавлением нашатырного спирта (3—4 капли на 10 мл воды) до изменения цвета препарата из фиолетового в синий; 5) промыть в дистиллированной воде; 6) окрасить эозином (от нескольких секунд до 2—3 мин); 7) промыть в дистиллированной воде (несколько секунд). Контролировать время окраски по восприятию ее цитоплазмой клеток; 8) обезводить препарат: а) проводкой через 70-, 96-, 100%-ный этиловый спирт (по несколько секунд); б) карбол-ксилолом — 1 мин; в) ксилолом — 15 мин; 9) заключить препарат в бальзам на предметном стекле (слоем клеток к стеклу).

Реактивы, используемые при окраске препаратов:

раствор Буэна — 15 частей насыщенного водного раствора пикриновой кислоты, 5 частей нейтрального формалина, 1 часть ледяной уксусной кислоты;

гематоксилин Майера — на 1 л дистиллированной воды берут 2 г гематоксилина, 0,2 г NaI, 50 г калийных квасцов, 50 г хлоргидрата. Растворяют в указанной последовательности, подогревая на огне. Готовят не менее чем за 1 мес до использования;  
эозин — 1 г на 100 мл дистиллированной воды;  
карбол-ксилол — на 4–5 частей ксилола 1 часть фенола чистого (кристаллической карболовой кислоты).

## Тема 6

### ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ПНЕВМОЭНТЕРИТОВ ТЕЛЯТ С ПОМОЩЬЮ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ НАБОРОВ БИОФАБРИЧНОГО ПРОИЗВОДСТВА

Цель занятия — отработка студентами практических навыков по диагностике вирусных болезней животных. Для этого ставится задача: обнаружить в патматериале и идентифицировать вирусы, вызывающие у телят пневмоэнтериты. Термином «пневмоэнтериты» обозначена искусственная группа сходных болезней вирусной этиологии, возбудители которых не имеют родства между собой. К этой группе относятся инфекционный ринотрахеит (ИРТ), вирусная диарея (ВД), парагрипп 3-го типа (ПГ-3), адено-вирусная (адено-) и респираторно-синцитиальная (РС) инфекции крупного рогатого скота.

У названных инфекций много сходных черт:

эпизоотология — болеет в основном молодняк до 5–6-месячного возраста, преимущественно в осенне-зимний сезон. Болезнь протекает чаще в виде энзоотий, летальность низкая, вирусонасительство длительное;

симптомы: лихорадка, ринит, кашель, истечения из носа, понос; патологоанатомические изменения: гиперемия слизистых оболочек дыхательных путей, отек и гиперемия бронхиальных и средостенных лимфатических узлов;

патологический материал, направляемый в лабораторию, — слизь из носа и глотки, кусочки слизистых оболочек носа, трахеи, бронхов, фекалии;

вирусы, вызывающие пневмоэнтериты, размножаются в культурах клеток почек или тестикул эмбрионов крупного рогатого скота с образованием ЦПД. Их антигены могут быть выявлены в РДП и РИФ (наряду с другими методами);

вирус ПГ-3 агглютинирует эритроциты морской свинки.

Выбор именно этих инфекций в качестве учебной задачи определялся следующими соображениями:

инфекции, относящиеся к группе пневмоэнтеритов, очень широко распространены и наносят животноводству существенный урон. Однако диагностируются они еще редко, так как не вызыва-

ют высокой летальности, протекают вяло и на них недостаточно обращают внимания. Эти инфекции часто проходят под другими диагнозами и даже вообще не замеченными. Решение поставленной задачи позволит привлечь внимание будущих ветеринарных специалистов к проблеме превмоэнтеритов;

биологической промышленностью выпускаются специальные диагностические наборы, позволяющие производить дифференциацию пневмоэнтеритов телят не только в лабораторных условиях, но и непосредственно в хозяйствах при наличии несложного оборудования (люминесцентного микроскопа) и соответствующей квалификации ветперсонала. Ознакомление с этими наборами, их возможностями и методикой применения в практике — одна из задач данной темы. Важность знакомства с диагностическими наборами определяется еще и тем, что аналогичные наборы выпускаются для диагностики не только пневмоэнтеритов телят, но и других инфекций;

дифференциация пневмоэнтеритов телят приобретает большое значение еще и в связи с разработкой и промышленным производством биологических препаратов для профилактики каждой инфекции этой группы по отдельности;

сходство инфекций, объединяемых понятием «пневмоэнтериты», и вызывающих их вирусов, удобно методически для решения задачи их дифференциации.

Приводим содержание диагностических наборов для диагностики пневмоэнтеритов телят; выпускаемых Приволжской биофабрикой.

*Набор для диагностики ИРТ крупного рогатого скота содержит:*  
а) специфическую сыворотку лошади для РН и РДП; б) контрольную (отрицательную) сыворотку лошади для РН и РДП; в) специфический меченный глобулин лошади; г) контрольный (отрицательный) меченный глобулин лошади.

*Набор для диагностики ВД крупного рогатого скота содержит:*  
а) вирус диареи, вакциниальный штамм для РН; б) антиген специфический вируса диареи для РСК и РДП; в) антиген контрольный (отрицательный); г) сыворотку, специфическую к вирусу диареи для РСК и РДП; д) сыворотку, специфическую к вирусу диареи для РН; е) контрольную сыворотку (отрицательную); ж) флуоресцирующую сыворотку к вирусу диареи.

*Набор для диагностики ПГ-3 крупного рогатого скота содержит:*  
а) антиген агглютинирующий; б) сыворотку специфическую; в) сыворотку отрицательную; г) сыворотку флуоресцирующую.

*Набор для диагностики адено-вирусной инфекции крупного рогатого скота содержит:*  
а) антиген специфический 1-й подгруппы; б) сыворотку специфическую 1-й подгруппы для РДП; в) сыворотку специфическую 1-й подгруппы для РСК; г) сыворотку флуоресцирующую 1-й подгруппы; д) антиген специфический 2-й подгруппы; е) сыворотку специфическую 2-й подгруппы для РДП;

ж) сыворотку специфическую 2-й подгруппы для РСК; з) сыворотку флуоресцирующую 2-й подгруппы; и) антиген отрицательный; к) сыворотку отрицательную для РДП; л) сыворотку отрицательную для РСК.

*Набор для диагностики РС-инфекции крупного рогатого скота содержит:* а) антиген специфический РС-вируса; б) антиген контрольный (отрицательный); в) сыворотку специфическую для РДП и РСК; г) сыворотку контрольную (отрицательную); д) сыворотку специфическую флуоресцирующую.

Для обнаружения антител к вирусам адено-, РС-, ПГ-3, ИРТ и ВД выпускают набор эритроцитарных диагностикумов для реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

### Задание

Установить, какой вирус содержится в патматериале, полученным от больных телят с признаками пневмоэнтеритов.

**Материальное обеспечение:** биофабричные наборы для диагностики ИРТ, ПГ-3, ВД, РС- и аденоизвестной инфекций крупного рогатого скота; слизистые оболочки трахеи и бронхов больных телят; люминесцентные микроскопы; термостат; кюветы; пипетки; ацетон; физиологический раствор.

#### Примерный план занятий (4 ч)

1-е занятие (2 ч).

1. Контрольные вопросы.
2. Постановка задачи и уточнение методики РИФ.

3. Демонстрация диагностических наборов.

4. Самостоятельная работа студентов: а) получение отпечатков патматериала; б) фиксация отпечатков в ацетоне; в) сушка.

2-е занятие (2 ч).

1. Обработка отпечатков флуоресцирующей сывороткой.

2. Контрольные вопросы.

3. Отмывание препаратов.

4. Сушка препаратов.

5. Микроскопирование препаратов.

6. Обсуждение результатов РИФ.

### Контрольные вопросы

1. Каковы клинические и патологоанатомические признаки пневмоэнтеритов у телят?

2. Каковы методы лабораторной диагностики и дифференциации пневмоэнтеритов телят?

3. В чем состоит методика постановки РИФ?

**Методические указания.** Тщательная предварительная подготовка антигенов и сывороток имеет решающее значение для ус-

пешного проведения занятий по этой теме. Поскольку полную дифференциацию пневмоэнтеритов телят на действительном патматериале в условиях лабораторных занятий со студентами произвести практически невозможно, целесообразно ограничить задачу идентификацией вирусов из патматериала в РИФ, взяв в качестве патматериала кусочки слизистых оболочек трахеи или бронхов (можно получить на мясокомбинате).

Однако надо учитывать трудности приобретения для учебных целей диагностических наборов в достаточном количестве, их дороговизну и вероятность приобретения их не для всех инфекций или некомплектными. Поэтому, если нет возможности дать на занятия действительный патматериал и обеспечить всех учащихся диагностическими наборами, допустимо упрощение подготовки занятий так, чтобы, не снижая их учебного и познавательного эффекта, существенно облегчить их подготовку. В случае такой необходимости можно рекомендовать использовать на занятиях только один антиген и одну сыворотку.

Для РИФ можно взять сыворотку из соответствующего набора. В качестве антигена допустимо применить подходящую ткань крупного рогатого скота (для получения отпечатков), а в качестве специфической сыворотки — флуоресцирующую сыворотку из аденоизвестного набора (любой подгруппы), но только в максимальной концентрации. Возможно также использование флуоресцирующих сывороток из наборов ВД и ПГ-3 после их апробации с тканями крупного рогатого скота на активность (но не специфичность). Возможно также использование в качестве антигена ткани (трахеи) кролика и специфической флуоресцирующей антикроличьей (антивидовой) сыворотки. Во всех случаях таких подмен следует делать поправку на неспецифичность флуоресценции, вследствие чего локализация флуоресцирующего антигена может быть неестественной. Для проведения занятий по такой упрощенной методике на каждую учебную группу необходимо подготовить по пять наборов сывороток, в каждой из которых положительная только одна, но в разных наборах она должна быть обозначена по-разному (ИРТ, ВД, ПГ-3, РС, адено).

Учебную группу рекомендуется разделить на 5 бригад (по 2–5 человек). Выдать каждой бригаде антиген (кусочки органов) под разными номерами и по набору из пяти сывороток. Сами наборы сывороток должны быть также пронумерованы. Каждой бригаде поставить задачу — определить с помощью полученного ею набора сывороток, какой вирус содержится в полученном патматериале, используя для этого РИФ. Результаты во всех бригадах будут, естественно, разные в зависимости от того, какая сыворотка в их наборе оказалась положительной. При переходе к аналогичному занятию в новой учебной группе номера сывороточных наборов можно поменять.

# **Приложение**

## **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ К ЗАНЯТИЯМ ПО ВИРУСНЫМ БОЛЕЗНЯМ**

### **ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МОДЕЛИРОВАННЫХ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ**

#### **ВИРУСНЫЕ ПНЕВМОЭНТЕРИТЫ ТЕЛЯТ**

К этой группе болезней относятся: инфекционный ринотрахеит, парагрипп-3, вирусная диарея, адено-вирусная, респираторно-синцитиальная, рота- и коронаинфекции крупного рогатого скота.

**Лекционный курс:** эпизоотология, этиология, патогенез, клинические признаки болезни, патологоанатомические изменения, диагностика, специфическая профилактика, меры борьбы.

**Лабораторно-практические занятия по теме:  
«Дифференциальная диагностика вирусных пневмоэнтеритов телят»**

**I. План проведения лабораторно-практических занятий (12 ч в течение 3 нед с интервалом в одну неделю).**

**Занятие № 1. Эпизоотологические данные и клинико-патологоанатомические признаки вирусных пневмоэнтеритов телят. Взятие патматериала для лабораторных исследований.**

**1-й час:** 1) опрос студентов по теме, касаясь преимущественно инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной, адено- и ротавирусной инфекций крупного рогатого скота; 2) объяснение преподавателя — этапы лабораторной дифференциальной диагностики вирусных пневмоэнтеритов телят.

**2-й час:** 1) изучение клинических признаков вирусного пневмоэнтерита у экспериментально зараженных телят (в помещении вивария); 2) получение от больных животных материалов для лабораторных исследований — носовых, конъюнктивальных смывов, крови и фекалий; 3) этикетирование флаконов с пробами материала и консервирование его на период транспортировки; 4) составление сопроводительного документа.

**3-й час:** подготовка материала к исследованию (изготовление мазков, гомогенизация, центрифугирование, добавление антибиотиков, бактериологический контроль).

**4-й час:** выделение вируса из образцов патматериала на культуре клеток почки эмбриона коров (ПЭК) или бычьих testикулов (БТ): отбор пробирочных культур микроскопированием;

заражение культуры клеток (внесение исследуемого материала, адсорбция вируса на культуре клеток, добавление поддерживающей среды). Часть пробирок должна содержать культуру клеток, выращенную на покровных стеклах (культуру клеток заражает преподаватель в присутствии студентов);

представители от группы ведут ежедневный контроль состояния зараженной культуры клеток;

часть пробирочных культур (в том числе с покровными стеклами) преподаватель без студентов заражает одним из вирусов — возбудителей пневмоэнтеритов. Они используются на занятии № 2 в случае неудачи при выделении вируса студентами;

во флаконы с раствором Хенкса, используемые для получения смывов со слизистых оболочек, рекомендуется заблаговременно добавить в значительной дозе один из вирусов — возбудителей пневмоэнтеритов. Взятую таким образом пробу патматериала следует инкубировать 1 ч при температуре 22 °C (или лучше 37 °C) для адсорбции вируса на клетках;

рекомендуемый педагогический прием значительно повысит эффективность обнаружения и выделения вируса студентами.

**Занятие № 2. Обнаружение вируса в патматериале от больного теленка и идентификация вируса.**

**1-й час:** микроскопирование пробирочных культур клеток, зараженных на занятии № 1. Учет результатов по ЦПД, индикация вируса парагриппа-3 в РГАд (реакция гемадсорбции), идентификация вируса парагриппа-3 в РТГАд (реакция торможения гемадсорбции),

**2—3-й часы:** окраска препаратов из патматериала и из зараженной патматериалом культуры клеток коммерческими мечеными сыворотками, специфическими к вирусам инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, респираторно-синцитиального и адено-вируса крупного рогатого скота.

**4-й час:** исследование препаратов в реакции иммунофлуоресценции на наличие антигенов вирусов ИРТ, ВД, РС, адено-вируса.

**Занятие № 3. Ретроспективная серологическая диагностика вирусных пневмоэнтеритов телят.**

**1-й час:** получение крови, а затем сыворотки теленка, от которого был взят на занятии № 1 материал для лабораторной диагностики.

**2—3-й часы:** 1) обнаружение и титрование антител к вирусам-возбудителям в парных сыворотках теленка (получены на занятиях № 1 и 3);

**Примечание.** Для большей уверенности в получении желаемых результатов сыворотки теленка можно подменить заранее исследованными позитивными полевыми или взятыми из диагностического набора сыворотками.

В случае обнаружения у экспериментально зараженного теленка вируса ИРТ ставят РНГА, аденоовириуса — РНГА, респираторно-синцитиального вируса — РНГА, вируса парагриппа-3 — РТГА. Реакции ставят с использованием выпускаемых биопромушленностью диагностических препаратов;

2) составление плана мероприятий по профилактике и ликвидации установленного заболевания.

**4-й час:** выставление зачета по пройденной теме с учетом результативности лабораторных исследований и теоретических знаний студентов.

## II. Материальное обеспечение занятий по теме: «Дифференциальная диагностика вирусных пневмоэндититов телят»

**Занятие № 1.** Для проведения его необходимы: теленок, экспериментально зараженный одним или одновременно несколькими вирусами — возбудителями пневмоэндитита телят; набор инструментария и материалы для получения патологического материала от зараженного животного и выделения вируса (стерильные ватно-марлевые тампоны, пинцеты в стерилитаторе, флаконы из-под антибиотиков пустые и с 3–4 мл раствором Хенкса или физраствора, содержащего пенициллин и стрептомицин, банка для сбора фекалий, пробирки бактериологические для получения крови, иглы для взятия крови, лейкопластырь для этикеток, термос со льдом, бланки сопроводительного письма, центрифуга, антибиотики (пенициллин и стрептомицин), питательные среды для бактериологического контроля — МПА, МПБ, пробирочные культуры клеток — ПЭК или ТБ, микроскопы с осветителями, пипетки на 1 и 2 мл, 0,5%-ный гидролизат лактальбумина на растворе Хенкса, банка для слива ростовой питательной среды, горелки спиртовая и газовая, предметные стекла).

**Занятие № 2.** Для проведения его необходимы: пробирки с зараженной культурой клеток, в том числе со стеклышками; мазки-отпечатки из органов или смызов; микроскопы с осветителями; микроскопы люминесцентные; сыворотка специфическая к вирусу парагриппа-3 крупного рогатого скота (для РТГА); ФИТЦ-коньюгаты специфических сывороток к вирусам инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, респираторно-синцитиального и аденоовириуса крупного рогатого скота (из диагностических наборов биофабричного производства); взвесь эритроцитов морской свинки (0,4%-ная) для РГА; физиологический раствор (или раствор Хенкса) для РГА; фосфатный буфер pH 7,2–7,4 (для отмывания мазков в РИФ); пипетки на 1 и 2 мл; чашки Петри (влажные камеры для мазков); стекла предметные; кюветы вертикальные (для фиксации мазков); стакан с дезраствором; ацетон; термостат.

**Занятие № 3.** Для проведения его необходимы: иглы для взятия крови (стерильные); пробирки бактериологические (стерильные); пипетки на 1 и 2 мл (стерильные), спира для отделения сгустка крови от стекла; микротитратор Такачи; диагностические наборы биофабричного производства для обнаружения в РТГА — к вирусу парагриппа-3; взвесь (1%-ная) эритроцитов морской свинки; физиологический раствор (для РТГА); разбавитель (для РНГА); стакан с дезраствором; вода дистиллированная; спирт; горелка; груши резиновые; термостат; холодильник.

## III А. Экспериментальное воспроизведение инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Выделение и поддержание вируса

Для воспроизведения заболевания рекомендуется вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, штамм 4016 патогенный.

| Условия работы с вирусом                  | Экспериментальное воспроизведение болезни   | Лабораторное культивирование на культуре клеток*  |
|---|---|---|
| Чувствительный объект                     | Крупный рогатый скот  | Первичные: ПЭК, ТБ, их субкультуры<br>Перевиваемые: MDBK, ПТ-80, TR, ППЭК<br>3–4-суточные |
| Возраст                                   | 2–4 мес   | —   |
| Метод заражения                           | ИнTRANАЗАЛЬНО   | —   |
| Заражающая доза                           | $2 \cdot 10^6$ ТЦД <sub>50</sub> /мл  | —   |
| Инкубационный период                      | 2–4 дня   | 2–4 дня   |
| Признаки заболевания                      |   | Округление  |
| клинические                               | Повышение температуры до 41 °C, ринит, конъюнктивит, кашель, угнетение                                |   |
| патологоанатомические                     | Катаральное воспаление верхних дыхательных путей, верхушечных долей легких, язвочки на слизистой носа |   |
| Продолжительность болезни                 | 7–12 дней   | —   |
| Летальный исход                           | Нет   | —   |
| Срок получения вируссодержащего материала | 3–7 дней после заражения  | 5–7 дней  |
| Вид вируссодержащего материала            | Носовой и конъюнктивальный секреты, слизь из гениталий, дефибринированная кровь                       | —   |
| Модель для выделения вируса               | —   | Первичные: ПЭК, ТБ, их субкультуры<br>Перевиваемые: MDBK, ПТ-80, TR, ППЭК                 |

\*Лабораторные животные и куриные эмбрионы к вирусу нечувствительны.

| Условия хранения вируса | Частота пассажей | Объект культивирования         |
|-------------------------|------------------|--------------------------------|
| 4 °C                    | Ежемесячно       | Культивирование клеток ТБ, ПЭК |
| Минус 30 °C             | 1 раз в 2–3 мес  | Культивирование клеток ТБ, ПЭК |
| Минус 30 °C             | 1 раз в 2–3 года | Телята                         |

### III Б. Экспериментальное воспроизведение парагриппа крупного рогатого скота. Выделение и поддержание вируса

Для воспроизведения заболевания рекомендуется вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота, штамм «Белорусский» эпизоотический.

| Условия работы с вирусом                  | Экспериментальное воспроизведение болезни                                  | Лабораторное культивирование на культуре клеток*        |
|---|--|---|
| Чувствительный объект                     | Крупный рогатый скот   | ПЭК 4–5 дней  |
| Возраст                                   | 1–6 мес  | —   |
| Метод заражения                           | Интратрахеально  | —   |
| Заражающая доза                           | 10 <sup>6.0</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл                                    | 0,02 ТЦД <sub>50</sub> /кл                              |
| Инкубационный период                      | 36–48 ч  | 48–60 ч   |
| Признаки заболевания:                     |  |   |
| клинические                               | Повышение температуры, ринит, хрипы, кашель                                | ЦПД-синцитий, зернистость цитоплазмы, РГАд              |
| патологоанатомические                     | Уплотнения серо-красные в верхушечных долях легких, участки некроза легких | —   |
| Продолжительность болезни                 | —  | —   |
| Летальный исход                           | Нет  | —   |
| Срок получения вируссодержащего материала | 2–6-й день   | 48–60 ч   |
| Вид вируссодержащего материала            | Носовой секрет   | Культуральная жидкость после замораживания и оттаивания |
| Модель для выделения вируса               | —  | ПЭК   |

\*Лабораторные животные и куриные эмбрионы к вирусу нечувствительны.

| Условия хранения вируса | Частота пассажей | Объект культивирования     |
|-------------------------|------------------|----------------------------|
| Минус 20 °C             | 1 раз в 3–6 мес  | Культивирование клеток ПЭК |
| Минус 70 °C             | 1 раз в 6–12 мес | Культивирование клеток ПЭК |
| Минус 70 °C             | 1 раз в 2–3 года | Телята                     |

### III В. Экспериментальное воспроизведение аденовирусной инфекции крупного рогатого скота. Выделение и поддержание вируса

Для воспроизведения заболевания рекомендуется аденовирус крупного рогатого скота, штамм «Bovine-10» эталонный.

| Условия работы с вирусом                  | Экспериментальное воспроизведение болезни  | Лабораторное культивирование на культуре клеток*            |
|---|--|---|
| Чувствительный объект                     | Крупный рогатый скот   | Первичные: ТБ, ПЭК  |
| Возраст                                   | 1–2 мес  | —   |
| Метод заражения                           | ИнTRANАЗАЛЬНО<br>ИнTRАТРАХЕАЛЬНО   | —   |
| Заражающая доза                           | 2 · 10 <sup>6</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл  | —   |
| Инкубационный период                      | 5–6 дней   | 5–10 дней   |
| Признаки заболевания:                     |  |   |
| клинические                               | Ринит, конъюнктивит  | Округление клеток, вначале очагами, позже всего монослоя    |
| патологоанатомические                     | Гиперемия слизистой оболочки носа, глаз, очаговое уплотнение легких, увеличение лимфоузлов | —   |
| Продолжительность болезни                 | 7–10 дней  | —   |
| Летальный исход                           | Редко  | —   |
| Срок получения вируссодержащего материала | С 4-го по 10-й день после заражения  | 8–10 дней   |
| Вид вируссодержащего материала            | Смывы со слизистых оболочек носа, глаз, фекалии, кровь                                     | Культуральная жидкость после замораживания и оттаивания, ТБ |
| Модель для выделения вируса               | —  | ПЭК   |

\*Лабораторные животные и куриные эмбрионы к вирусу нечувствительны.

| Условия хранения вируса | Частота пассажей | Объект культивирования         |
|-------------------------|------------------|--------------------------------|
| Минус 20 °C             | 1 раз в 6 мес    | Культивирование клеток ТБ, ПЭК |
| Минус 70 °C             | 1 раз в год      | Культивирование клеток ТБ, ПЭК |
| Минус 70 °C             | 1 раз в 2–3 года | Телята                         |

## ВИРУСНЫЕ РЕСПИРАТОРНЫЕ БОЛЕЗНИ ПТИЦ

К этой группе болезней относятся ньюкаслская болезнь (НБ), грипп птиц (ГП), инфекционный ларинготрахеит птиц (ИЛТ), инфекционный бронхит кур (ИБК), оспа кур (ОК).

**Лекционный курс:** эпизоотология, этиология, патогенез, клинические признаки болезни, патологоанатомические изменения, диагностика, специфическая профилактика, меры борьбы с вирусными респираторными болезнями птиц.

**Лабораторно-практические занятия по теме «Дифференциальная диагностика вирусных респираторных болезней птиц»**

**I. План проведения лабораторно-практических занятий (12 ч в течение 3 нед с интервалом между занятиями в одну неделю).**

**Занятие № 1. Эпизоотологические и клинико-патологоанатомические данные вирусных респираторных болезней птиц.** Взятие патологического материала для лабораторных исследований. Обнаружение вируса в патологическом материале вирусоскопией и биопробой.

**1-й час:** 1) опрос студентов (наиболее распространенные вирусные респираторные болезни птиц, эпизоотологические и клинико-патологоанатомические признаки этих болезней, принцип диагностики вирусных болезней); 2) демонстрация птицы, экспериментально зараженной одним из возбудителей этих инфекций.

**2-й час:** 1) взятие материала для лабораторных исследований (взятие крови, вскрытие, анализ патологоанатомических изменений, взятие патматериала — мозга, селезенки, легких, трахеи, слизистой оболочки горлани, везикулярной жидкости); 2) упаковка материала для транспортировки; 3) составление сопроводительного письма.

**3-й час:** 1) получение сыворотки крови; 2) приготовление вируссодержащей суспензии; 3) приготовление препаратов (для окраски по методу Морозова); 4) окраска препаратов по методу Морозова; 5) микроскопирование препаратов и зарисовка элементарных телец вируса оспы.

**4-й час:** постановка биопробы на цыплятах (ИЛТ — заражение интраптрахеально 10—25-дневных цыплят, ОК — в перьевые фолликулы 2-месячных цыплят); на куриных эмбрионах (заражение в аллантоисную полость 8—9-дневных эмбрионов, заражение на ХАО 9—11-дневных эмбрионов).

**Примечание.** В последующие дни отдельные студенты (по представителю от группы или подгруппы) контролируют состояние объектов биопробы и регистрируют результаты в журнале.

**Занятие № 2. Обнаружение и идентификация вируса.**

**1-й час:** 1) вскрытие куриных эмбрионов; 2) анализ патологических изменений, получение вируссодержащего материала (аллантоисная жидкость, ХАО); 3) постановка капельной РГА аллантоисной жидкости с эритроцитами кур.

**2—4-й часы:** идентификация выделенного вируса.

В случае выделения гемагглютинирующего вируса ставят РТГА со специфическими сыворотками к вирусам ньюкаслской болезни и гриппа птиц (сыворотки из диагностического набора).

В случае предположения [по гибели и характерным изменениям зародыша (карликовость, мумификация)] размножения в куриных эмбрионах вируса инфекционного бронхита кур ставят РДП по общепринятой методике (антитела — суспензия ХАО, полученная через 48 ч после заражения, и сыворотка, специфическая к вирусу из диагностического набора).

**Примечание.** Представители группы или подгруппы учитывают результаты РДП через 24, 48, 72 ч.

В случае обнаружения очагов некроза на ХАО приготовить:

а) мазки-отпечатки с пораженной хорионаллантоисной оболочки для обнаружения вирионов вируса оспы кур (окраской препаратов по методу Морозова). Студенты окрашивают препараты и изучают их под микроскопом;

б) суспензию ХАО для обнаружения антигена вируса инфекционного ларинготрахеита в РДП с использованием специфической сыворотки, полученной сотрудниками кафедры.

**Занятие № 3. Ретроспективная серологическая дифференциальная диагностика вирусных респираторных болезней птиц.**

**1-й час:** взятие крови от переболевшей птицы. Получение сыворотки.

**2—3-часы:** обнаружение и титрование антител в парных сыворотках, полученных на занятиях № 1 и 3 от больных и переболевших кур.

Антитела и серологическую реакцию для этого избирают соответственно виду вируса, обнаруженного и идентифицированного на предыдущих занятиях, а именно:

а) ретроспективную диагностику оспы кур не проводят;

б) антитела к вирусам инфекционного ларинготрахеита птиц и инфекционного бронхита кур обнаруживают в РДП, воспроизведенной по общепринятой методике. Наилучшие результаты при диагностике названных инфекций дают парные сыворотки, полученные на 14-й и 28-й день болезни. Учитывая такую особенность, и для проведения занятий по данному разделу в наиболее короткий период времени рекомендуется вместо парных сывороток экспериментально зараженных цыплят использовать сыворотки пе-

реболевшей на птицефабрике птицы или гипериммунную сыворотку. Для серологической диагностики инфекционного бронхита кур, кроме того, можно использовать специфическую сыворотку из диагностического набора;

в) антитела к вирусу ньюкаслской болезни или вирусу гриппа птиц обнаруживают и титруют в РТГА. Испытуемые сыворотки предварительно освобождают от неспецифических ингибиторов обработкой углекислым газом.

4-й час: 1) комплексный анализ результатов исследований по обнаружению в патматериале, выделению и идентификации вируса, а также данных ретроспективной серологической диагностики; 2) составление плана мероприятий по профилактике и ликвидации установленного заболевания; 3) выставление зачета по пройденной теме с учетом результативности лабораторных исследований и теоретических знаний студентов.

Примечание. Если на занятии № 3 по данной теме была поставлена РДП, то представители группы (подгруппы) проводят учет ее результатов через 48 ч и работа, планируемая на 4-й час занятия № 3, должна быть проведена на следующем занятии.

## II. Материальное обеспечение занятий по теме «Дифференциальная диагностика вирусных респираторных болезней птиц»

Занятие № 1. А. Для его проведения необходимы биологические модели: а) цыплята, экспериментально зараженные одним из вирусов — ГП, БН, ИЛТ, ИБК, осьпа; б) цыплята здоровые неиммунные 20—25-дневные для биопробы на ИБК и 45—60-дневные для биопробы на ИЛТ и осупу; в) куриные эмбрионы 9—11-дневные.

Б. Для экспериментального воспроизведения болезней необходимы: вирус ньюкаслской болезни, штамм Н; вирус гриппа птиц, серотипов 3 или 6, вирус инфекционного ларинготрахеита птиц, штамм 24А; вирус инфекционного бронхита кур, штамм АМ; вирус осулы голубей, штамм Нью-Джерси.

В. Необходимы также стерильные инструменты (ножницы, ножницы глазные, скальпель, пинцет хирургический 14 см, шприцы на 2 и 1 мл, иглы инъекционные 0,6 × 25, пробойники); стерилизаторы (по числу подгрупп); приборы (холодильники на 4 °С и минус 10 — минус 25 °С, термостат 37 °С, центрифуга, овоскопы); посуда стерильная (флаконы из-под антибиотиков под резиновой пробкой, пробирки бактериологические под резиновой пробкой, ступки фарфоровые, пипетки градуированные на 2 и 5 мл); среды и растворы — питательные среды (МПА, МПБ), изотонический раствор хлорида натрия (стерильный), 2%-ный спиртовой раствор йода; антибиотики (пенициллин, стрептомицин); термос со льдом; вата и стерильные ватики (кусочки ваты в пергаментной упаковке); сосуд с дезинфицирующим раствором, например с 3%-ным раствором натрия гидроксида (едкого натра) (для отработанных пипеток); стекла предметные; штативы для пробирок и куриных эмбрионов; кюветы эмалированные 24 × 36 см; салфетка марлевая 4-слойная (при работе с куриными эмбрионами смачивают дезраствором, кладут в кювету); парафиновые палочки; лейкопластыри; графитные карандаши; марлевые маски; лезвия безопасной бритвы; набор реактивов для окраски по методу Морозова; микроскопы с осветителями; иммерсионное масло; бензин и марлевые салфетки (для очистки линз микроскопа); стекло измельченное стерильное.

Занятие № 2. А. Для вскрытия куриных эмбрионов, получения вируссодержащего материала и постановки РГА необходимы: куриные эмбрионы, зараженные патматериалом (от занятия № 1); кюветы эмалированные; салфетки марлевые,

смоченные дезраствором; штативы для пробирок и куриных эмбрионов; 2%-ный спиртовой раствор йода; инструменты стерильные (ножницы глазные, пинцеты анатомические, пинцеты глазные); пробирки бактериологические стерильные; горелки; груши резиновые; 5%-ная взвесь эритроцитов кур; керамические пластины белые (или стекла) для капельной РГА; чашки Петри; пипетки на 1, 2 и 5 мл стерильные; физиологический раствор; бумага черная 10 × 10 см; ступка фарфоровая; стекло измельченное; стакан с дезраствором.

Б. Для идентификации вирусов гриппа и ньюкаслской болезни в РТГА необходимы: сыворотки, специфические к вирусу гриппа птиц (серотипов 1 и 6) и вирусу ньюкаслской болезни из диагностического набора; вируссодержащая экстрактэмбриональная жидкость от зараженных на занятии № 1 куриных эмбрионов; 1%-ная взвесь эритроцитов кур; физиологический раствор; прибор Такачи или пипетки на 1 мл и плексигласовые доски с лунками; стакан с дезраствором; груши резиновые.

В. Для идентификации вирусов инфекционного ларинготрахеита птиц и инфекционного бронхита кур в РДП необходимы: сыворотка, специфическая к вирусу ИБК из диагностического набора; антиген, специфический к вирусу ИБК, и антиген нормальный из этого же набора; антиген испытуемый — суспензия ХАО куриных эмбрионов, зараженных на занятии № 1; антиген, специфический к вирусу ИЛТ, — суспензия ХАО куриных эмбрионов, зараженных вирусом ИЛТ, вакциным штаммом ВНИИБП или ЦНИИПП, клон НТ; сыворотка, специфическая к вирусу ИЛТ, полученная от аэрозольно вакцинированных на птицефабрике кур или гипериммунизацией петухов (материал для гипериммунизации — суспензия 1 : 10 ХАО куриных эмбрионов, зараженных вирусом ИЛТ вакцинного штамма ВНИИБП или ЦНИИПП, клон НТ).

Схема гипериммунизации взрослых петухов внутривенно вируссодержащим материалом в объеме 1—2 мл: а) 4 инъекции с промежутками в один день; б) перерыв 7 дней; в) 4 инъекции с промежутками в один день; г) перерыв 6 дней; д) пробное взятие крови. В случае низких титров антител в сыворотках петухов повторное; е) 3 инъекции с промежутками в один день; ж) обескровливание через 6 дней, 1,5%-ный агар на вероналовом буфере рН 7,2 во флаконах, бани водяные для флаконов с агарам, стекла предметные обезжиренные, кюветы эмалированные с фильтровальной бумагой (влажные камеры для стекол с агарам), пакеты полиэтиленовые для герметической упаковки кювет, пипетки градуированные на 2—5 мл, пастеровские пипетки, трубочки металлические диаметром 0,5 см (можно гильзы патронов малокалиберной винтовки) для вырезания лунок в слое агара, перья ученические (для извлечения агаровых пробок из лунок).

Занятие № 3. А. Для взятия крови от цыплят и получения сыворотки необходимы иглы инъекционные, пробирки Флоринского, спица для отделения сгустка крови от стекла, пастеровские пипетки, центрифуга.

Б. Для обнаружения и определения титра антител парных сывороток в РДП к вирусам ИЛТ и ИБК необходимы: парные сыворотки (испытуемые), полученные от больных и переболевших экспериментально зараженных кур или кур птицефабрики; антиген, специфический к вирусу ИБК, из диагностического набора; антиген нормальный из того же набора; сыворотка, специфическая к вирусу ИБК из того же набора; антиген, специфический к вирусу ИЛТ (суспензия ХАО куриных эмбрионов, зараженных вирусом ИЛТ штамма ВНИИБП или ЦНИИПП, клон НТ); сыворотка, специфическая к вирусу ИЛТ (методика получения описана в первичном материальном обеспечении занятия № 2 п. В.

В. Для обнаружения и определения титра антител парных сывороток в РТГА к вирусам ньюкаслской болезни и гриппа кур необходимы: сыворотки парные (испытуемые), полученные от больных и переболевших экспериментально зараженных кур или кур птицефабрики; антиген специфический вируса ньюкаслской болезни из диагностического набора; антиген специфический вируса гриппа серотипов 1 и 6; 1%-ная взвесь эритроцитов кур; физиологический раствор; прибор Такачи или пипетки на 1 мл и плексигласовые доски с лунками; стакан с дезраствором; груши резиновые.

### III. А. Экспериментальное воспроизведение ньюкаслской болезни.

#### Выделение и поддержание вируса.

Для воспроизведения заболевания рекомендуется вирус ньюкаслской болезни, штамм Н вакциненный слабопатогенный.

| Условия работы с вирусом                 | Экспериментальное воспроизведение болезни   | Лабораторное культивирование*                                     |                               |
|--|---|---|-------------------------------|
|  |   | куриные эмбрионы  | культура клеток               |
| Чувствительный объект                    | Цыплята неиммунизированные  | КЭ  | Фибробласты КЭ, ВНК-21, Нер-2 |
| Возраст                                  | 20 дней   | 9–11 дней   | —                             |
| Метод заражения                          | Внутримышечно   | Аллантоисная полость  | —                             |
| Заражающая доза                          | —   | $10^4$ ЭД <sub>50</sub>   | —                             |
| Инкубационный период                     | 3–4 дня   | 48–72 ч   | 24–60 ч                       |
| Признаки заболевания                     |   |   |                               |
| клинические                              | Угнетение, истечение из носа, парезы, параличи  | —   | —                             |
| патологоанатомические                    | Катарально-геморрагическое воспаление слизистой оболочки пищеварительного тракта. Кровоизлияния при переходе железистого желудка в мышечный | Гибель, гиперемия кожи, окципитальные гематомы, РГА положительная | ЦПД (детрит, симпласт), РГАд  |
| Продолжительность болезни                | До 6 дней   | —   | —                             |
| Летальный исход                          | 15–30 %   | 100 %   | —                             |
| Срок получения вирусодержащего материала | В агональном состоянии  | 48–72 ч   | 48 ч                          |
| Вид вирусодержащего материала            | Мозг, селезенка, легкие   | Аллантоисная, амниотическая жидкости                              | Культуральная жидкость        |
| Модель для выделения вируса              | —   | КЭ  | —                             |

\*Лабораторные животные нечувствительны.

| Условия хранения вируса | Частота пассажей      | Объект культивирования |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| 4 °C                    | 1 раз в 6 мес         | Куриные эмбрионы       |
| Минус 25 °C             | 1 раз в год (нативн.) | Куриные эмбрионы       |

### III. Б. Экспериментальное воспроизведение гриппа птиц. Выделение и поддержание вируса.

Для воспроизведения заболевания рекомендуется вирус гриппа птиц, серотип 6—цыпленок/СССР/315/70, производственно-эпизоотический.

| Условия работы с вирусом                 | Экспериментальное воспроизведение болезни  | Лабораторное культивирование на куриных эмбрионах* |
|--|--|--|
| Чувствительный объект                    | Цыплята  | КЭ   |
| Возраст                                  | 20 дней  | 9–10 дней  |
| Метод заражения                          | Интраназально + интракардиально. Охладить птицу повторно 8–10 раз через 1–2 ч    | В аллантоисную или амниотическую полость           |
| Заражающая доза                          | $2 \cdot 10^6$ ЭИД <sub>50</sub> /мл   | —  |
| Инкубационный период                     | 48–72 ч  | 48–60 ч  |
| Признаки заболевания                     |  |  |
| клинические                              | Чаще бессимптомно, истечения из носа, парезы, параличи                           | Гибель   |
| патологоанатомические                    | Катарально-геморрагическое воспаление слизистой оболочки пищеварительного тракта | РГА положительная                                  |
| Продолжительность болезни                | До 10 дней   | 48–60 ч  |
| Летальный исход                          | 0,2–100 %  | 100 %  |
| Срок получения вирусодержащего материала | В первые 2–3 сут после заражения   | 72 ч   |
| Вид вирусодержащего материала            | Селезенка, головной мозг   | Аллантоисная жидкость                              |
| Модель для выделения вируса              | —  | КЭ   |

\*Лабораторные животные и культура клеток нечувствительны.

| Условия хранения вируса | Частота пассажей         | Объект культивирования |
|-------------------------|--------------------------|------------------------|
| 4 °C                    | 1 раз в 6 мес            | Куриные эмбрионы       |
| Минус 25 °C             | 1 раз в год (нативн.)    | Куриные эмбрионы       |
| Минус 25 °C             | 1 раз в 2 года (лиофил.) | Куриные эмбрионы       |

### III В. Экспериментальное воспроизведение инфекционного бронхита кур. Выделение и поддержание вируса

Для воспроизведения заболевания рекомендуется вирус инфекционного бронхита кур, серотип Массачусетс, штамм MBA-6.

| Условия работы с вирусом                  | Экспериментальное воспроизведение болезни | Лабораторное культивирование*                   |  |
|---|---|---|--|
|   |   | куриные эмбрионы                                | культура клеток                          |
| Чувствительный объект                     | Цыплята                                   | КЭ  | Культура клеток почки КЭ, фибробласты КЭ |
| Возраст                                   | До 1 мес                                  | 8–10 дней                                       | —  |
| Метод заражения                           | Интратрахеально                           | В аллантоисную полость                          | —  |
| Заражающая доза                           | $10^3$ ИД <sub>50</sub>                   | $10-10^2$ ЭИД <sub>50</sub>                     | —  |
| Инкубационный период                      | 1–3 дня                                   | 24–72 ч   | 24–72 ч                                  |
| Признаки заболевания:                     |   |   |  |
| клинические                               | Хрипы, кашель, чихание                    | —   | —  |
| патологоанатомические                     | Ринит, трахеит, бронхит, пневмония        | Карликовость, мумификация зародыша к 7–8-му дню | ЦПД — синцитий                           |
| Продолжительность болезни                 | 5–10 дней                                 | —   | —  |
| Летальный исход                           | До 10 %                                   | Гибель до 50 % на 3–5 день                      | —  |
| Срок получения вируссодержащего материала | При ярких клинических признаках           | 72 ч  | 72 ч                                     |
| Вид вируссодержащего материала            | Легкие, трахея                            | Аллантоисная жидкость                           | —  |
| Модель для выделения вируса               | —   | КЭ 3 пассаж                                     | —  |

\*Лабораторные животные нечувствительны.

|                         |                          |                             |
|-------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Условия хранения вируса | Частота пассажей         | Объект культивирования      |
| 4 °C                    | 1 раз в 6 мес            | Куриные эмбрионы            |
| Минус 25 °C             | 1 раз в год (нативн.)    | Куриные эмбрионы 10 пассажа |
| Минус 25 °C             | 1 раз в 2 года (лиофил.) | Цыплята 11-го пассажа       |

### III Г. Экспериментальное воспроизведение инфекционного ларинготрахеита птиц. Выделение и поддержание вируса

Для воспроизведения заболевания рекомендуется вирус инфекционного ларинготрахеита птиц, штамм 24А патогенный.

| Условия работы с вирусом                  | Экспериментальное воспроизведение болезни | Лабораторное культивирование*  |   |
|---|---|--------------------------------|---|
|   |   | куриные эмбрионы               | культура клеток                         |
| Чувствительный объект                     | Цыплята                                   | КЭ                             | Культура клеток почек и фибробластов КЭ |
| Возраст                                   | 20 дней и старше                          | 9–12 дней                      | —                                       |
| Метод заражения                           | Интратрахеально                           | На ХАО, в аллантоисную полость | —                                       |
| Заражающая доза                           | —   | —                              | —                                       |
| Инкубационный период                      | 6–12 дней                                 | 4–5 дней                       | 12–24 ч                                 |
| Признаки заболевания:                     |   |                                |   |
| клинические                               | Угнетение, кашель, хрипы, удушье          | —                              | ППД                                     |
| патологоанатомические                     | Фибринозно-геморрагический ларинготрахеит | Узелки на ХАО                  | ЦПД — гигантские клетки, детрит         |
| Продолжительность болезни                 | 10–15 дней                                | —                              | —                                       |
| Летальный исход                           | 25–50 %                                   | —                              | —                                       |
| Срок получения вируссодержащего материала | 1–7-й день                                | 5 дней                         | 12–24 ч                                 |
| Вид вируссодержащего материала            | Соскобы с трахеи                          | ХАО                            | Культуральная жидкость                  |
| Модель для выделения вируса               | —   | КЭ                             | —                                       |

\*Лабораторные животные нечувствительны.

|                         |                       |                        |
|-------------------------|-----------------------|------------------------|
| Условия хранения вируса | Частота пассажей      | Объект культивирования |
| Минус 25 °C             | 1 раз в год (нативн.) | Куриные эмбрионы       |

### III Д. Экспериментальное воспроизведение оспы кур. Выделение и поддержание вируса

Для воспроизведения заболевания рекомендуется вирус оспы голубей, штамм Нью-Джерси вакцинированный.

| Условия работы с вирусом                  | Экспериментальное воспроизведение болезни | Лабораторное культивирование*                |   |
|---|---|--|---|
|   |   | куриные эмбрионы                             | культура клеток                                   |
| Чувствительный объект                     | Куры                                      | КЭ   | Клетки куриных эмбрионов                          |
| Возраст                                   | 2–4 мес                                   | 10–12 дней                                   | —   |
| Метод заражения                           | В первьевые фолликулы                     | На ХАО                                       | —   |
| Заражающая доза                           | —   | 10–10 <sup>4</sup> ЭИД <sub>50</sub>         | —   |
| Инкубационный период                      | 4–5 дней                                  | 3–4 дня                                      | 2–3 дня   |
| Признаки заболевания:                     |   |  |   |
| клинические                               | Фолликулит                                | —  | —   |
| патологоанатомические                     | —   | Беловатые специфические очаги некроза на ХАО | ЦПД — округление, вакуолизация, гигантские клетки |
| Продолжительность болезни                 | 10–12 дней                                | —  | —   |
| Летальный исход                           | Нет                                       | Может быть                                   | —   |
| Срок получения вируссодержащего материала | 5–6-й день                                | 5-й день                                     | 3-й день  |
| Вид вируссодержащего материала            | Везикулярная жидкость                     | ХАО  | Культуральная жидкость                            |
| Модель для выделения вируса               | Цыпленка 3–4 мес неиммунизированные       | КЭ   | —   |

\*Лабораторные животные нечувствительны.

|                         |                           |                        |
|-------------------------|---------------------------|------------------------|
| Условия хранения вируса | Частота пассажей          | Объект культивирования |
| Минус 25 °C             | 1 раз в год (нативн.)     | Куриные эмбрионы       |
| Минус 25 °C             | 1 раз в 4–5 лет (лиофил.) | Куриные эмбрионы       |

### БОЛЕЗНЬ АУЕСКИ

**Лекционный курс:** эпизоотология, этиология, патогенез, клинические признаки болезни у сельскохозяйственных животных различных видов, патологоанатомические изменения, диагностика, специфическая профилактика, меры борьбы.

**Лабораторно-практическое занятие по теме «Диагностика болезни Ауески»**

#### I. План проведения лабораторно-практического занятия (2 ч)

**1-й час:** 1) опрос по теме занятия: эпизоотологические, клинические и патологоанатомические признаки болезни Ауески у животных разных видов; 2) объяснение преподавателя — особенности болезни Ауески у поросят, получение вируссодержащего материала от павшего ягненка, этапы лабораторной диагностики болезни Ауески.

**2-й час:** 1) демонстрация больного (экспериментально зараженного) ягненка; 2) демонстрация больного кролика (биопроба); 3) составление плана мероприятий по ликвидации и профилактике болезни Ауески.

#### II. Материальное обеспечение занятия по теме «Диагностика болезни Ауески»

Ягненок в возрасте 6 мес или неиммунная овца любого возраста, экспериментально зараженные вирусом болезни Ауески, штамм «Арский» (в виварии); кролик (массой 2 кг), экспериментально зараженный вирусом болезни Ауески, штамм «Арский» (в виварии).

**III. Экспериментальное воспроизведение болезни Ауески. Выделение и поддержание вируса.**

Для воспроизведения заболевания рекомендуется вирус болезни Ауески, штамм «Арский» вирулентный.

### ОСПА ОВЕЦ

**Лекционный курс:** эпизоотология, этиология, патогенез, клинические признаки, патологоанатомические изменения, диагностика, специфическая профилактика, меры борьбы.

**Лабораторно-практическое занятие по теме «Диагностика оспы овец»**

#### I. План проведения лабораторно-практического занятия (4 ч)

**1-й час:** 1) опрос студентов — эпизоотологические и клинические признаки оспы овец, патологический материал для лабораторных исследований; 2) объяснение преподавателя — техника получения патологического материала от больной овцы для лабораторной диагностики, этапы лабораторной диагностики оспы овец.

**2-й час:** 1) демонстрации больной овцы, экспериментально зараженной штаммом «Казахстанский» вируса оспы овец; 2) получение патологического материала (везикулярной жидкости) для лабораторной диагностики; 3) изготовление мазков из везикулярной жидкости для обнаружения вирионов вируса оспы овец; 4) уп-

| Условия работы с вирусом                 | Экспериментальное воспроизведение болезни                                 | Лабораторное культивирование  |   |  |  |
|--|---|---|---|--|--|
|  |   | лабораторные животные   | Куриные эмбрионы  | Культура клеток  |  |
| Чувствительный объект                    | Овцы неиммунные   | Кролик  | Куриные эмбрионы  | Первичные фибробласты куриних эмбрионов, почек и щитовидной железы |  |
| Возраст                                  | До 6 мес  | 2 кг  | 9 дней  | —  |  |
| Метод заражения                          | Подкожно, внутримышечно 10 <sup>2</sup> –10 <sup>3</sup> ЛД <sub>50</sub> | Подкожно, внутримышечно 1 мл 10%-ной суспензии эритроцитов 3–7 дней | 4–5 дней<br>В аллантоисную полость, на ХАО                                | ТБ, ПЭК  |  |
| Заряжающая доза                          | —   | —   | —   | —  |  |
| Инкубационный период                     | 1–3 дня   | 3–4 дня   | 48–72 ч   | —  |  |
| Признаки заболевания:                    | Зуд, расчесы, угнетение, поднимаются с трудом                             | Беспокойство, зуд, расчесы  | —   | —  |  |
| Патологоанатомические                    | —   | —   | Очики некроза на ХАО, кровоизлияния на коже головы, соусды ХАО инъикованы | ЦПД-симпласты, на КФ — окружение, зернистость цитоплазмы           |  |
| Продолжительность болезни                | 2–4 дня   | 2–24 ч  | 5 дней  | —  |  |
| Летальный исход                          | 100 %   | 100 %   | До 50 %   | —  |  |
| Срок получения вирусодержащего материала | В агональный период   | Посмертно   | 5 дней  | 48 ч   |  |
| Вид вирусодержащего материала            | Легкие, мозжечок, продолговатый мозг                                      | Легкие, печень, головной мозг                                       | ХАО, аллантоисная жидкость  | Субкультура первого пассажа  |  |
| Модель для выделения вируса              | —   | Кролик  | —   | —  |  |
| Условия хранения                         | a) 4 °C;<br>б) минус 10 °C  | —   | —   | —  |  |
| Частота поддерживающих пассажей          | а) 1 раз в 6 мес;<br>б) 1 раз в 1–2 года                                  | —   | —   | —  |  |

ковка материала для транспортировки; 5) демонстрация на здоровой овце метода заражения при биопробе.

3-й час: 1) составление сопроводительного письма; 2) окраска мазков из везикулярной жидкости больной овцы методом Морозова; 3) вирусоскопия, зарисовка элементарных телец.

4-й час: составление плана мероприятий по профилактике и ликвидации оспы овец.

## II. Материальное обеспечение занятий по теме «Диагностика оспы овец»

Овца, зараженная штаммом «Казахстанский» вируса оспы овец; овца незараженная, термос со льдом, флаконы (из-под антибиотиков, стерильные), стерилизатор со стерильными инструментами (пинцет анатомический, пинцет глазной, шприцы на 1 мл, иглы инъекционные, лезвие безопасной бритвы), спирт, вата, физиологический раствор (стерильный); ватики стерильные.

Для окраски препаратов по методу Морозова: стекла предметные обезжиренные, пинцеты анатомические, горелки, кюветы эмалированные, мостики (из стеклянных палочек для предметных стекол), микроскопы с осветителями, вода дистиллированная, наборы реактивов (жидкость Руге, раствор танина, раствор аммиачного серебра, масло иммерсионное, бензин), глазные пипетки для каждого из реактивов; бумага фильтровальная.

## III. Экспериментальное воспроизведение оспы овец. Выделение и поддержание вируса

Для воспроизведения заболевания рекомендуется вирус оспы овец, штамм «Казахстанский» производственный.

| Условия работы с вирусом  | Экспериментальное воспроизведение болезни                | Лабораторное культивирование на естественно-восприимчивых животных* |
|---------------------------|--|---|
| Чувствительный объект     | Овцы неиммунные  | Овцы  |
| Возраст                   | Любой  | —   |
| Метод заражения           | Внутрикожно в губу, в подхвостовую складку               | По методу Борреля   |
| Заражающая доза           | По 0,1–0,15 мл в несколько точек                         | —   |
| Инкубационный период      | 2–3 дня  | 2–3 дня   |
| Признаки заболевания:     |  |   |
| клинические               | Повышение температуры, местный ослепленный процесс, отек | —   |
| патологоанатомические     | —  | —   |
| Продолжительность болезни | 14–20 дней   | —   |
| Летальный исход           | Нет  | —   |

*Продолжение*

| Условия работы с вирусом                              | Экспериментальное воспроизведение болезни | Лабораторное культивирование на естественно-восприимчивых животных* |
|---|---|---|
| Срок получения вирусодержащего материала              | На стадии везикулы                        | —   |
| Вид вирусодержащего материала                         | Везикулярная жидкость                     | —   |
| Модель для выделения вируса                           | —   | —   |
| * Куриные эмбрионы и культура клеток нечувствительны. |   |   |
| Условия хранения вируса                               | Минус 20 °С<br>(лиофилизированный вирус)  | —   |
| Частота поддерживающих пассажей                       | 1 раз в 2 года                            | —   |

## БОЛЕЗНЬ МАРЕКА

**Лекционный курс:** эпизоотология, этиология, клинические признаки болезни, патологоанатомические изменения, диагностика, специфическая профилактика, меры борьбы.

### Лабораторно-практические занятия по теме «Диагностика болезни Марека».

#### I. План проведения лабораторно-практического занятия (4 ч)

**1-й час:** 1) опрос по теме занятия; 2) демонстрация характерных для болезни Марека патологоанатомических изменений (вскрытые трупы заблаговременно привезены с птицефабрики и сохраняются при низкой температуре); 3) получение материала для лабораторных исследований: для обнаружения антигена вируса болезни Марека с помощью РДП выщипывают перья из крыльев, хвоста с обязательным сохранением ткани фолликулов, для серологических исследований от больной птицы получают (на птицефабрике) сыворотки из проб крови не менее 1—1,5 мл; сыворотки должны быть взяты в стерильные пробирки и консервированы (мертиолатом — 0,01 % к объему сыворотки или антибиотиками — по 100 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 мл сыворотки), для гистологических исследований берут пробы органов с выраженным опухолевыми поражениями (печень, почки, железистый желудок, яичники, сердце, легкие и нервы Plexus brachialis, Truncus ischiadicus). Пробы размером 1 × 2 × 2 см фиксируют в 10%-ном растворе формальдегида; 4) упаковка материала для транспортировки в лабораторию; 5) составление сопроводительного письма.

**2-й час:** 1) обнаружение антигена вируса болезни Марека в экстрактах перьевых фолликулов — приготовление антигена из суспензии очинов перьев для исследования в РДП, постановка РДП на предметных стеклах или в чашках Петри. В центральную лунку вносят специфическую сыворотку, а в периферические — испытуемые экстракты; 2) обнаружение антител к вирусу болезни Марека в испытуемых сыворотках. Ставят РДП, внося в центральную лунку специфический антиген, а в периферические — испытуемые сыворотки. Чашки Петри или стекла во влажной камере оставляют на 24 ч в термостате при 37 °С, затем переносят в условия комнатной температуры. Учет реакции проводят через 24—48 ч (представители групп, подгрупп\*); 3) для дифференциальной диагностики болезни Марека и лейкоза птиц испытуемые сыворотки исследуют на наличие группоспецифического антигена вирусов лейкоз-саркомной группы с помощью препарата для диагностики лейкоза птиц в реакции непрямой гемагглютинации на предметном стекле. Сыворотки следует испытывать от кур 5-месячного возраста и старше (см. Наставление по диагностике лейкоза птиц).

**3-й час:** составление плана мероприятий по профилактике и ликвидации болезни Марека.

**4-й час:** учет результатов исследований, проведенных на предыдущем занятии.

#### II. Материальное обеспечение занятий по теме «Диагностика болезни Марека»

Для проведения занятий необходимы: трупы кур с патологоанатомическими изменениями, характерными для болезни Марека; сыворотка специфическая (для РДП). Сыворотку получают гипериммунизацией петухов в возрасте 12—15 мес по схеме: 1-й день — вирус (кровь и паренхиматозные органы больной птицы или вакцину) вводят в сережку в объеме 0,5 мл; 7-й день — подкожно в области бедра — 0,5 мл; 14-й день — внутримышечно 1 мл. Обескровливание петухов на 45-й день. Специфический антиген вируса болезни Марека (для РДП) получают следующим методом: готовят суспензию крови и паренхиматозных органов больной птицы (лучше в возрасте 90 дней), зараженной вирусом болезни Марека, штаммом ЗК, фильтруют суспензию через ватно-марлевый фильтр, инактивируют вирус добавлением 0,2 % кристаллического фенола к объему суспензии, экстрагируют при 4 °С в течение 16—17 ч. Полученный антиген неинфекционен (А. Б. Кононенко, 1987). Срок годности его более 1 мес; испытуемые сыворотки крови кур, имевших признаки болезни Марека. Испытуемый антиген из очинов пера больных кур (для РДП) получают по следующей методике: очины пера трехкратно замораживают и оттаивают, нарезанные очины растирают в ступке с добавлением физиологического раствора (1 мл на 3—4 очина), гомогенизированные очины переносят в пробирку Флоринского и экстрагируют при 4 °С в течение 17 ч, надосадочную жидкость используют в качестве антигена в РДП. С целью сокращения учебного времени на приготовление антигена операцию по замораживанию — оттаиванию можно проводить до занятия, а также сократить время экстракции. Агаровый гель — смесь из 10 г

\*Перенося чашки Петри с РДП в холодильник (4 °С), учет можно делать на следующем занятии, т. е. через 6—7 дней.

| Условия работы с вирусом                  | Экспериментальное воспроизведение болезни | Лабораторное культивирование*  |   |
|---|---|--|---|
|   |   | куриные эмбрионы   | культура клеток   |
| Летальный исход                           |   | 0,2—80 %   | —   |
| Срок получения вируссодержащего материала |   | 2-я неделя для выделения вируса, 3—8-я неделя для обнаружения антигена | а) на 4—5-й день при заражении в желточный мешок;<br>б) 72 ч при заражении на ХАО |
| Вид вируссодержащего материала            |   | Опухоли, кровь, перья  | Очики ХАО, печень, почки  |
| Модель для выделения вируса               |   | —  | При пассажах вирус теряет патогенность для цыплят                                 |
|   |   |  | Культура клеток   |

\* Условия хранения  
 а) кровь, органы при минус 170—196 °C (в сосудах с жидким азотом); б) кожа и эпителий перьевых фолликул при минус 20 °C; в) лиофилизованный вирус при минус 20 °C

Частота поддерживающих пассажей  
 а) 2 раз в год;  
 б) 1 раз в год  
 в) 1 раз в год

#### СПИСОК ДИАГНОСТИКУМОВ, НЕОБХОДИМЫХ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

1. Набор диагностикумов инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота.
2. Набор сухих диагностикумов адено-вирусной инфекции крупного рогатого скота.
3. Набор диагностикумов парагриппа-3 крупного рогатого скота.
4. Набор диагностикумов вирусной диареи крупного рогатого скота.
5. Набор диагностикумов респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота.
6. Диагностический набор для идентификации вирусов ньюкаслской болезни и гриппа птиц.
7. Набор антигенов и сывороток для диагностики инфекционного бронхита кур.

очищенного агара, лучше Дифко, 80 г хлорида натрия и 910 мл дистиллированной воды — готовят на водяной бане, фильтруют через два слоя марли и доводят pH до 7,2—7,4 с помощью 1 M раствора натрия гидроксида (едкого натра); посуда (флаконы для проб из органов трупа, чашки Петри или предметные стекла для РДП, ступки фарфоровые, пипетки Пастера, пипетки, градуированные на 2 и 5 мл, пробирки бактериологические); стерилизатор с инструментами (ножницы 14 см 2 шт., ножницы глазные 2 шт., пинцет анатомический); полиэтиленовый пакет для сбора и хранения перьев больных кур; изотонический раствор хлорида натрия (стерильный); термос со льдом; термостат (37 °C); стекло измельченное (стерильное); влажная камера для предметных стекол со слоем агара.

### III. Экспериментальное воспроизведение болезни Марека. Выделение и поддержание вируса

Для воспроизведения заболевания рекомендуется вирус болезни Марека, штамм ЗК эпизоотический.

| Условия работы с вирусом  | Экспериментальное воспроизведение болезни             | Лабораторное культивирование*                            |                                       |
|---------------------------|---|--|---------------------------------------|
|                           |   | куриные эмбрионы   | культура клеток                       |
| Чувствительный объект     | Куры (лучше мясных пород)<br>неиммунные               | КЭ   | Фибробlastы,<br>почка КЭ,<br>цыпленка |
| Возраст                   | 1 день  | а) 4 дня;<br>б) 10—12 дней                               | 24-часовая культура                   |
| Материал для заражения    | Суспензия органов, кровь                              | а) суспензия органов + кровь;<br>б) экстракт очинов пера | Экстракт очинов пера                  |
| Метод заражения           | Внутрибрюшинно, подкожно, внутри-мышечечно            | а) в желточный мешок;<br>б) на ХАО                       | —                                     |
| Заражающая доза           | 10 <sup>3</sup> БОЕ/цыпл.                             | —  | —                                     |
| Инкубационный период      | 120—150 дней  | —  | 48—96 ч                               |
| Признаки заболевания:     |   |  |                                       |
| клинические               | Парезы, параличи, сероглазие                          | —  | —                                     |
| патологоанатомические     | Опухоли внутренних органов, периферийные нервы отечны | Бляшки на ХАО, спленомегалия, поражение печени           | ЦПД-бляшки, синцитий                  |
| Продолжительность болезни | 30—90 дней  | а) 13—14 дней;<br>б) 7—8 дней                            |                                       |

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|  |     |
|--|-----|
| <b>Общая вирусология .....</b>   | 3   |
| Тема 1. Основные свойства вирусов. Техника безопасности и правила работы с вируссодержащим материалом. <i>Р. В. Белоусова .....</i>    | 3   |
| Тема 2. Получение и обработка патологического материала. <i>Р. В. Белоусова .....</i>  | 13  |
| Тема 3. Индикация вирусов в патологическом материале путем обнаружения вирионов и телец-включений. <i>Н. И. Троценко .....</i>         | 22  |
| Тема 4. Лабораторные животные и их использование в вирусологии. <i>Э. А. Преображенская .....</i>                                      | 28  |
| Тема 5. Куриные эмбрионы и их использование в вирусологии. <i>Э. А. Преображенская .....</i>   | 46  |
| Тема 6. Культуры клеток и их использование в вирусологии. <i>Р. В. Белоусова .....</i>   | 62  |
| Тема 7. Титрование вирусов. <i>Н. И. Троценко .....</i>  | 91  |
| Тема 8. Титрование антител к вирусам в реакции торможения (задержки) гемагглютинации (РТГА, РЗГА). <i>Н. И. Троценко .....</i>         | 107 |
| Тема 9. Реакция нейтрализации и ее использование в вирусологии. <i>Н. И. Троценко .....</i>  | 112 |
| Тема 10. Реакция диффузионной пропропилитации в геле и ее использование в вирусологии. <i>Н. И. Троценко .....</i>                     | 118 |
| Тема 11. Реакция непрямой ( passивной) гемагглютинации и ее использование в вирусологии. <i>Р. В. Белоусова .....</i>                  | 124 |
| Тема 12. Реакция иммунофлуоресценции (РИФ) и ее использование в вирусологии. <i>Р. В. Белоусова .....</i>                              | 131 |
| Тема 13. Метод иммуноферментного анализа и его использование в вирусологии. <i>Р. В. Белоусова .....</i>                               | 142 |
| Тема 14. Метод ДНК-зондов и его использование в вирусологии. <i>Н. И. Троценко .....</i>   | 150 |
| Тема 15. Полимеразная цепная реакция и ее использование в вирусологии. <i>Р. В. Белоусова .....</i>                                    | 154 |
| Тема 16. Решение диагностических задач. <i>Н. И. Троценко .....</i>  | 163 |
| <br><b>Частная вирусология .....</b>   | 178 |
| Тема 1. Лабораторная диагностика бешенства. <i>Р. В. Белоусова .....</i>   | 178 |
| Тема 2. Лабораторная диагностика оспы. <i>Н. И. Троценко .....</i>   | 185 |
| Тема 3. Дифференциация вируса гриппа птиц и вируса ньюкаслской болезни в РГГА. <i>Э. А. Преображенская .....</i>                       | 190 |
| Тема 4. Определение типа вируса ящура в РСК. <i>Р. В. Белоусова .....</i>  | 196 |
| Тема 5. Лабораторная диагностика парагриппа крупного рогатого скота. <i>Э. А. Преображенская .....</i>                                 | 214 |
| Тема 6. Дифференциация пневмоэнтеритов телят с помощью диагностических наборов биофабричного производства. <i>Н. И. Троценко .....</i> | 222 |
| Приложение. Методические рекомендации к занятиям по вирусным болезням. <i>Э. А. Преображенская .....</i>                               | 226 |
| Диагностические исследования моделированных вирусных болезней животных .....   | 226 |
| Вирусные пневмоэнтериты телят .....  | 226 |
| Вирусные респираторные болезни птиц .....  | 232 |
| Болезни Аусеки .....   | 241 |
| Оспа овец .....  | 241 |
| Болезнь Марека .....   | 244 |
| Список диагностикумов, необходимых для изучения вирусных болезней животных .....   | 247 |