

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
«Брянский государственный аграрный
университет»

Бовкун Г.Ф.

ВИРУСОЛОГИЯ

*Учебно-методическое пособие
для студентов очного обучения
по специальности 36.05.01 «Ветеринария»*

Брянская область 2022

УДК 578:619(07)

ББК 28.3:48

Б 72

Бовкун, Г. Ф. Вирусология: учебно-методическое пособие для очного обучения по специальности 36.05.01 «Ветеринария» / Г. Ф. Бовкун. - Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2022. – 110 с.

Пособие содержит современные методики вирусологических, серологических исследований, методы лабораторной диагностики, биопрепараты для профилактики, средства химиотерапии ведущих вирусных заболеваний, по вирусологии на основе требований Приказа ФГОС ВО №962 от 02.10.2015 г. по направлению подготовки 36.05.01 – «Ветеринария», квалификации «Ветеринарный врач» и соответствует содержанию компетенций: ОПК-1, ОПК-4.

Рецензент: заведующий кафедрой нормальной и патологической морфологии и физиологии животных кандидат биологических наук, доцент Минченко В.Н.

Рекомендовано к изданию методической комиссией института ветеринарной медицины и биотехнологии Брянского ГАУ, протокол № 7 от 31.03. 2022 года.

© Брянский ГАУ, 2022

© Бовкун Г.Ф., 2022

ТЕМА №1

Отбор вирусосодержащего материала, транспортировка. Подготовка вирусосодержащего материала. Методы заражения и вскрытия лабораторных животных

Цель занятия. Познакомиться с методами отбора, транспортировки, подготовки вирусосодержащего материала для исследований. Познакомиться с методами заражения и вскрытия лабораторных животных.

Оборудование и материалы Среды для культивирования культур клеток и защиты вирусов, пробирки для взятия крови, пробирки с тампонами, белые мыши, шприцы, иглы.

Задание для самостоятельной работы студентов. Освоить методику заражения и вскрытия лабораторных животных.

Правила работы в лаборатории вирусологии

1. Работают в халате, колпаке, резиновых перчатках, сменной обуви.

2. Запрещено покидать помещение в халате, выполнять другие работы в лаборатории.

3. В боксе работают в стерильном халате, колпаке, маске, резиновых перчатках.

4. Поступивший материал, считают инфицированным, помещают на кювет, банки обтирают дезраствором. Работают над кюветом, используют пипетки с грушами. Всю посуду после работы погружают в дезинфицирующий раствор. Стерильную посуду открывают над факелом.

5. После работы рабочее место дезинфицируют 5%-ным хлорамином, 2-10%-ным раствором едкого натрия, 3%-ным формальдегидом или 96⁰ спиртом.

6. Хранят вирусосодержащий материал в морозильной камере холодильника, с обязательными надписями. Холодильники под замком с пломбой и печатями.

7. При работе не допускать распространения вирусов, не допускать загрязнение материала микрофлорой, обеспечивать личную безопасность.

Отбор вирусодержащего материала, транспортировка

Правильное взятие материала и транспортировка, высокое качество приготовления материала обеспечивают успех вирусологического и серологического исследований.

Для исследований берут патологический материал от погибших, вынужденно убитых животных в период четких клинических признаков, не позднее 2-3 ч после смерти или убоя.

Берут чаще всего кусочки 10-20 г печени, селезенки, легкого, лимфоузлы целиком, почку, головной мозг, не вскрывая черепа.

Если материал с признаками гниения, выделить вирус, провести его идентификацию, не возможно. Затруднено серологическое исследование.

Проводят исследования с клиническим материалом:

- смывами из носа, конъюнктивы, которые берут стерильным тампоном в стерильные пробирки с раствором Хенкса, средой 199, Игла, добавляют антибиотики (пенициллин и стрептомицин по 500 ед. на 3,5 мл, 20 ед. нистатина), а также белковый стабилизатор 0,5-1% желатина или альбумина, чтобы не произошла гибель вирусов;

- дефибрированной или лаковой кровью, когда к 1 объему крови добавляют 1 объем стерильной дистиллированной воды;

- фекалиями;

- папулами, корочками, пустулами при поражении кожи.

Для серологических исследований берут кровь дважды (т.е. исследуют парные сыворотки) с интервалом 2-3 недели в объеме 5 мл.

Взятые пробы как можно скорее следует охладить и транспортировать:

- в термосе с охлаждающей смесью (сухой лед и этиловый спирт в равных частях) температура - 71°C держится несколько дней;

- в смеси из 3 частей льда, снега и 1 части хлорида натрия, охлаждение до - 15-20°C держится несколько часов;

- в смесь из равных объемов глицерина и физраствора (0,85% NaCl) или в 50%-ном глицерине, если использовать глицерин, то материал нельзя вводить лабораторным животным, эмбрионам, культурам клеток, использовать для флюоресцирующей микроскопии.

Тара, где находится материал, должна быть подписана, термос опечатан, материал снабжен сопроводительной запиской.

После транспортировки хранят исследуемый материал в лаборатории -40-70°C.

Подготовка вирусодержащего материала для исследований

В лаборатории материал оттаивают, отмывают от глицерина, берут для исследований только часть, остальную хранят при -40-70°C (архив).

Ткани и органы измельчают стерильными ножницами, растирают в ступке со стерильным кварцевым песком. Из растертого материала готовят 10%-ную суспензию на фосфатном буфере или растворе Хенкса. Центрифугируют 1,5 -3 тыс. об/мин, надосадочную жидкость отсасывают в стерильный флакон, освобождают от микрофлоры, добавляя пенициллин, стрептомицин, нистатин по 100 тыс. ЕД на 1 мл), контакт 30-60 мин, сеют на ПА, ПБ, МППБ, среда Сабуро или Чапека. Если в суспензии роста нет, то ее можно использовать для вирусологических исследований и хранить -20-70°C.

Смывы из носа, глаз встряхивают с тампонами 10-15 мин, отжимают, центрифугируют 2-3 тыс об/мин – 20 мин, надосадочную жидкость сливают, добавляют пенициллин и стрептомицин по 100 тыс. ЕД, выдерживают, делают посев, остальной материал замораживают.

К 1 г фекалий добавляют 10 мл раствора Хенкса, стерильные бусы, встряхивают, центрифугируют 2-3 тыс. об/мин, добавляют пенициллин, стрептомицин, нистатин по 300 тыс. ЕД, а также 200 мкг тетрациклина на 1 мл экстракта, делают посев, если роста нет, экстракт замораживают.

В мочу добавляют антибиотики, затем делают посев, при отрицательном результате замораживают.

Содержимое папул и пузырьков разводят физраствором 1:5, корки растирают в ступке разводят физраствором 1:5- 1:10, центрифугируют 2-3 тыс. об/мин в течение 10-15 мин, добавляют антибиотики 200-500 тыс. ЕД на 1 мл, используют для заражения.

Кровь оттаивают, центрифугируют, добавляют антибиотики 100-200 тыс. ЕД на мл, используют после контроля на стерильность. Свернувшуюся кровь растирают в ступке с раствором Хенкса 1:1.

Методы заражения лабораторных животных

К лабораторным животным относят белых мышей, белых крыс, морских свинок, кроликов.

Лабораторных животных используют для:

- биопробы с целью обнаружения вируса в материале, (развивается заболевание с характерными признаками);
- первичного выделения и накопления вируса; органы и ткани погибших содержат биомассу вируса;
- поддержания вируса в активном состоянии;
- титрования вируса;
- получения гипериммунных сывороток.

Вирусосодержащий материал может быть введен раз-

ными методами: подкожно, внутрикожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, внутривенно, интраназально, интрацеребрально.

Способ введения обусловлен тропизмом вируса - способностью репродуцироваться в определенных типах клеток. Если вирусы репродуцируются:

- в нервных клетках их называют – нейротропные (вирус бешенства);
- в клетках кожи - дермотропные (вирус оспы);
- в легких – пневмотропные (грипп);
- в разных клетках могут репродуцироваться – политропные (вирус ИРТ);

во всех типах клеток – пантропные (возбудитель чума собак).

Таблица 1 - 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

Вскрытие лабораторных животных

Для изучения патологоанатомических изменений и получения вирусосодержащего материала экспериментально зараженных животных вскрывают сразу после гибели.

Труп фиксируют на вскрывочном столике или на доске. Брюшную и грудную полости вскрывают при фиксации животных в спинном положении.

Шерсть обрабатывают дезинфицирующим раствором, используют стерильные ножницы и пинцеты. После вскрытия кожи инструменты меняют.

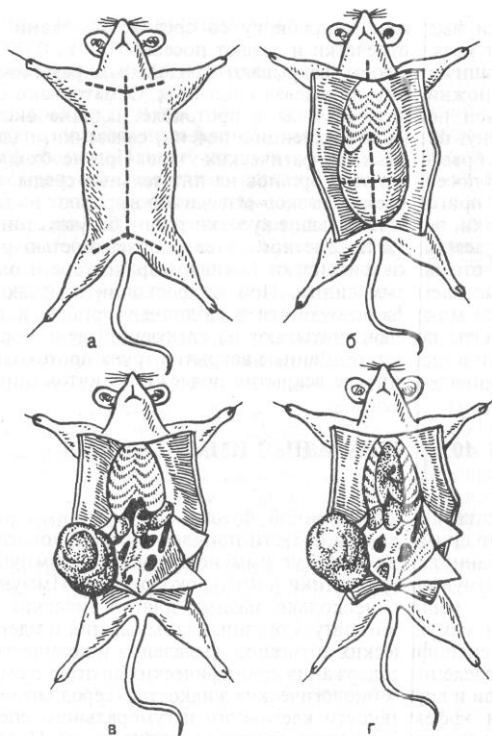


Рис. 1. Вскрытие мыши
а - г – этапы вскрытия

Череп вскрывают, укрепив погибшее животное в брюшном положении, в последовательности, представленной на рис. 2.

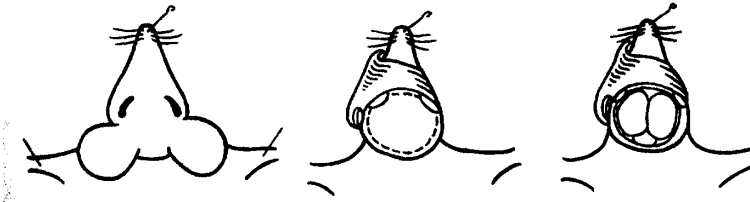


Рис. 2. Порядок вскрытия черепа у белой мыши

Контрольные вопросы и задание для самостоятельной работы

1. Определение «вирус», «вирусная частица», «вирион».
3. Отбор и транспортировка вирусосодержащего материала.
4. Подготовка органов и тканей к исследованию.

ТЕМА №2

Строение куриного эмбриона. Способы заражения, вскрытия

Цель занятия. Познакомиться со строением КЭ, методами заражения, вскрытия, признаками размножения вирусов в КЭ.

Оборудование и материалы. КЭ, таблицы, овоскоп, шприцы, иглы, «вирусосодержащий материал», спиртовки, погибшие КЭ, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Освоить методику заражения и вскрытия КЭ. Диагностику вирусных заболеваний КЭ по патологоанатомическим признакам.

Строение куриного эмбриона

Куриные эмбрионы (КЭ) стали использовать для вирусологических исследований с 30-х годов прошлого века. Они чувствительны ко всем вирусам птиц, ко многим мле-

копитающим. КЭ стерильные, гарантировано стерильные в СПЭВ- хозяйствах, свободных от инфекционных болезней. Используют КЭ в возрасте 5-12 дн. с целью:

- выделения и накопления вируса;
- титрования вируса;
- идентификации вируса в реакции нейтрализации.

В составе КЭ оболочки и структуры:

▪ *скорлупа* пористая оболочка проницаема для воздуха и микробов, выполняет функцию защиты, а Ca^{++} источник для питания КЭ;

▪ *подскорлупная оболочка*, служит фильтром для механических частиц;

▪ *воздушная камера*, образуется между листками подскорлупной оболочки, содержит воздух;

▪ *хорионлантоисная оболочка (ХАО)*, выполняет дыхательную функцию;

▪ *аллантоисная полость с жидкостью*, для сбора продуктов обмена;

▪ *зародыш*, располагается головой к воздушной камере, погружен в амниотическую жидкость;

▪ *амнион*, содержит 1 мл жидкости, (буферной среды для развития зародыша);

▪ *желточный мешок* пуповиной связан с зародышем и является источником питания для зародыша;

▪ *остаток белка*, на ранних стадиях развития формирует белковую оболочку – источник воды, органических соединений для питания, содержит лизоцим.

Способы заражения куриных эмбрионов

Способ заражения зависит от возможности размножения вирусов и размеров зародышевых структур. Доставленные эмбрионы помещают в термостат при температуре 37°C, влажность 60-70%, воздушной камерой вверх, сутки они должны адаптироваться.

Перед заражением эмбрионы овоскопируют, отмечают границы воздушной камеры, место зародыша, желточного мешка (зона без сосудов), белок. Доза для заражения 0,2 мл.

Заражение в боксе, скорлупу обрабатывают иодированным спиртом, фиксируют в специальной подставке, используют стерильные иглы и шприцы.

Существуют способы:

- в *желточный мешок* с 5 по 7 день инкубации для размножения вируса болезни Марека, ринопневмонии лошадей, катаральной лихорадки овец. Возможны *два варианта* заражения в *вертикальном положении* в центре под углом на глубину 3,5-4 см и *горизонтальном положении*, отступив 1 см от центра вниз, на глубину 3,5 – 4 см;

- в *амниотическую полость* в возрасте 6-10 дней 1 мл жидкости. Для культивирования вируса гриппа, ньюкаслской болезни, ринопневмонии лошадей. *Первый вариант* – *закрытый*, под контролем овоскопа, яйцо горизонтально зародышем вверх, тупой иглой по направлению к зародышу, движение эмбриона доказывает, что в амнионе. *Второй вариант* – *открытый*, срезают скорлупу, подскорлупную оболочку, окно 1,5х2,5 см, захватывают ХАО + амниотическую оболочку, вводят вирусосодержащий материал, запаивают покровным стеклом или лейкопластырем, инкубируют в вертикальном положении.

- в *аллантоисную полость* в 9-11 дней (вирусы гриппа, ньюкаслская болезнь, ринопневмония лошадей, везикулярный стоматит и др) *Первый вариант* – сбоку выше воздушной камеры на 5-6 мм на глубину 1-1,2 мм, *второй вариант* – горизонтально в центр на глубину 2-3 мм.

- на *хорионаллантоисную оболочку* на 10-12 день инкубации (вирус оспы, ларинготрахеита, чумы плотоядных, болезни Ауески, катаральной лихорадки овец). КЭ заражают через естественную воздушную камеру, вырезают окно 1,5х2 см, снимают подскорлупную оболочку, на обнажившийся участок ХАО наносят вирусосодержащий материал, отверстие закрывают пластырем или покровным стеклом.

После прокола скорлупу запаивают парафином.

Вскрытие куриного эмбриона

Погибших и живых вскрывают с целью обнаружения вируса и получения вирусосодержащего материала. Вирус может накапливаться на ХАО, в желточном мешке, в аллантаической и амниотической жидкости

КЭ вскрывают в стерильном боксе. Скорлупу обрабатывают иодированным спиртом. Вскрывают воздушную камеру, отсасывают аллантаическую жидкость, амниотическую, выливают в стерильные флаконы. Срезают ХАО, помещают в стерильную чашку с физраствором, затем расправляют в другой чашке. Извлекают эмбрион с желточным мешком, затем желточный мешок отрезают, помещают в стерильные чашки Петри.

Признаки размножения вирусов в курином эмбрионе

● Гибель в характерные для вируса сроки без патологоанатомических изменений.

● Патологоанатомические изменения в различных структурах КЭ:

▪ *кровотечения, узелки на ХАО* вызывают вирусы оспы, ИЛТ, болезни Ауески и др.).

▪ *обезвоживание и мумифицирование КЭ* под действием вируса ИБК;

▪ *прилипание лапок к голове под действием вируса ИБК*;

▪ *перекручивание шеи* (признак размножения вируса ИБК);

▪ *дистрофия печени* – признак размножения вируса гепатита утят;

▪ *накопление уратов* (соли мочевой кислоты), фиброзные пленки обнаруживают при поражении почек вирусом ИБК;

▪ водянка головного мозга и отеки шеи при пикорна-вирусной инфекции, наличие кровоизлияния в мозг и акрании признак перегрева в первые дни инкубирования;

● гемагглютинирующие свойства аллантаической и амниотической жидкости, установленные помощью капельной РГА, когда к капле аллантаической жидкости добавляют взвесь эритроцитов, через 5-10 мин учет по образованию хлопьев, свидетельствуют о наличии гемагглютинирующих вирусов;

● Иногда не удается обнаружить ни один из признаков, такой пассаж называют «слепым».

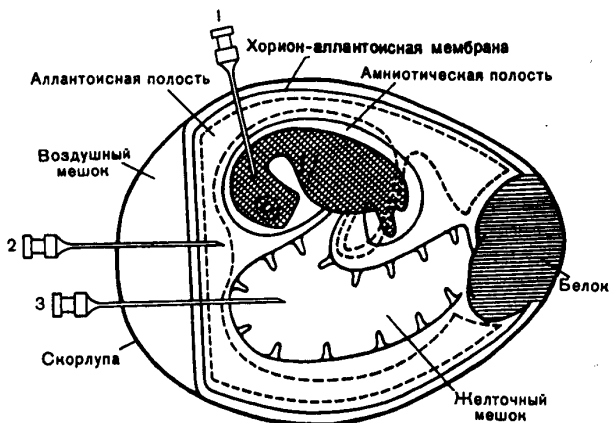


Рис. 3. Способы заражения куриного эмбриона.

1 – в амниотическую полость и зародыш;
2 – в аллантаическую полость; 3 – в желточный мешок

Задание для самостоятельной работы

1. Определить патологию у КЭ, представленную на рис. 4, результаты внести в таблицу 2.



Рис. 4. Разные виды патологии у КЭ

Таблица 2 - Виды патологии у КЭ

№ п.п.	Тип патологии
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	
7.	

Контрольные вопросы

1. Классификация вирусов (заполнить таблицу).

2. Строение КЭ.
3. Способы заражения КЭ.
4. Признаки размножения вирусов в КЭ.

ТЕМА № 3

Приготовление первично-трипсинизированной культуры клеток из кожно-мышечной ткани КЭ (культуры куриных фибробластов).

Титрование вирусов по БОЕ

Цель занятия. Познакомиться с, методикой приготовления КФ, титрования вирусов по БОЕ

Оборудование и материалы. Стерильные инструменты для вскрытия, КЭ, таблицы, овоскоп, шприцы, иглы, спиртовки, центрифуга, центрифужные пробирки, пипетки, раствор Хенкса, раствор 0,15%-ного трипсина, среда 199, Игла, электронный ресурс «Культуры клеток».

Задание для самостоятельной работы студентов. Освоить методику приготовления культур клеток и титрования вирусов по БОЕ.

Этапы приготовления культуры клеток куриных фибробластов

Для приготовления культуры клеток куриных фибробластов (КФ) – популяции клеток эпителия, мышц КЭ, прикрепленных к стенке пробирки, используют 9 – 11-дневные куриные эмбрионы.

Приготовление культуры клеток включает этапы:

- 9-11 - дневные эмбрионы *овоскопируют*, отмечают воздушную камеру, тело.
- *Вскрывают*, извлекают зародыш в стерильную чашку Петри. Отрезают лапы, крылья, голову, извлекают внутренние органы, кожно-мышечный мешок помещают в стерильную чашку Петри, измельчают.
- *Отмывают* раствором Хенкса, центрифугируя при 1 тыс. об/мин.- 10 мин 3 раза.

- Осадок заливают 0,15%-ным подогретым трипсином 1:3, ставят на магнитную мешалку, через 3-5 мин сливают в колбу, которая стоит на льду, после охлаждения, фильтруют через стерильный марлевый фильтр.

- Суспензию клеток центрифугируют, осадок ресуспендируют в 10 мл теплой +37⁰С среде 199.

- Определяют количество клеток в 1 мл суспензии в камере Горяева, добавляя к суспензии 0,1%-ный раствор кристаллвиолета и 0,1н. раствор лимонной кислоты.

- К суспензии добавляют ростовую питательную среду из расчета 1 мл на 700 тыс. клеток и ставят в термостат на 48 часов.

Культуры куриных фибробластов используют при работе с вирусом болезни Ауески, оспы птиц, Ньюкаслской болезни, гриппа птиц, саркомы Рауса.

Титрование вирусов

При работе с вирусами возникает необходимость определения их количества с целью:

- определения титра (разведения) вирусосодержащего материала для заражения КЭ, лабораторных животных, культур клеток;

- активности противовирусной вакцины, диагностикума;

- идентификации полевого или вакцинного штамма вируса.

Титр вируса (Т) – это количество вируса, содержащегося в единице объема материала. Измеряют Т в единицах его активности по инфекционному или гемагглютинирующему действию.

Инфекционное действие вируса определяют :

- в оснообразующих единицах Т по ООЕ;

- в бляшкообразующих единицах Т по БОЕ;

- по ЛД₅₀ – доза вируса, способная убивать 50% опытных животных, ИД₅₀ – доза, вызывающая клиниче-

ские признаки или патоморфологические изменения у 50% лабораторных животных;

- по ЭДД₅₀ – гибель 50% КЭ, ЭИД₅₀- изменения у 50% КЭ;

- по ЦПД₅₀- доза, вызывающая ЦПД (ЦПЭ) у 50% зараженных культур клеток;

- по ГАЕ ,1 ГАЕ вызывает агглютинацию вируса интенсивностью на ++

Определение титра по БОЕ

Вирусосодержащий материал разводят 1:10, 1:100, 1:1000 в пробирках и заражают выращенную культуру клеток в колбах – матрацах, доза для заражения культур клеток 0,2 мл. Культуру клеток покрывают тонким слоем агара и ставят на инкубирование. Через 48 часов подсчитываем бляшки – участки погибших клеток в сплошном монослое культуры, от чего образуются просветленные участки. Каждая бляшка образуется при репродукции одной вирусной частицы. Бляшки подсчитывают и выполняют расчет титра по формуле:

$$T = n : (V \times a),$$

где n- среднее арифметическое бляшек, V – объем дозы (0,2), а - разведение.

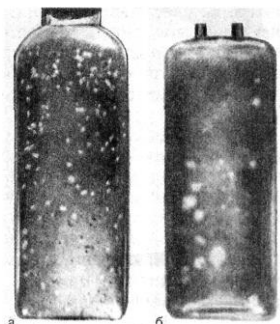


Рис. 5. Бляшки вирусов в культуре клеток: а – бляшки вируса ньюкаслской болезни; б – бляшки вируса Коксаки.

Пример: после заражения вирусом в разведении 1:10, 1:100, 1:1000 матрасов с культурами клеток обнаружены бляшки: 134, 28, 5.

Определяют $n = (134 + 28 + 5) : 3 = 55,6$

$T = 55,6 : (0,2 \times (0,1 + 0,01 + 0,001)) = 55,6 : 0,0222 = 2504$, т.е. в 1 мл суспензии вирусосодержащего материала содержится 2504 доз вируса, 1 доза которого способна вызвать образование 1 бляшки.

Задание для самостоятельной работы

2. Определить титр по ООЕ вируса болезни Марека. По 0,2 мл каждого разведения вносили в 3 культуры клеток фибробластов. К концу опыта количество бляшек в монослое составило:

Таблица 4 – Результат заражения КФ

Разведения вируса	Количество бляшек в монослое		
	1	2	3
10^{-1}	45	52	61
10^{-2}	40	37	42
10^{-3}	10	12	8
10^{-4}	1	0	2
10^{-5}	1	1	1

Расчет:

1. Морфология и структура вирусов.
2. Характеристика прионов.
3. Приготовление КФ.

ТЕМА № 4

Титрование вирусов по ГАЕ, ООЕ, ЦПД₅₀, LD₅₀

Цель занятия. Познакомиться с методикой титрования вирусов по ГАЕ, ООЕ, LD₅₀, ЦПД₅₀.

Оборудование и материалы. Плексигласовые пластины, компоненты для РГА, пипетки автоматы, электронный ресурс «Культуры клеток», таблицы.

Задание для самостоятельной работы студентов. Освоить методику приготовления культур клеток и титрования вирусов по ГАЕ, ООЕ, LD₅₀, ЦПД₅₀. Выполнить расчеты результатов титрования.

Если вирусы не образуют бляшек, их Т определяют по ГАЕ, ООЕ, LD₅₀, ЭLD₅₀, ЦПД₅₀

Титрование вирусов по гемагглютинирующей активности (ГАЕ)

В основе реакции гемагглютинации (РГА) лежит способность некоторых вирусов, содержащих в суперкапсиде гемагглютинин, агглютинировать (склеивать) эритроциты определенного вида животных, человека. Агглютинация осуществляется прикреплением вириона к двум эритроцитам.

Гемагглютинирующую активность вируса оценивают по ГАЕ, за 1 ГАЕ принимают дозу вируса, способную агглютинировать 50% эритроцитов. Наибольшее разведение, при котором оценка не менее 2++ и будет 1 ГАЕ (гемагглютинирующая единица).

Титруют вирусы по гемагглютинирующей активности в реакции гемагглютинации (РГА), которую ставят двумя способами:

- по типу капельной РГА на предметном стекле, когда каплю взвеси эритроцитов и вирусосодержащего материала смешивают, положительный результат характеризуется склеиванием эритроцитов, интенсивностью 2++ и 4++++. Капельную РГА используют только для обнаружения гемагглютинирующих вирусов;

- по типу луночной РГА, в лунках плексигласовых пластин, где готовят разведения вируса, затем добавляют взвесь эритроцитов по схеме, представленной в таблице 4.

Таблица 5 - Схема титрование вируса в РГА

Компоненты / № лунок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Физраствор	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Вирусный материал	0,5	Готовим разведения								
1% суспензия эритроцитов	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Учет 30-40 мин при комнатной температуре										
Результат Т=128ГАЕ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
Разведение	1:2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024

После добавления компонентов, содержимое лунок перемешивают, выдерживают 30 – 60 мин при комнатной температуре. Реакцию учитывают в крестах ++++ - сплошной зонтик с кружевными краями; +++ - зонтик с округлыми краями; ++ округлый зонтик, а в центре осадок пунктик; - (отрицательная)- осадок пунктик. Контролем реакции служит лунка с 0,5 мл физраствора и 0,5 мл взвеси эритроцитов.

Титрование вирусов по ООЕ (оспообразующим единицам)

Титр вирусов, вызывающих образование на ХАО КЭ оспины (папулы, некротические фокусы, некротические узелки), определяют по ООЕ (оспообразующим единицам).

Для этого заражают 5 куриных эмбрионов на ХАО известным разведением вирусосодержащего материала в дозе 0,2. Погибших и охлажденных КЭ вскрывают, извлекают ХАО, подсчитывают оспины. Определяют титр по формуле:

$$T = n : V \times a, \text{ где}$$

n – среднее арифметическое оспин;

V – объем дозы (0,2);

a – разведение.

Пример: после заражения 5 КЭ вирусосодержащим материалом разведением 1:10, дозой 0,2, обнаружено количество оспин 10, 11, 13, 18, 8. Определяют:

$$n = (10+11+13+18+8) : 5 = 12;$$

$$T = 12 : (0,2 \times 0,1) = 600 \text{ ООЕ, т.е.}$$

В 1 мл вирусосодержащего материала содержится 600 доз вируса, каждая доза способна образовывать 1 оспину на ХАО.

Определения титра вируса по ЦПД₅₀ (ТЦПД₅₀)

Титр вирусов, способных к цитопатогенному действию, определяют по ЦПД₅₀ - разведению (титру) вируса, вызывающего патологические изменения у 50% образцов культур клеток.

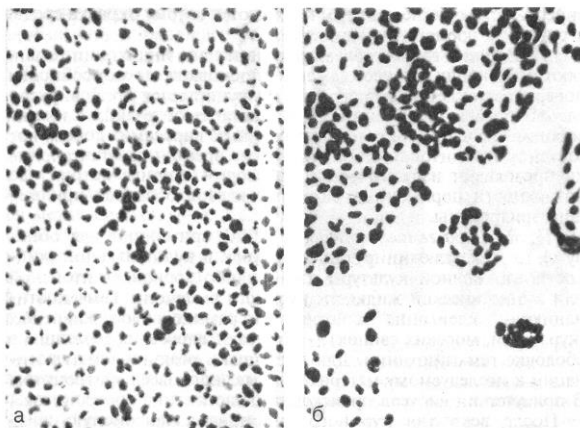


Рис. 6. Культура клеток: а – неизмененные клетки; б - цитопатические изменения в клетках.

В пробирки с выросшей культурой клеток (по 6 пробирок для каждого разведения вируса) вносят разные разведения вируса $10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6}$ по 0,2 мл, равномерно распределяют по монослою, затем зараженные культуры оставляют на 1-2 часа при комнатной температуре и вносят по 0,9 мл поддерживающей питательной среды, инкубируют при 37°C . Ежедневно просматривают пробирки под малым увеличением микроскопа. Отмечают ЦПД:

- появление округлых клеток;
- образование бляшек;
- образование включений;
- формирование симпластов;
- образование синтициев.

Расчет Т по формуле Кербера:

$$\text{Lg ТЦПД}_{50} = \text{lgB} - [(\text{в}-50) \times \text{LgD} : (\text{в}-\text{а})], \text{ где}$$

В- разведение, при котором ЦПД > 50%;

в - % культур клеток, имеющих поражение соответствующего В;

а – процент соответствующего разведения, при котором поражение клеток менее 50%;

D - коэффициент разведения = 10.

Пример: при заражении вирусом парагриппа (ПГ-3) по 6 культур клеток ЦПД обнаружено:

Таблица 6 - Результаты заражения культур клеток

Разведение вируса	Кол-во пробирок с ЦПД	% ЦПД
10^{-1}	5	83,3
10^{-2}	4	66,6
10^{-3}	4	66,6
10^{-4}	4	66,6
10^{-5}	2	33,3
10^{-6}	0	0

Таким образом $Lg T \text{ ЦПД}_{50} = Lg 10^{-4} - [(66,6 - 50 \times Lg 10) : (66,6 - 33,3)] = -4 [-16,6 \times 1 : 33,3] = -4 [16,6 : 33,3] = -4,49$, т.е $T Lg \text{ ЦПД}_{50} = -4,49$, это означает, что ЦПД₅₀ клеток вызывает разведение вируса $10^{-4,49}$ ($T=10^{-4,49}$)

Если вирусы не образуют оспин, бляшек, ЦПД, их T определяют по ЛД₅₀, ЭЛД₅₀ редко ИД₅₀, ЭИД₅₀.

Титрование вирусов по ЛД₅₀, ЭЛД₅₀

Готовят разведения вирусосодержащего материала 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , затем заражают лабораторных животных или КЭ, затем учитывают результат, определяя количества павших, % летальности.

Таблица 7 – Методика определения и учета титра вируса по ЛД₅₀, ЭЛД₅₀

Разведение	Выжило	Пало	% летальности
10^{-1}	0	6	100
10^{-2}	0	6	100
10^{-3}	1	5	83,3
10^{-4}	4	2	33,3

Расчет ведут по формуле Кербера:

$Lg TLD_{50} = lgB - [(b-50) \times LgD : (b-a)]$, где

B- разведение, при котором гибель $> 50\%$,

b - % соответствующий гибели разведения B,

a – процент соответствующего разведения, при котором летальность менее 50% ,

D- коэффициент разведения = 10.

$Lg TLD_{50} = Lg 10^{-3} - [(83,3 - 50 \times Lg 10) : (83,3 - 33,3)]$
 $= -3 - (33,3 \times 1 : 50) = -3,66$. $Lg TLD_{50} = -3,66$, т.е. разведение вируса $10^{-3,66}$ вызывает гибель 50% лабораторных животных, а $T=10^{-3,66}$.

Задание для самостоятельной работы

1. Определить титр вируса по ООЕ. При заражении по 0,2 мл каждым разведением 6 куриных эмбрионов количество бляшек составило:

Таблица 8 – Результаты заражения КЭ

Разведения вируса	Количество оспин на ХАО КЭ					
10^{-1}	120	140	150	100	180	130
10^{-2}	60	80	80	90	70	50
10^{-3}	10	8	5	2	10	4
10^{-4}	1	2	3	1	4	2

Расчет:

2. Определить ТЦПД₅₀ вируса парагриппа. Каждым разведением заражали по 4 культур клеток. Количество культур клеток с ЦПД составило:

Таблица 9 – Результат заражения культур клеток

Разведения вируса	Наличие ЦПД				% ЦПД
	1	2	3	4	
10^{-1}	+	+	+	+	100
10^{-2}	+	+	+	+	100
10^{-3}	-	+	+	+	75
10^{-4}	-	+	-	-	25

Расчет:

3. Определить Т ЛД₅₀ ротавируса, количество павших и выживших 6 белых мышей каждого разведения вируса составило:

Таблица 10 - Результат титрования ротавируса

Разведения	Выжило	Пало	% летальности
10^{-1}	0	6	
10^{-2}	0	6	
10^{-3}	1	5	
10^{-4}	4	2	
10^{-5}	6	0	

Расчет:

Контрольные вопросы

1. Титрование вирусов по ООЕ, БОЕ, ЦПД₅₀.
2. Титрование вирусов по ГАЕ, ЛД₅₀.
3. Культивирование вирусов.
4. Репродукция вирусов.
5. Питательные среды для культивирования вирусов

ТЕМА №5

Серологические реакции в вирусологии.

Реакция задержки гемагглютинации.

Реакция нейтрализации

Цель занятия. Познакомиться с методиками постановки и учета серологических реакций.

Оборудование и материалы. Плексигласовые пластины, диагностикумы для РЗГА, РН, пипетки автоматы, таблицы.

Задание для самостоятельной работы студентов. Освоить методики постановки и учета РЗГА, РН.

Вирусы - хорошие антигены, поэтому вирусы, противовирусные антитела (Ig) можно обнаружить в исследуемом материале с помощью серологических реакций таких как реакция:

- *диффузной преципитации (РДП, РИД);*
- *задержки гемагглютинации (РЗГА),* еще эту реакцию называют *реакцией торможения гемагглютинации (РТГА)* ставят с вирусами, обладающими гемагглютинирующей активностью;
- *непрямой гемагглютинации;*
- *реакции нейтрализации РН;*
- *РСК;*
- *иммуноферментного анализа ИФА,* современная чувствительная реакция;
- *полимеразной цепной реакции ПЦР* – увеличение

числа копий определенных фрагментов ДНК *in vitro* с последующей индикацией электрофорезом, гибридизацией, калориметрически, флуориметрически, радиоизотопно. Метод ПЦР удобен для диагностики наследственных и вирусных заболеваний.

▪ *реакция иммунофлуоресценции РИФ* - выявление скопления вируса с помощью иммунных сывороток, меченных флуорохромом.

Серологическая диагностика вирусных заболеваний предусматривает выявление антител (Ig) и у больных и переболевших животных (реконвалесцентов). Выявление антител (Ig) у реконвалесцентов называется ретроспективной диагностикой.

Реакция задержки гемагглютинации (РЗГА, РТГА)

Реакция задержки или торможения гемагглютинации (РЗГА, РТГА) – серологический метод, широко используемый для обнаружения вирусного гемагглютинирующего вируса) с помощью антигемагглютинирующих антител. При контакте вируса с гомологичными антителами происходит связывание антител с гемагглютинином вируса, образуется комплекс «антиген и антитело» при этом нейтрализуется гемагглютинирующая активность вируса, в результате чего вирус теряет свойство агглютинировать эритроциты. РТГА впервые предложена Херстом в 1941 г. в США для обнаружения вирусов гриппа и его титра.

РЗГА, РТГА также широко применяют для обнаружения гемагглютинирующих антител, когда готовят разведения сыворотки, вносят вирус в дозе 4 ГАЕ, затем эритроциты.

РЗГА, РТГА (реакция торможения гемагглютинации) ставят с целью:

- обнаружения гемагглютинирующих вирусов и установления их титра в испытуемом экстракте;

- определения титра антител против гемагглютинирующих вирусов.

РЗГА ставят в лунках макрометодом и микрометодом в планшетах.

РЗГА ставят в два этапа:

- вначале готовят разведения сыворотки в лунках пластин или планшетов, затем добавляют вирус в количестве 4 ГАЕ, экспозиция взаимодействия 30 – 60 мин в зависимости от видов вирусов.

- на втором этапе постановки РЗГА, чтобы выявить нейтрализацию гемагглютинирующей активности вируса добавляет взвесь эритроцитов, перемешивают, оставляют при комнатной температуре на 30 – 60 мин.

Учет в крестах:

- ++++ - полное отсутствие гемагглютинации, осадок в виде пунктика (точки);

- ++ - осадок диск и пунктик;

- кружевной осадок в виде тонкой пленки - отрицательный результат.

Реакция нейтрализации (РН)

Реакция нейтрализации (РН) вирусов основана на способности специфических антител достаточно прочно соединяться с вирионами и нейтрализовать их.

Сущность РН в контакте равных объемов сыворотки и вируса в течение некоторого времени при определенной температуре с последующим выявлением результатов с помощью биопробы.

РН ставят с целью:

- определить титр вируснейтрализующих антител у обследуемых, используя известный вирус;

- идентификации выделенного неизвестного вируса, испытывая его с заведомо известными сыворотками;

- определения количественного содержания (титр)

антител в лечебных, профилактических, диагностических сыворотках.

РН ставят в двух модификациях:

- с постоянным разведением иммунной сыворотки и разными разведениями вируса для идентификации неизвестного вируса;

- с постоянной дозой известного вируса и разными разведениями исследуемых сывороток для обнаружения и титрования неизвестных противовирусных антител в парных сыворотках у больных, при ретроспективной диагностике и оценке качества лечебно-профилактических сывороток.

Для РН используют лабораторных животных, куриные эмбрионы, культуры клеток.

Результаты РН учитывают по отсутствию:

- гибели, развития клинической картины болезни и патологических изменений в органах и тканях биологических моделей;

- цитопатического действия (ЦПД) или бляшкообразования в культуре клеток.

Отсутствие гибели биологических моделей, цитопатогенного (цитопатического) действия это положительный результат (+), гибель биологических моделей, цитопатогенное действие в культурах клеток - отрицательный результат (-).

Методика РН с разведенными сыворотками

Вначале титруем вирус и определяем его разведение, вызывающее гибель или ЦПД 50% тест объектов (биологических моделей), увеличивает дозу вируса в 100 раз и используем для постановки реакции.

Сыворотки для РН должны быть освобождены от термолабильных неспецифических ингибиторов путем прогревания 56° С – 30 мин, кур - 58°С, кроликов - 60°.

Готовят двукратные разведения сыворотки: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:132, 1:256, 1:512, предварительно прогретой для удаления комплемента.

Смешивают равные объемы каждого разведения сыворотки и вируса, смесь оставляют для контакта при 37⁰С от 30 мин до 18 час в зависимости от вида вируса.

После контакта вируса с разными разведениями сыворотки, смесями заражают лабораторных животных, либо куриные эмбрионы, либо культуры клеток.

Результаты учитывают через некоторое время по отсутствию или гибели биологических моделей, появлению ЦПД в культурах клеток.

Реакцию ставят с положительным и отрицательным контролями.

Учитывая результат, определяют разведение сыворотки, при которой она защищает 50% КЭ от действия рабочей дозы вируса

Расчет по формуле Кербера:

$$\text{Lg TЭД}_{50} = \text{lgD} + (\text{Lgd} : 2) - \text{Lgd} \times (\sum r : n), \text{ где}$$

D- наибольшее разведение, защищающее 100% биологических объектов;

d – коэффициент разведения, равен 2

r - количество, защищенных КЭ в каждом разведении,

n - количество объектов при испытании каждого разведения

$$\text{Lg TЭД}_{50} = \text{Lg } 10^{-0,6} + (\text{Lg} 2 : 2) - \text{Lg} 2 \times (0:4 + 0:4 + 1:4 + 1:4 + 1:4 + 3:4 + 3:4 + 4:4) = -0,6 + (-0,3 : 2) - (-0,3 \times 3,25) = -0,6 + (-0,15) + (-0,975) = -1, 725$$

Таблица 11 – Схема постановки и учета РН с разведенными сыворотками на КЭ

Разведения сыворотки	Количество зараженных КЭ	Доза для заражения смеси	Кол-во выживших	Кол-во погибших
1:2, $10^{-0,3}$	4	0,2	4	0
1:4, $10^{-0,6}$	4	0,2	4	0
1:8, $10^{-0,9}$	4	0,2	3	1
1:16, $10^{-1,2}$	4	0,2	3	1
1:32, $10^{-1,5}$	4	0,2	3	1
1:64, $10^{-1,8}$	4	0,2	1	3
1:128, $10^{-2,1}$	4	0,2	1	3
1:256, $10^{-2,4}$	4	0,2	0	4

Находим по таблице антилогарифмов, что это разведение 1: 58= ТЭД₅₀ – защищающее 50% КЭ от 100 ЭД₅₀., т.е. вирус соответствует виду испытуемой сыворотке, которая в титре 1:58 нейтрализует его.

Методика РН с разведениями вируса

Шире в лабораторной практике используют методику с разными разведениями вируса.

- Готовят в пробирках десятикратные разведения вируса 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} – 2 ряда.

- Ко всем разведениям первого ряда добавляют тот же объем специфической сыворотки (SS) в небольшом разведении (1:10, 1:20).

- Ко всем разведениям второго ряда добавляют нормальную сыворотку (SN) в таком же разведении.

- Смеси выдерживают установленное время при определенной температуре.

- Заражают тест - объекты (КЭ, лабораторных животных, культуры клеток).

- Ведут наблюдения за зараженными биологическими моделями, отмечают погибших, появление ЦПД в культурах клеток.

- Рассчитывают Т вируса по ЛД₅₀ , ЭЛД₅₀ , ЦПД₅₀ нейтрализованного специфической сыворотки T_{ss} и титр вируса, нейтрализованный нормальной сывороткой T_{SN} .

- Определяют индекс нейтрализации (ИН) по формуле:

$$\text{ИН} = T_{\text{SN}} : T_{\text{ss}}$$

ИН показывает во сколько раз специфические антитела специфической сыворотки могут снизить титр вируса путем нейтрализации. Если ИН ≤10, то результат отрицательный, если ИН ≤50 – сомнительный, если ИН ≥50, то результат РН положительный.

Пример: сыворотка против вируса НБ нейтрализовала полевой вирус НБ в титре 10⁻² , а нормальная - вирус разведенный в титре 10⁻⁵ . ИН = 10⁻⁵ : 10⁻² = 1000 раз.

Задание для самостоятельной работы

Рассчитать титр противопастереллезной сыворотки по результатам РН.

Таблица 12 – Результаты РН

Разведения сыворотки	Кол-во зараженных	Количество выживших	Кол-во погибших	Отношение кол-ва погибших к испытуемым
1:2 10 ^{-0,3}	4	4	0	
1:4 10 ^{-0,6}	4	4	0	
1:8 10 ^{-0,9}	4	4	0	
1:16 10 ^{-1,2}	4	3	1	
1:32 10 ^{-1,5}	4	3	1	
1:64 10 ^{-1,8}	4	1	3	
1:128 10 ^{-2,1}	4	0	4	
1:256 10 ^{-2,4}	4	0	4	

Расчет Т сыворотки:

Контрольные вопросы

1. Типы взаимодействия вируса с клеткой.
2. Сущность мутаций вирусов.
3. Рекомбинации вирусов, сущность
4. Сущность и методика постановки РЗГА.
5. Сущность и методика постановки РН.

ТЕМА №6

Реакция диффузной преципитации в агаровом геле (РДП). Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Цель занятия. Познакомиться и освоить методику постановки РДП, РНГА.

Оборудование и материалы. Плексигласовые пластины, пипетки автоматы, диагностикум для РНГА, сыворотка крови обследуемых животных. Чашки Петри с агаром Дифко, лейкозный диагностикум.

Задание для самостоятельной работы студентов. Освоить методики постановки и учета РНГА, РИД.

Широкое применение в вирусологии имеет РДП, принцип реакции иммунодиффузии заключается в том, что антиген и антитела, помещенные в лунки, диффундируют в геле агара и при взаимодействии образуют комплекс, который проявляется в виде линии преципитации. Ставят с целью:

- обнаружения вируса, используя заведомо известную сыворотку или иммуноглобулин (вирус бешенства в экстракте мозга, используя антирабический диагностический глобулин);

- обнаружения антител у обследованных, используя заведомо известный антиген.

Реакцию диффузной преципитации в агаровом геле для выявления лейкозных Ig называют РИД (реакция иммунной диффузии).

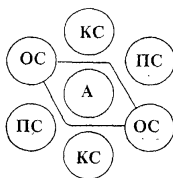
Методика постановки РИД

Для постановки реакции используют лейкозный диагностикум, в составе которого лейкозный антиген, преципитирующая сыворотка, растворитель антигена, солевая смесь и агар для приготовления геля.

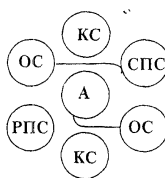
- Готовят гель-агар: солевую смесь высыпают в колбу, добавляют 180 мл дистиллированной воды, 20 мл растворителя. Помещают на водяную баню до полного растворения, разливают в чашки, оставляют для застывания, делают лунки.

- Вносят компоненты: разбавленный антиген ВЛ в центральную лунку, в периферические – специфическую преципитирующую сыворотку (2 лунки) и 4 испытуемые сыворотки.

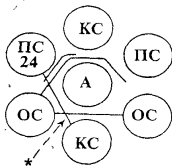
ПОЗИЦИЯ 1



ПОЗИЦИЯ 2



ПОЗИЦИЯ 3



ПОЗИЦИЯ 4

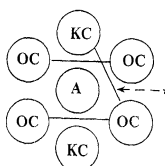


Рис. 7. Результаты реакции антигена ВЛКРС с отрицательной (ОС), положительной (ПС), слабоположительной (СПС), резко положительной (РПС)

Помещают в эксикатор при комнатной температуре, учет через 48 часов, не позже 96 часов по образованию белых полос преципитации в агаровом геле.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Сущность РНГА в склеивании эритроцитарного диагностикума антителами или вирусом.

РНГА применяют для:

- обнаружения вируса в исследуемом материале, используя заведомо известный антительный эритроцитарный антиген (диагностикум), полученный путем адсорбции специфических антител на поверхности формализированных эритроцитов барана, широко применяют для обнаружения респираторных вирусов крупного рогатого скота

- определения титра антител в сыворотке крови при разных вирусных заболеваниях, используя известный эритроцитарный диагностикум, полученный адсорбцией формализированных эритроцитов барана антигенами вирусов.

РНГА ставят по типу:

- пластинчатой в лунках плексиглассовых пластинок (макрометод), когда в лунки разливают физраствор, готовят разведение материала, добавляют эритроцитарный диагностикум; определяют титр исследуемого материала, Экспозиция взаимодействия 1-2 часа, выдерживания при комнатной температуре или в термостате 37⁰ С. Учет в крестах:

- кружевной осадок в виде тонкой пленки с зазубренными краями - +++++;

- кружевной осадок с округлыми краями - +++;

- осадок - диск, пунктик – отрицательная;

- капельной на предметном стекле, с целью индикации антител.

Контрольные вопросы

1. Сущность и методика постановки РИД.
2. Сущность и методика постановки РНГА.
3. Химические противовирусные препараты.

ТЕМА №7

Иммуноферментный анализ (ИФА). Полимеразная цепная реакция (ПЦР), Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)

Цель занятия. Познакомиться с методиками постановки и учета ИФА, ПЦР, РИФ

Оборудование и материалы. Диагностикумы ИФА, ПЦР, люминесцирующие сыворотки, пипетки - автоматы, флуоресцирующие сыворотки, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Учесть результаты РИД, зарисовать, дать заключение. Освоить методику постановки и учета ИФА. Разобрать методику постановки и учета ПЦР на примере идентификации бифидобактерий, РИФ.

Рис. 8. Результаты РДП

Иммуноферментный анализ

ИФА – высокочувствительный метод выявления комплекса антиген - антитело, меченного ферментом, по разложению субстрата и образованию окрашивания или изменению плотности раствора.

ИФА применяют для:

- *обнаружения антигена (возбудителя)* в исследуемом материале;
- *антител у обследуемых (больных, переболевших, вакцинированных)*.

ИФА ставят в двух вариантах:

- *гистохимическом*, который называют иммунопероксидазной реакцией, ставят для выявления возбудителя в мазках, гистосреззах, культурах клеток, выращенных на предметных стеклах, используя прямой и непрямой метод, в положительных случаях образуется цветное окрашивание, обнаруживаемое микроскопией, используют редко ;
- *твердофазном* – в лунках микропанелей (серологических планшетов).

Твердофазный вариант ИФА (ТФИФА, РЭМА – реакция энзиммеченных антител, ELISA – enzyme –kinked immunosorbent assay) широко применяют для диагностики бактериальных и вирусных инфекционных заболеваний.

Для выявления антител лунки планшета сенсibiliзируют инактивированным антигеном, а для выявления антигена (возбудителя) в исследуемом материале – антителами.

Ставят ИФА в три этапа.

- В первом этапе взаимодействуют антиген и антитело при 37⁰ С в течение 1 часа, с последующим 5-кратным промыванием промывочным буфером и осушением.
- Во втором этапе в лунки вносят *конъюгат* (антивицовой глобулин, меченный пероксидазой или щелочной фосфатазой), экспозиция взаимодействия 45 мин при 37⁰ С, с последующим 5-кратным промыванием и осушением.

● В третьем этапе добавляют *субстрат* – вещество, разлагающееся под действием фермента с образованием окрашивания или изменения. Применяют сустраты:

- ортофенилдиамин (ОФД);
- 5-аминосалициловую кислоту;
- тетраметилбензидин (ТМБ);
- нитрофенилфосфат (НФФ).

Ортофенилдиамин (ОФД), 5-аминосалициловую кислоту, тетраметилбензидин (ТМБ) применяют, чтобы выявить пероксидазу. Нитрофенилфосфат (НФФ) используют, чтобы выявить щелочную фосфатазу.

Если происходит образование комплекса антигена с антителом, он фиксируется к стенкам лунок и обязательно взаимодействует с конъюгатом - антивидовым глобулином, меченным ферментом, адсорбируя фермент. При добавлении субстрата происходит его разложение под действием фермента, которое проявляется:

- появлением окрашивания: желто-коричневого при разложении ОФД, 5-аминосалициловой кислоты, НФФ и голубого - при разложении ТМБ;
- повышением плотность раствора, устанавливаемого на спектрофотометре.

Появление окрашивания в лунках, увеличение плотности раствора характеризуется положительной реакцией.

Если комплекса антигена с антителом не образуется, конъюгат после контакта не фиксируется и смывается, субстрат не разлагается, окрашивания не образуется, изменения плотности раствора не происходит – отрицательная реакция.

Сущность и методика постановки полимеразной цепной реакции ПЦР

ПЦР – экспресс метод для индикации и идентификации возбудителя, разработан К. Мюллис в 1983 году. Достоинства ПЦР:

- быстрота анализа;
- высокая чувствительность и специфичность;
- минимальное количество исследуемого материала;
- простота исполнения и возможность полной автоматизации.

Основу метода составляет катализируемое ДНК-полимеразой многократное образование копий определенных фрагментов молекулы ДНК *in vitro*, с последующей их детекцией (обнаружение и идентификация)

ПЦР – исследование состоит из следующих этапов при использовании форм комплектации с электрофоретической детекцией:

- *экстракции ДНК из исследуемых образцов;*
- амплификации ДНК;
- электрофоретической детекции продуктов амплификации в агарозном геле;
- анализ и интерпретация результатов.

Амплификация специфических участков ДНК включает:

- многократное повторение циклов денатурации ДНК (термическое разделение молекулы ДНК на отдельные цепочки при температуре 95 °С в течение 5 мин);
- отжиг или получение специфических олигонуклеотидных праймеров проводят при 50-65 °С - 30 сек;
- элонгацию или полимеризацию – синтез комплементарных цепей ДНК с помощью фермента ДНК-полимеразы.

Для индикации возбудителя необходимо получить несколько миллионов фрагментов ДНК, что удается в течение 25 – 40 циклов, используя прибор амплификатор. Если идентификацию проводят электрофорезом, то готовят агарозный гель и вносят продукты амплификации в лунки, включают источник питания на 18-20 мин, получают изображение полос в геле на компьютере с помощью видеосистемы и заносят результат в базу данных.

Детекцию можно проводить гибридационно-флуоресцентным методом в режиме «реального времени», тогда в составе амплификационной смеси присутствуют флуоресцентно-меченые олигонуклеотиды, которые гибридизуются с комплементарным участком амплифицируемой ДНК-мишени, в результате чего происходит нарастание интенсивности флуоресценции. Это позволяет регистрировать накопление специфического продукта амплификации путем измерения интенсивности флуоресцентного сигнала. Детекция флуоресцентного сигнала осуществляется непосредственно в ходе флуоресцентного сигнала в режиме «реального времени», используя программируемый амплификатор Rotor-Gene, производства Австралии или Германии с системой детекцией флуоресцентного сигнала прибор Анализ результатов на компьютере по наличию или отсутствию пересечения кривой флуоресценции, свидетельствующей о выделении специфической ДНК из материала и ее совместимости с ДНК возбудителем (положительный контроль).

Метод ПЦР применяют:

- для индикации и идентификации возбудителей;
- ДНК – идентификации личности человека, установления родства, выявления генов наследственных болезней.

М 1 2 3 4 5 6 М

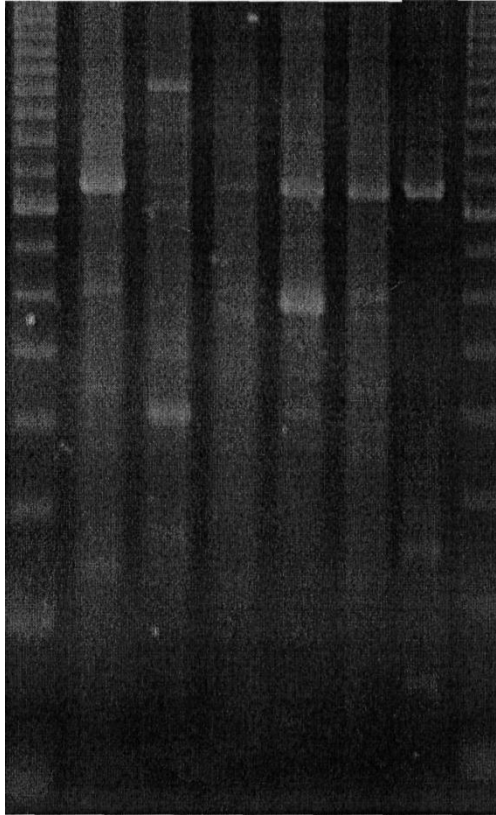


Рис. 9. ЕИС-ПЦР-паттерны исследованных штаммов:

- 1 – *Bifidobacterium adolescentis*;
- 2 – *Bifidobacterium bifidum*;
- 3 – *Bifidobacterium breve*;
- 4 – *Bifidobacterium infantis*;
- 5 – *Bifidobacterium longum*;
- 6 – *Bifidobacterium* sp. (Брянск);
- М – Стандарт молекулярных масс.

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ) или метод флуоресцирующих антител

Основу метода составляет явление люминесценции, сущность которого в поглощении световой энергии с последующим выделением его в виде светового излучения.

В РИФ люминесценция проявляется в виде флуоресценции – свечения веществ флуорохромов, сорбированных на скоплениях вирусов, возникающее в момент облучения возбуждающим светом.

Для возбуждения флуоресценции используют ультрафиолетовую или сине-фиолетовую часть спектра (длина волны 300-400 нм). Для этих целей выпускают люминесцентные микроскопы разных моделей: МЛ-1, МЛ-4, «Люмам».

Метод РИФ заключается в том, что антитела, соединенные с флуорохромом вступают в специфическую связь с гомологичным антигеном и образующийся комплекс обнаруживают по характерному свечению.

Методика постановки РИФ включает:

- *приготовление мазков* на предметных стеклах, можно использовать гистосрезы;
- *подсушивание мазков при комнатной температуре и фиксация охлажденным ацетоном* при комнатной температуре или при минус 15⁰ С от 15 мин до 4-6 часов;
- *окрашивание по прямому или непрямому методу*;
- *учет по интенсивности свечения в крестах.*

Интенсивность свечения оценивают:

- # - очень яркое свечение;
- +++ - яркое свечение;
- ++ - слабое свечение.
- - отрицательная реакция – нет свечения.

Окрашивание прямым методом

На фиксированный мазок наносят флуоресцирующую

специфическую сыворотку, выдерживают 30 мин во влажной камере при 37⁰ С. Отмывают мазок физраствором, подсушивают и микроскопируют в люминесцентном микроскопе.

Флуоресцирующие специфические сыворотки еще называют конъюгатом. Для его приготовления используют высокоактивные гипериммунные сыворотки, меченные ФИТЦ - флуоресцизотиоцианатом (зеленое свечение) и РСХ-родомин сульфохлоридом (красное свечение).

Окрашивание непрямым методом

На фиксированный препарат наносят гипериммунную сыворотку, выдерживают 30 мин во влажной камере при 37⁰ С, отмывают и наносят антивидовую сыворотку, меченную флуорохромом, выдерживают 30 мин при 37⁰ С. Затем препарат отмывают, подсушивают и микроскопируют.

РИФ, (МФА) – экспресс – метод идентификации возбудителей характеризуется:

- высокой специфичностью и чувствительностью;
- простотой техники постановки;
- использованием минимального количества компонентов.

Контрольные вопросы

Вопросы коллоквиума №1

1. Определение «вирус», «вирион», «вирусная частица».
2. Морфология и структура вирусов.
3. Классификация вирусов.
4. Репродукция вирусов.
5. Понятие вирогении.
6. Реакция клетки на вирусную инфекцию.
7. Типы ЦПД.
8. Культивирование вирусов.

9. Первичные и диплоидные культуры клеток.
10. Перевиваемые культуры клеток.
11. Питательные среды для культур клеток.
12. Мутации вирусов.
13. Рекомбинации вирусов.
14. Антивирусные факторы естественной резистентности.
15. Противовирусное значение антител, механизм противовирусного иммунитета.
16. Иммунопатологическое действие вирусов.
17. Противовирусные средства.
18. Иммуномодулирующие препараты.
19. Отбор и транспортировка вирусного материала.
20. Строение куриного эмбриона.
21. Способы заражения КЭ.
22. Этапы приготовления куриных фибробластов.
23. Подготовка вирусосодержащего материала для исследования.
24. Признаки размножения вирусов в КЭ.
25. Титрование вирусов по ООЕ, БОЕ, ЦПД .
26. Титрование вирусов по ГАЕ, ЛД₅₀ .
27. Сущность РДП (РИД), методика постановки.
28. Сущность, методика постановки РЗГА .
29. Сущность, методика РНГА.
30. Прионы и вириды.
31. РН.
32. ИФА.
33. ПЦР.
34. РИФ.

ТЕМА №8

Лабораторная диагностика поксвирусных заболеваний, биопрепараты

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства поксвирусов, разобрать лабораторную диагностику заболеваний, биопрепараты.

Оборудование и материалы. Таблицы, электронный ресурс, образцы вакцин, лекарственные средства.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать лабораторную диагностику заболеваний. Познакомиться с образцами биопрепаратов, лекарственных средств. Зарисовать вирус КПД, окрашенный по Морозову.

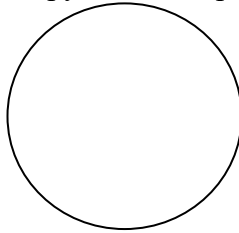


Рис. 10. Вирус КПД

Лабораторная диагностика оспы овец и коз по МУ №115-6а от 12.11.85 г.

Диагноз ставят по клиническим признакам, результатам вскрытия и лабораторному исследованию, используя материал:

- мазки из содержимого везикул больного животного и мазки-отпечатки с оспенных поражений кожи;
- содержимое везикул, папулы и пустулы, иссеченные вместе с субэпидермальной отечной тканью.

В лаборатории проводят:

- *вирусоскопию* по Морозову мазков-отпечатков из

папул, везикул, обнаруживают скопления вируса (тельца Пашена);

- гистологическое исследование содержимого везикул, папул и пустул;

- *биопробу* на ягнятах (в сомнительных случаях), когда материал, разведенный физраствором 1:20 – 1:200, втирают в верхнюю губу или вводят внутрикожно в подхвостовую складку, у зараженных возникают клинические признаки заболевания;

- *вирусологическое исследование*, когда 10%-ной суспензией материала заражают КЭ 11-12-дневного возраста, гибель в течение 5 суток с поражениями (плоские оспины) на ХАО, обнаруживают вирусы вирусоскопией по Морозову.

Биопрепараты: ▪ Вирусвакцина против оспы овец сухая культуральная из штамма НИСХИ, плановая вакцинация в местах распространения заболевания, напряженность иммунитета 12 месяцев;

- Шип Покс-ЛСД вак – лиофилизированная вирусвакцина штамм «НИСХИ» (КМЧЭВ- V140) , выращенного на перевиваемой культуре клеток «З-КГ» (гонады козы) или на «ЯДК-04» (яичники домашней козы), «ПО-2» (почка овцы);

- Каприс ПОКС-ЧМЖ против оспы овец и чумы мелких жвачных животных культуральная живая;

- Вирусвакцина против оспы овец из штамма «ФГУ ВНИИЗЖ» культуральная сухая.

Производители и разработчики вакцин ФГУ ВНИИЗЖ Владимир-Юрвец.

Специфических средств лечения нет.

Лабораторная диагностика оспы птиц по МУ от 1985 г., №115-6а

Диагноз ставят по клиническим признакам, результатам вскрытия и лабораторному исследованию, используя материал:

- клинический (соскобы экзантемы);
- патологический (слизистую гортани)

В лаборатории проводят:

- *вирусоскопию* мазков отпечатков клинического и патологического материала по Морозову, обнаруживают скопления вируса (тельца Борреля);

- *вирусологическое исследование*, когда 10%-ной суспензией материала заражают КЭ на ХАО или в аллонтаис., гибель КЭ в течение 6 дней, на ХАО очаги некроза, папулы, при микроскопировании обнаруживают скопления вируса;

- *биопроба (в случаях сомнительных результатов)* на 3-4 месячных цыплятах, 10%-ную суспензию втирают в скарифицированную кожу, на 5-6 день – экзантема, а при микроскопировании мазков-отпечатков - скопление вирусов;

Биопрепараты:

- Вакцина ВГНКИ сухая культуральная изштамма 3/7, выращенного на куриного вируса, которую вводят в перепонку крыла (производитель Оболенск)

- АВИВАК-ОСПА: аттенуированный штамм «К», выращенный на культуре клеток кожи КЭ (ВНИВИП СПб);

- Осповак- вакцина культуральная из штамма ВГНКИ 3/7, выращенного в культуре клеток КЭ (ФГУ Покровский био завод);

- Вакцина против оспы птиц из штамма «КЭМ-7» (ФГУ ВНИИЗЖ)

Для лечения выпаивают виркон-С, беттапан, аскорбиновую кислоту, энрофлон, тилан назначают с кормом.

Лабораторная диагностика контагиозного пустулезного дерматита по ГОСТ 25723-83

Диагноз ставят по клиническим признакам, результатам вскрытия и лабораторному исследованию, используя материал:

- клинический (соскобы пораженной кожи);
- патологический (кусочки мест пораженной).

В лаборатории проводят:

- *вирусоскопию* мазков-отпечатков, окрашенных по Морозову, обнаруживают вирусы – овалыные тельца;
- гистологическое исследование материала, окрашенного по Романовскому-Гимза, обнаруживают розовые тельца;
- электронная микроскопия изучаемого материала;
- вирусологическое исследование на первичных культурах клеток и перевиваемых «МЛ», через 48 часов обнаруживают вирус, идентифицируют р РН на культурах клеток;
- *биопробу* на котят, когда суспензию исследуемого материала 1:5, 1:10 втирают в скарифицированную кожу котят, возникает дерматит и гибель;

Биопрепараты: вакцина против контагиозной эктимы овец и коз из штамма МТМ-НИСХИ., разработчики НИИ проблем биологической безопасности КАМОН (Казахстан)

Для лечения применяют местно йод-глицерин, винилин, на кожу салициловую мазь, раствор бриллиантового зеленого, нутримышечно энрофлоксацин, тилозин, аскорбиновую кислоту.

Лабораторная диагностика миксоматоза кроликов по МУ от 08.05.1981 г., №116-6а

Диагноз ставят по клиническим признакам, результатам вскрытия и лабораторному исследованию, используя патологический материал (свежие трупы кроликов, содержимое опухолей) В лаборатории проводят:

- *Биопробу* на белых кроликах. Кроликам закапывают суспензию на конъюнктиву и вводят внутрикожно в дозе 0,1-0,2 мл, на 3-6 день – покраснение и отек.
- *Гистологическое исследование* патологического материала, готовят гистосрезы, окрашивают и обнаруживают «миксомные», злокачественные клетки, ацидофильные включения.

Биопрепараты:

▪ Вакцина против миксоматоза кроликов культуральная из штамма «В-82» сухая (Покровский био завод).

▪ Вакцина ассоциированная против миксоматоза и ВГБК сухая, изготовлена из штамма «В-82» вируса миксоматоза и из штамма «В-87» ВГБК, внутримышечно (Покровский био завод).

▪ Вакцина РАББИВАК-В в основе штамм «В-82» в культуре клеток почки крольчонка (Покровский био завод, 2018 г.).

Лечение мало эффективно.

Контрольные вопросы

1. Биопрепараты для профилактики поксвирусных заболеваний, заполнить таблицу.

Таблица 13 - Биопрепараты против поксвирусных заболеваний

№/№	Название заболевания	Название вакцины

ТЕМА №9

Лабораторная диагностика бешенства, биопрепараты

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства вируса бешенства, разобрать лабораторную диагностику заболевания, биопрепараты.

Оборудование и материалы. Труп мыши, вскрывочная доска, инструменты для вскрытия, краски по Соллерсу,

компоненты для РДП, мазки мозга погибших животных, микроскоп. Таблицы, электронный ресурс, образцы вакцин.

Задание для самостоятельной работы студентов.
Разобрать лабораторную диагностику заболеваний. Вскрыть погибшую мышь, взять материал для исследования, покрасить мазки по Соллерсу, поставить РДП. Познакомиться с образцами вакцин. Зарисовать результаты микроскопии.

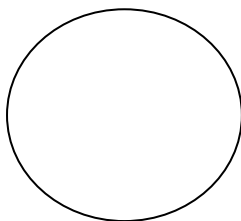


Рис. 11. Тельца Бабеша-Негри в мозге лисы.

Биологические свойства возбудителя бешенства

Возбудитель бешенства принадлежит к семейству *Rhabdoviridae*, в составе которого три рода:

- *Lyssavirus* (*lyssa* греч. бешенство, *rhabia* исп. бешенство);
- Везикуловирусы;
- *Ephemerovirus*.

Всего в составе семейства 60 видов. К роду *Lyssavirus* относят возбудитель бешенства, а также вирусы поражающие центральную нервную систему животных и человека:

- Лагос-Бат поражает летучих мышей;
- Мокола – человека и землероек;
- Дювенэйд – человека, летучих мышей;
- вирус острого энцефаломиелита человека;
- бешествоподобный вирус у грызунов;
- Котокан – циркулирует у крупного рогатого скота и комаров;

- Ободьян – у комаров;
- Флондрас – у грызунов.

Бешенство – острое инфекционное заболевание с поражением цнс. Болеют дикие плотоядные, грызуны, они поддерживают возбудителя в природе. Восприимчивы домашние плотоядные, человек, крс, мрс, лошади, свиньи.

На севере вирус циркулирует у песцов, в центральных районах – у лис, енотов, волков, грызунов, в Южной Америке у летучих мышей, в Африке у мангуст.

Источник заражения большие, способ заражения через укус или слюнявливание.

Бешенство безусловно смертельное заболевание, т.е. все заболевшие умирают. Вначале у больных появляются признаки энцефалита, протекает с повышением внутричерепного давления и косоглазием, появляются признаки нарушения психики: водобоязнь, агрессия, затем паралич глотки и слюнотечение, жажда, потом развивается миелит с парезом и параличом конечностей и гибель от паралича дыхательного центра.

Морфология и структура вируса. Относят к семейству Rhabdoviridae роду Lyssavirus. Сложноустроенный суперкапсид пулевидной формы с шипиками, капсид спиральной симметрии, геном одна нить РНК.

Культивирование:

- в КЭ при заражении в желточный мешок – гибель;
- КФ – гибель;
- первичных культурах клеток почек собак, хомяка - гибель;
- ВНК-21 (производственная культура) – гибель.

Биологические свойства. Накапливается в нервной ткани, вызывает энцефаломиелит и слюне. Агглютинирует эритроциты собак.

Антигенные свойства. Все выделенные штаммы в мире одинаковые, отличаются вирулентностью.

Устойчивость. Низкие температуры, фенол, эфир консервируют вирус. Гибнет мгновенно при + 70⁰ С, чувствителен к 1-5%-ному формальдегиду, 3-5%-ной соляной кислоте, 1%-ному перманганату калия, 10%-ной настойке йода.

Лабораторная диагностика бешенства по МУ(методическим указаниям) от 27.02.1970 г. и по ГОСТ 26675-2013.

***Лабораторная диагностика бешенства по МУ от
27.02.1970 г.***

Материал только патологический:

- труп мелких животных, обработать от блох;
- голова крупных животных с 2-мя шейными позвонками.

Материал упаковывают в целлофановые мешки, помещают в металлический ящик, на дно которого кладут влагопоглощающий материал с дезинфектантом (формалин).

В лаборатории черен вскрывают и готовят:

- из аммонова рога, мозжечка, коры полушарий, продолговатого мозга по 2 мазка для РИФ и по 2 мазка для окрашивания по Муромцеву или Соллерсу, или по Михину. У мелких животных готовят мазки из всего мозга;
- готовят пастообразную суспензию из разных отделов головного мозга.

В лаборатории проводят:

- *РИФ* с мазками из мозга, для РИФ выпускают флуоресцирующую антирабическую сыворотку, скопления вируса ярко блестят.

- *Микроскопию мазков*, окрашенных по Муромцеву, когда мазки фиксируют в смеси Никитфорова 1-2 часа, подогревают 50-60⁰ С -15-20 мин, ополаскивают, погружают в раствор метиленового синего 1:40 на 5-10 мин, затем в 5-10%-ный танин до голубого цвета, промывают, погружают в смесь спирта и ацетона. Скопления вируса – тельца Бабеша-Негри сиреневого цвета, ядра нейронов сини.

- *РДП* на предметных стеклах. В центральную лунку вносят пастообразную массу мозга погибшего животного, а в периферические – антирабическую сыворотку, в положительных случаях образуются серые полосы.

- *Биопробу* на мышатах. 10%-ной суспензией мозга с добавлением антибиотиков заражают трех мышат итрацеребрально по 0,03 мл, трех мышат подкожно в верхнюю губу по 0,1 -0,2 мл. Срок наблюдения 30 дней. На 7-10 день парезы, параличи, гибель. У погибших извлекают мозг, готовят мазки для РИФ или окрашивают по Муромцеву, обнаруживают скопления вируса. Биопробу можно провести на кроликах, когда двух кроликов заражают в мозг в дозе 0,2 и двух - внутримышечно в дозе 2 мл в области бедра. При положительном результате кролики заболевают в течение 16-21 дня и погибают, в мозге с помощью РИФ или микроскопическим методом обнаруживают скопления вируса бешенства.

- Гистологическое исследование, когда из аммонова рога, коры полушарий, мозжечка, продолговатого мозга готовят гистосрезы, фиксируют в ацетоне, красят по Ленцу или Туревичу. Обнаруживают скопления вируса.

Методы лабораторной диагностики бешенства по ГОСТ 26075-2013

Исследуют только патологический материал-мозг погибших животных. Используют методы:

- МФА с мазками отпечатками из патологического материала фиксируют, затем наносят флуоресцирующий глобулин. Вирус бешенства в виде желто-зеленых гранул.

- Вирусологическое исследование с выделением вируса в культуре клеток мышинной нейробластомы (ССЛК-131). Скопления вируса обнаруживают с помощью МФА.

- Биопробы на белых мышах путем интрацеребрального заражения, Вирус в мозге погибших обнаруживают с помощью МФА.

- ИФА с суспензией мозга.
- РДП суспензией мозга и образования серой полосы преципитации.

Биопрепараты: ▪ антирабическая живая жидкая вакцина АЗВИ для всех видов животных в неблагополучных местах;

▪ антирабическая инактивированная сухая культуральная вакцина из штамма «Щелково-51», для плотоядных вакцину разводят стерильной дистиллированной водой, сельскохозяйственных – РК АВ.

▪ антирабическая инактивированная вакцина сухая культуральная из штамма «Щелково-51» для собак и кошек «Рабикан»;

▪ антирабическая оральная вакцина из штамма «Рабивак/0333 для вакцинации диких плотоядных

▪ инактивированная вакцина «Рабикс» на основе штамма ERA-SB 20M против бешенства собак и песцовых животных, утверждена Россельхознадзором 31.10.2011г;

▪ инактивированная вакцина «Рабифел» на основе штамма ERA-SB 20M против бешенства кошек, утверждена Россельхознадзором 31.10.2011г.

▪ «Мультикан -8» для собак против 8 инфекционных заболеваний, включая бешенство, производитель «Ветбиохим».

Если был контакт домашнего животного с диким вакцину применяют подкожно по 2 мл собакам и по 5 мл крупным животным 3 дня подряд, через 16 дней повторяют одну инъекцию Лучше применять антирабическую вакцину АЗВИ или инактивированные. Покусы у животных обрабатывают настойкой йода, рваные раны перед наложением швов промывают 1%-ным перманганатом калия.

Применяют и иностранные вакцины:

▪ «Набивак Rhabiens» – против бешенства и лептоспироза собак производства Голландии;

- «Рабизин» - для всех видов животных производи-
тель фирма «Мерье» Франция.

Контрольные вопросы

1. Характеристика вируса бешенства.
2. Вирус болезни Ауески.
3. Вирус ИРТ.
4. Вирус ринопневмонии лошадей
5. Вирус ЗКЛ.

ТЕМА №10

Лабораторная диагностика герпесвирусных заболеваний

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства герпесвирусов, разобрать лабораторную диагностику герпесвирусных заболеваний млекопитающих и птиц, биопрепараты.

Оборудование и материалы. Диагностикумы для РЗГА, РНГА, сыворотки крови лошадей, свиней, образцы вакцин, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать лабораторную диагностику заболеваний млекопитающих. Поставить РЗГА с сывороткой крови лошадей, РНГА с сывороткой крови свиней. Познакомиться с образцами вакцин. Зарисовать результаты реакций

Рис 12. Результат РЗГА

Рис. 13. Результат РНГА

Лабораторная диагностика ринопневмонии лошадей по МУ от 28.07.80 г.

Проводят обязательно при массовой пневмонии жеребят, мертворожденных у кобыл. Материал:

- мертворожденный, берут кусочки легких, селезенки, тимус, печени, готовят 10%-ную суспензию, с экстрактом ставят РГА с эритроцитами петуха или морской свинки, если результат положительный проводят вирусологическое исследование);

- сыворотка крови, носовая слизь кобыл.

В лаборатории проводят:

- *Вирусологическое исследование.* Заражают культуры клеток (МЛ, РК-15), вирус обнаруживают по ЦПД: лизис, бляшки. Ставят капельную РГА с культуральной жидкостью, вирус идентифицируют в РЗГА (РТГА) или РТГАд (реакции торможения гемадсорбции). Можно идентифицировать вирус в МФА или в РН, титр выделенного вируса должен быть не менее 10^{-2} ЦПД₅₀/мл.

- *Серологическое исследование* с сывороткой крови. ставят РЗГА (РТГА) или РН. Серологическое исследование кобыл на носительство вируса ринопневмонии плановое, а также подлежат исследованию лошади при покупке и транспортировке с территории РФ.

Биопрепараты: ▪ вирусвакцина против ринопневмонии лошадей сухая культуральная – «СВ/69», разработчик вакцины профессор К.П. Юров. (Щелковский биокомбинат);

- пневмекин – поверхностные гликопротеины инактивированного герпесвируса (штамм «Kentucky») с добавлением парафинового масла, жирных кислот (Meriel, Франция)

Лечение. Применяют АБП, иммуномодуляторы.

Лабораторная диагностика болезни Ауески по ГОСТ 25753-83

Для установления диагноза проводят лабораторное исследование. Материал:

- патологический (головной мозг, кусочки селезенки, печени, лимфоузлы);
- клинический (сыворотка крови больных, переболевших).

В лаборатории проводят:

- Биопробу, когда 10%-ной суспензией головного мозга, органов заражают кролика или котенка подкожно, внутримышечно. Гибель от энцефалита, зуд в месте заражения.

- Вирусологическое исследование, суспензией патологического материала заражают культуру клеток (РК-15, ВНК-21), на 4-5 день ЦПД 6 округлые клетки, симпласты, синтиции. Идентифицируют вирус в РН на культурах клеток.

- РНГА с сывороткой крови больных, подозреваемых. Положительный титр 1:32 и выше.

- ИФА с сывороткой крови обследуемых.

Биопрепараты: ▪ сухая культуральная вирусвакцина «ВГНКИ» против болезни Ауески из авирулентного штамма «ВГНКИ», полученного в культуре клеток развивающихся КЭ, применяют для плановой профилактики у поросят с 14-дневного возраста, крс, мрс (Ставропольская биофабрика);

- вакцина инактивированная против репродуктивно-респираторного синдрома, болезни Ауески, парвовирусной болезни, лептоспироза свиней, (производители ООО Ветбиохим, ООО Нарвак);

- вакцина против болезни Ауески и рожи свиней инактивированная, гидроокисьалюминиевая (ООО Ветбиохим);

- Вакцина Ингеловак Ауески MLV живая сухая из мо-

дифицированного штамма «Vartha K-61» с растворителем, применяют с 3-дневного возраста пороссятам (Германия);

- Акипор 6.3 – вакцина против болезни Ауески с растворителем (Merial Франция);

- глобулин против болезни Ауески – полиглобулиновая фракция гипериммунной сыворотки. Применяют для лечения двукратно, понижает титр вируса в организме. Препарат применяют и для профилактики в условиях высокого риска заражения.

Лечение. Кроме специфического средства – глобулина, назначают симптоматическое лечение: диуретики, иммуномодуляторы (аскорбиновую кислоту, гентамицин), обезболивающие средства (анальгин, димедрол).

Лабораторная диагностика инфекционного ринотрахеита по ГОСТ 25755-91

Чтобы точно определить заболевание необходимо лабораторное исследование. Материал:

- клинический (сыворотка крови больных, носовые выделения);

- патологический (кусочки внутренних органов, трахея, легкие), готовят 10%-ную суспензию.

В лаборатории проводят:

- *Вирусологическое исследование:* заражают МДВК, ПТ-80 обнаруживают через 48-96 часов ЦПД (включения в ядрах клеток, округлые клетки), идентифицируют в РН.

- метод ДНК-зондов;

- МФА, обнаруживают скопления вирусов в мазках или в гистосреззах;

- РН с сывороткой крови;

- ИФА с сывороткой крови.

- РНГА с сывороткой крови и эритроцитарным антигеном.

Биопрепараты:

- вакцина против ИРТ крс и ПГ-3 сухая, культуральная ассоциированная (Ставропольская биофабрика)
- вакцина против ПГ-3, ИРТ, ВД-БС эмульсионная, инактивированная (ФГУ ВНИИЗЖ г Владимир);
- вакцина ассоциированная против ИРТ и ПГ-3, коронавирусной инфекции крс эмульсионная инактивированная (ФГУ ВНИИЗЖ г Владимир);
- вакцина «Комбовак-Р» - инактивированная ассоциированная против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС, РС-инфекции крс и пастереллеза (вакцинируют коров-матерей) производитель ООО «Ветбиохим», ООО «Нарвак» Москва;
- сыворотка против сальмонеллеза, пастереллеза, ИРТ, ПГ-3 (Армавирская биофабрика)
- интерферон бычий рекомбинантный (ИБР), производитель Беларусь, «Белагроген»

Лечение. Животных лечат, применяя АБП, аскорбиновую кислоту, гипериммунную сыворотку. Основная тактика лечения – не допустить развитие пневмонии.

Лабораторная диагностика злокачественной катаральной лихорадки по МУ от 12.11.1985 г.

Заболевание регистрируют у северных оленей и у крс в Африке.

Материал для исследований:

- клинический – сыворотка крови больных, сгусток крови;
- патологический (кусочки селезенки, печени, лимфоузлы, готовят 10%-ную суспензию)

В лаборатории проводят:

- *Биопробу* на морской свинке, котенке, кролике. Заболевание возникает через 3 недели и заканчивается гибелью животного.

- *Вирусологическое исследование*, когда экстрактом сгустка крови, суспензией патологического материала заражают первичные культуры клеток, на 5-9 день ЦПД, включения – «тельца Коудри», синтиции, вирус идентифицируют в РСК, определяя серотип возбудителя.

- *РСК* с сывороткой крови обследуемых, положительный титр 1:8.

Биопрепараты. Отечественных вакцин нет, производят в ЮАР.

Лечение. Применяют АБП, иммуномодуляторы.

Лабораторная диагностика болезни Марека по ГОСТ 25586-83

Диагноз ставят по результатам вскрытия:

- у молодняка воспаление бедренного, седалищного нерва, энцефалит;

- у взрослых кур опухоли во внутренних органах: яичниках, яйцепроводах, печени, легких, гиперплазия перьевых фолликул.

Лабораторное исследование проводят, чтобы дифференцировать болезнь Марека от лейкоза. Материал:

- внутренние органы, пораженные опухолями, готовят 10%-ную суспензию;

- сыворотка или плазма крови убойных кур.

В лаборатории проводят:

- *Биопробу* на суточных цыплятах, заражают внутримышечно, через 4-6 недель признаки заболевания: невриты, опухоли во внутренних органах.

- *Биопробу* на КЭ. Заражают 11-12-дневные эмбрионы на ХАО или 5-6-дневные КЭ в желточный мешок. КЭ погибают, обнаруживают на ХАО пузырьки, папулы, у зародыша увеличение селезенки, опухоли в печени.

- *РИФ мазков-отпечатков* из пораженных перьевых фолликул.

- РДП с сывороткой убойных кур.

Биопрепараты:

- вирус-вакцина «Риспенс CVI -988», живая замороженная из полевого штамма CVI-988 выращенного на КФ с добавлением сыворотки крс и криопротектора (ДМСО) (производство Голландия или Merial Франция), применяют внутримышечно;

- АВИВАК-Марек вакцина из штамма «ФС-126» герпеса индеек, дезинтегрированного ультразвуком (ВНИВИП);

- АВИВАК – Марек-3 в основе аттенуированные штаммы вирусов болезни Марека, герпеса кур, герпеса индеек (ВНИВИП);

- вирусвакцина против болезни Марека «Марекбройлер» в основе дезинтегрированный штамм «Владимир» (ФГУ ВНИИЗЖ);

- Рисмавак+ СА-126 – вакцина живая, замороженная (Нобилис)

Лечение бесперспективно, выбраковка. Плановая вакцинация в суточном возрасте у цыплят яичных кроссов.

Лабораторная диагностика инфекционного ларинготрахеита птиц (ИЛТ) по ГОСТ 25582-83

Лабораторное исследование необходимо для постановки диагноза. Материал:

- патологический: слизистая гортани, трахеи, легкие фибриновые пробки, готовят 10%-ную суспензию;

- клинический: сыворотка крови больных кур в объеме 5 мл.

В лаборатории проводят:

- *Вирусологическое исследование*, заражают КЭ на ХАО, на 4-6 день охлаждают, вскрывают, обнаруживают узелки на ХАО. Из узелков готовят гистосрезы, окраши-

вают, обнаруживают включения на половину или 2/3 ядра клетки. Идентифицируют в РН или МФА;

- *Биопроба на цыплятах* 30-90-дневного возраста суспензию втирают в клоаку, вводят в трахею возникает заболевание;

- МФА мазков - отпечатков;

- РН на КЭ с сывороткой крови и экстрактом пораженной ХАО.

Биопрепараты применяют для плановой вакцинации:

- Вирусвакцина сухая против ИЛТ из штамма ВНИИБП (Покровский биозавод);

- АВИВАК-ИЛТ эмбрион-вакцина против ИЛТ (ВНИВИП);

- вакцина против ИЛТ живая сухая (Нобилис).

Лечение. Применяют АБП (энрофлон, тилан, Тим-тил, Бровафом), аскорбиновую кислоту.

Контрольные вопросы

1. Биопрепараты для профилактики герпесвирусных заболеваний, заполнить таблицу.

Таблица 14 - Биопрепараты против поксвирусных заболеваний

№/№	Название заболевания	Название вакцины

ТЕМА №11

Характеристика аденовирусов

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства аденовирусов, разобрать лабораторную диагностику аденовирусных заболеваний, биопрепараты.

Оборудование и материалы. Образцы вакцин, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов

Познакомиться с образцами вакцин и препаратов для лечения.

Семейство Adenoviridae

В составе семейства возбудители болезней млекопитающих, человека, птиц. Название семейство получило от греческого aden – железа, т.к. впервые вирусы были выделены в 1953 году Роу из аденоидов (доброкачественных опухолей слизистой носа) у детей.

В составе семейства два рода:

- Mastadenovirus – вирусы этого рода вызывают аденовирусную инфекцию крс (АВИ крс), вирусный гепатит собак, аденовироз собак, у человека вызывают ОРВИ с поражением нижних дыхательных путей у детей;

- Avidenovirus – циркулируют у птиц, возбудитель ССЯ- синдрома снижения яйценоскости.

Все вирусы просто устроены. Капсид двадцатигранник, в составе 252 капсомера, тип симметрии капсида кубический, геном двунитчатая ДНК, окруженная белком (сердцевина) Диаметр вирионов 70-80 нм.

Репродукция в ядрах клеток. Вирусы характеризуются низкой урожайностью, клетку покидают максимум 1 миллион вирионов, поэтому трудно выделить. Аденовирусы в культурах клеток могут трансформировать их в злокачественные.

Возбудитель аденовирусной инфекции крс

Острое инфекционное заболевание телят от 10 дней до 4-ех месяцев (чаще болеют телята от 2 до 4 месяцев) с энтеритом (диарея), вирусемией (3:21 40-41⁰ С) и тяжелой пневмонией. Гибель маленьких телят за 3 дня.

Источник: больные и носители-взрослые животные. Способ заражения : алиментарный, аэрогенный.

Вирус впервые выделен Клейном в 1959 г. в США.

Морфологические свойства. Относят к роду Mastadenovirus, двадцатигранник, диаметр 70-80 нм. Различают два морфологических типа вируса: один образует в ядрах клеток крупные фиолетовые включения, другой – мелкие розовые.

Культивирование. Плохо культивируются:

- в первичных культурах клеток почек , легких телят;
- перевиваемых культурах клеток , Т₁ , образуют ЦПД через 24-48 часов: округлые клетки, включения в ядрах (фиолетовые или розовые), лизис клеток – пустоты, напоминают соты;
- в организме телят. После заражения летальность 60%;
- вирусы только третьего серотипа образуют опухоли у хомячков через 24-67 дней после заражения.

Биологические свойства. Вирусы проникают через слизистые. Репродукция в эпителиальных клетках конъюнктивы, слизистой носа, гортани, ЖКТ – возникает воспаление. Циркулирует в крови (высокая температура), накапливается в легких – пневмония. Воспаление ЖКТ проявляется гастроэнтеритом (в основном повреждается тонкий

отдел кишечника). Выделяется с фекалием, выдыхаемым воздухом. Вирус агглютинирует эритроциты белых крыс.

Антигенные свойства. Вирус содержит 3 антигенные субстанции. Известно 10 серотипов, все циркулируют.

Устойчивость. В окружающей среде +4⁰ -90 дней, +20-22⁰ С -1-4 месяца, +36⁰ – 60 дней. УФЛ – 1 час. Быстро инактивируется 0,1-0,3%-ным формальдегидом, 1%-ным NaOH.

*Лабораторная диагностика аденовирусной
инфекции крс МУ от 25.07 1978г б/н, МУ
для постановки ИФА*

Материал:

- патологический: легкие, сгустки крови, сердце, готовят экстракт 10%-ной суспензии;

- клинический: сыворотка крови, экстракт фекалия. В лаборатории проводят:

- вирусологическое исследование. Заражают культуру клеток ТБ, Т1 экстрактом патологического материала, обнаруживают вирус по ЦПД - округлые клетки, включения, «соты» - пустоты в культуре клеток, идентифицируют вирус в РСК;

- серологическое исследование с сывороткой крови ставят РСК, с экстрактом патологического материала РСК, мазки-отпечатки патологического материала исследуют в РИФ;

- с экстрактом фекалий – ИФА.

Биопрепараты:

- вакцина «Комбовак А» - инактивированная ассоциированная против ИРТ, ПГ-3, АВИ, РС-инфекции крс ВД БС (вакцинируют коров-матерей) производитель ООО «Ветбиохим», ООО «Нарвак» Москва;

- Иммуносерум – сыворотка для профилактики пневмоэнтеритов (Ставропольская биофабрика)

- гипериммунная сыворотка против ПГ-3, ИРТ, АВИ и хламидиоза крс вирусная биофабрика).

Для лечения применяют аминогликозиды, тетрациклин 2 раза в сутки, доксициклин внутривенно, тилозин – 1 раз в сутки, нитокс – раз в 3 дня. Применяют индукторы интерферона (аскорбиновую кислоту, риботан). Если есть признаки обезвоживания, применяют внутривенно раствор Рингера. Внутрь – нитрофурановые препараты.

Возбудители аденовирусной инфекции собак

Вызывают аденовирусы из рода Mastadenovirus. Клинически аденовирусная инфекция проявляется:

- вирусным гепатитом протекает с высокой температурой, рвотой (от воспаления миндалин), диареей или запором, конъюнктивитом, который без лечения переходит в кератит, заболевание протекает 2-3 недели, возбудитель вирус САV-1;

- аденовирозом с ринитом, ларингитом, трахеитом, длительное воспаление дыхательных путей приводит к пневмонии, возбудитель САV-2.

У старых собак -1 может персистировать и они сильно худеют. САV-1 у лисиц вызывает энцефалит. Заболевание впервые описал Руборт в 1947 г.

Источники инфекции больные переболевшие, старые собаки. Очень чувствительны щенки до года. Способ заражения-алиментарный.

Морфологические свойства. Вирусы одинаковые: капсид 20-гранник, 70-90 нм, САV-1 образует палочковидные скопления. Геном – двунитчатая ДНК, окруженная белком.

Культирование ▪ в первичных культурах клеток щенков;

- перевиваемых культурах МДСК образует ЦПД: округлые клетки, включения розового цвета в ядрах клеток - тельца Руборта, конгломераты клеток;

▪ в организме морских свинок при внутрибрюшинном заражении – гибель от пневмонии.

Биологические свойства. Проникает через слизистые оболочки. Репродукция в эпителиоцитах органов пищеварения, дыхательных путей, циркулирует в крови, накапливается в печени, репродукция в гепатоцитах и эпителиоцитах желчного пузыря, вызывает воспаление - холецистит, гепатит. Репродукция вируса в конъюнктиве вызывает воспаление, которое углубляется и поражает роговицу.

Вирус выделяется с фекалиями, слезами. Вирус агглютинирует эритроциты морской свинки, петуха, человека (1 группы крови).

Антигенные свойства. СAV-1 и СAV-2 отличаются антигенными свойствами.

Устойчивость. +22⁰ С – 4 месяца. Чувствительны к дезинфектантам, к перекиси водорода.

Лабораторная диагностика вирусного гепатита собак

Материал:

- патологический (асцитическая жидкость, кусочки печени), готовят гистосрезы, 10%-ный экстракт;
- клинический (сыворотка крови).

В лаборатории проводят:

- патогистологическое исследование печени, обнаруживают тельца Руборта (розовые включения);
- ИФА с экстрактом патологического материала, учет визуальный – ведущее исследование по Наставлению по применению набора для выявления антигенов аденовирусов плотоядных ИФА, 2002г.;
- РДП, РСК с сывороткой крови.

Биопрепараты:

- применяют ассоциированные вакцины Мультикан, Гексаконивак, Депентовак;
- гипериммунная сыворотка Гискан-5.
- поливалентный глобулин Глобкан -5

Для лечения применяют: гипериммунную сыворотку Гискан-5, Глобкан -5, гепатопротекторы (эссенциалефорте) внутривенно, Витамины В₁, В₆, В₁₂, риботан, противорвотные, антибактериальные препараты.

Вирус синдрома снижения яйценоскости

Синдром снижения яйценоскости-аденовирусная болезнь кур с признаками:

- снижения яйценоскости на 30-% в течение 5-6 недель, у кур клеточного содержания яйценоскость восстанавливается, у напольников-никогда;
- размягчение, депигментация, деформирование скорлупы с водянистым белком в течение 2-3 недель;
- гангренозного дерматита и гибелью цыплят-бройлеров.

Заболевание впервые описано в Голландии в 1976 году и получило название Egg drop syndrome EDS-76 (международное название, в СССР - ССЯ).

Источник больная птица, утки носители вируса, но не болеют.

Способ заражения: алиментарный, контактный, трансовариальный (птица несет яйцо, содержащее вирус)

Морфологические свойства. Вирус принадлежит к роду Avidenovirus. Вирионы двадцатигранники, 70-90 нм. Геном двунигчатая ДНК, окруженная белком.

Культивирование: ▪ утиные эмбрионы при заражении в аллантоис, гибель в течение 3-5 суток;

- утиные фибробласты, ЦПД через 48 часов, обнаруживают округлые клетки;
- КЭ и КФ после адаптирования.

Биологические свойства. После проникновения в организм кур вирус длительное время находится в латентном состоянии, а клинически проявляется после половой зре-

лости. Репродукция в эпителиоцитах слизистой трахеи, яйцепроводах, клоаке. В яйцепроводах возникает воспаление и непроходимость (птица перестает нестись), которая может привести к гибели кур от желточного перитонита, когда яйцеклетки выходят в брюшную полость. Вирус агглютинирует эритроциты кур, уток, гусей.

Антигенные свойства. Вирус выделенный в разных странах одинаковый. Имеет антигены общие с другими аденовирусами.

Устойчивость. Чувствителен к дезинфектантам, для обеззараживания яиц используют формальдегид.

***Лабораторная диагностика синдрома снижения
яйценоскости ССЯ по инструкции для применения
набора в РТГА 2006г. и МУ по лабдиагностике методом
ИФА 1990 г.***

Материал:

- сыворотка крови от кур при снижении яичной продуктивности, появлению яиц с депигментированной и декальцинированной скорлупой

В лаборатории проводят:

- РТГА (РЗГА) с сывороткой крови кур;
- ИФА с сывороткой крови кур;

Биопрепараты:

- вакцина инактивированная ассоциированная эмульгированная противи НБ, ИБК, ССЯ (Покров);
- ассоциированная инактивированная эмульгированная вакцина против НБ, ИБК, ССЯ («Авивак»);
- инактивированная эмульгированная вакцина против ССЯ- «Нобилис»;

При деформации, депигментации и декальцинации скорлупы проводят лечение нарушения минерального обмена, если устанавливают ССЯ - выбраковка всего поголовья объекта.

Контрольные вопросы

1. Характеристика семейства парамиксовирусов.
2. Вирус ПГ-3.
3. Вирус РС-инфекции крс.
4. Вирус чумы плотоядных.

ТЕМА №12

Лабораторная диагностика парамиксовирусных заболеваний. Вирус болезни Ньюкасла

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства парамиксовирусов, разобрать лабораторную диагностику парамиксовирусных заболеваний млекопитающих, биопрепараты.

Оборудование и материалы. Компоненты для РЗГА и диагностики ПГ-3, сыворотки крови обследуемых телят, образцы вакцин, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать лабораторную диагностику парамиксовирусных заболеваний млекопитающих. Поставить РЗГА с сыворотками крови телят. Познакомиться с образцами вакцин. Зарисовать результаты реакции

***Лабораторная диагностика паратифа – 3 (ПГ-3)
по Временному МУ 17.10.1985г. Приказ МСХ РФ от
17.06. 2019 №334 «Об утверждении Ветеринарных
правил осуществления профилактических,
диагностических, лечебных, ограничительных и иных
мероприятий»***

Материал для исследований:

▪ патологический: трахея, легкие, лимфоузлы, готовят мазки-отпечатки, 10%-ную суспензию;

▪ клинический: парные сыворотки крови.

В лаборатории проводят:

● *РИФ* с мазками отпечатками, скопления вируса ярко блестят.

● *Вирусологическое исследование*, которое включает заражением экстрактом патологического материала МДВК, ВНК-21, вирус обнаруживают по ЦПД (синтиции, вакуоли), идентифицируют в РИФ, РЗГА (РТГА), ПЦР

● Серологическое исследование парных сывороток крови в РТГА, ИФА

Биопрепараты: ▪ вакцина «Паравак», применяют интраназально;

▪ ассоциированная вакцина против ПГ-3, ИРТ, ВД-БС эмульсионная инактивированная (ФГУ ВНИИЗЖ Владимир);

▪ ассоциированная вакцина против ПГ-3 и ИРТ сухая культуральная, в настоящее время ведущая (Ставропольская биофабрика);

▪ ассоциированная вакцина против ПГ-3, ИРТ и хламидиоза (Ставропольская биофабрика);

▪ вакцина «Комбовак -А,Р» ▪ вакцина «Комбовак-Р» - инактивированная ассоциированная против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС, РС-инфекции крс и пастереллеза (вакцинируют коров-матерей) производитель ООО «Ветбиохим», ООО «Нарвак» Москва;

- сыворотка против сальмонеллеза, пастереллеза, ИРТ, ПГ-3 (Армавирская биофабрика);
- интерферон бычий рекомбинантный (ИБР), производитель Беларусь, «Белагроген».

Лечение. Применяют АБП, иммуномодуляторы.

Лабораторная диагностика РС – инфекции (респираторно-синтициальной инфекции) по Временному МУ 17.10.1985г, Наставлению по применению набора диагностикумов от 26.09 1996г

Лабораторное исследование проводят обязательно при тяжелой массовой пневмонии у телят. Материал:

- патологический: трахея, легкие, лимфоузлы, готовят мазки-отпечатки, 10%-ную суспензию;
- клинический: парные сыворотка крови.

В лаборатории проводят:

- *РИФ* с мазками отпечатками, скопления вируса ярко блестят.

- *Вирусологическое исследование*, которое включает заражением экстрактом патологического материала Гаурус-1, вирус обнаруживают по ЦПД (зернистые, сморщенные клетки, включения, синтиции), идентифицируют в РИФ, РДП, РСК.

- *РДП* с экстрактом патологического материала.

- *РДП, РНГА* с сыворотками крови обследуемых животных, диагностический титр в РНГА 1:32 и больше.

Биопрепараты:

- вакцина «Комбовак» против ПГ-3, ИРТ, вирусной диареи, РС-инфекции, рота-, коронавирусной диареи телят, вакцинируют коров-матерей перед отелом. Производитель вакцины ООО «Ветбиохим», ООО «Нарвак» Москва;

Лечение. Применяют АБП, иммуномодуляторы.

***Лабораторная диагностика чумы плотоядных
(чумы собак, болезни Каре). Временное наставление по
применению набора для выявления антигена чумы
плотоядных ИФА 14.05.1998г.***

Лабораторное исследование проводят, чтобы дифференцировать заболевание от бешенства. Материал:

- патологический: головной мозг, готовят 10%-ную суспензию;

С экстрактом суспензии мозга проводят:

- ПЦР.

- ИФА.

- Вирусологическое исследование затруднено, заражают первичные культуры клеток почек, легких щенков, или МДВС, Vero, обнаруживают по ППД (синтиции), идентифицируют в ПЦР, ИФА.

Биопрепараты. В РФ предложены три вакцинных штамма вируса чумы плотоядных: 668-КФ; «Вакчум», ЭПМ. Для плановой профилактики применяют ассоциированные вакцины:

- «Мультикан» -1,-2, -4, -6, -7, -8 (ООО «Нарвак»);

- «Депентовак» против бешенства, чумы плотоядных, инфекционного гепатита, аденовируса, лептоспироза («Ветзвероцентр» Красноармейск, Московская область;

- «Гексаканивак» против ЧП, вирусного гепатита, Аденовируса, парвовирусного энтерита, коронавирусного энтерита, лептоспироза («Ветзвероцентр» Красноармейск, Московская обл.);

- «Гексадог» против чумы плотоядных, аденовирусов, парвовирусов, бешенства, лептоспироза («Мериал» Франция).

Перечисленные отечественные вакцины на основе штамма ЭПМ.

Для профилактики и лечения используют:

- сыворотку «Гискан-5», полученную гипериммуниза-

цией лошадей против вирусов ЧП, адено-, парво-, корона вирусов (Ветбиохим», Москва);

- поливалентный глобулин «Глобкан-5». против вирусов ЧП, адено-, парво-, корона вирусов (Ветбиохим», Москва);

Лечение. Длительная вирусемия приводит к поражению спинного и головного мозга, энцефалит – смертельный. Для лечения применяют:

- гипериммунную сыворотку «Гискан-5» или поливалентный глобулин «Глобкан-5»;
- противовирусный препарат – фоспренил;
- иммуномодуляторы – аскорбиновую кислоту, в повышенных дозах;
- антибиотики - гентамицин или ЦС-группу;
- диуретики – поляризирующую смесь с K^+ , Mg^{++} и глюкозой в вену, подколоть лазикс.

Возбудитель болезни Ньюкасла (НБ)

Характеристика болезни Ньюкасла (НБ). Высококонтагиозное остропротекающее заболевание птиц отряда куриных с поражением органов дыхания (ларенготрахеит), пищеварения (гастроэнтероколит), нервной системы (энцефалит, отек мозга). У молодняка гибель 100%, у взрослых-25%, переболевшие носители возбудителя пожизненно.

Впервые описано на острове Ява и в Великобритании в окрестностях Ньюкасла в 1926 году. Кранвельд в 1927 году доказал вирусную природу заболевания.

Очень восприимчив молодняк кур, индеек, фазанов, цесарок. Источник: больные, переболевшие. Способ заражения алиментарный, аэрогенный, трансмиссивный, после нападения клещей.

Морфологические свойства. Вирус семейства Paramyxoviridae, подсемейства Paramyxovirinae, род Rubulovirus. Суперкапсид овальной формы с шипиками, d 120-300нм. В составе суперкапсида Н (гемагглютинин) и N (нейрамида-

за), капсид спиральной симметрии, геном – нить РНК, окруженная белком.

Культивирование:

- КЭ при любом способе заражения, гибель после 24 часов, в течении 8 суток;
- КФ в течение 48 часов образует ЦПД: округлые клетки, бляшки;
 - в перевиваемых культурах клеток (СПЭВ, и др.), образует ЦПД;
 - в организме 30-дневных цыплят, гибель в течение 4-6 дней.

Биологические свойства. Вирус размножается в эпителиальных клетках органов дыхания, пищеварения, циркулирует в крови, накапливается в паренхиматозных органах, центральной нервной системе. В местах скопления вызывает воспаление. Агглютинирует эритроциты птиц, человека, морской свинки, мышей.

Известно три типа штаммов возбудителя по вирулентности: вирулентные – везикулярные, мезогенные – только для молодняка, лентогенные вызывают легкое переболевание у цыплят. Больные очень заразные, выделяют вирус с пометом, выдыхаемым воздухом, истечениями из клюва.

Антигенные свойства. Все штаммы в мире одинаковые. Вирус содержит два антигена V и A.

Устойчивость. При -20°C сохраняется 2 года, при $+20^{\circ}\text{C}$ – 6 часов, $+56^{\circ}\text{C}$ 1 час. Дезинфектанты: 1-2% формалин, щелочи, 3-4% фенол уничтожают вирус за несколько минут.

Лабораторная диагностика по ГОСТ 25586-83

Материал:

- патологический, трупы вскрывают, берут 2-3 г трахеи, легких, селезенки, костного, головного мозга, измельчают в 2-3 мл физраствора, добавляют антибиотик (гентамицин), центрифугируют, надосадочную жидкость используют;

- сыворотка (плазма) крови больных, вакцинированных.

В лаборатории проводят:

- *Вирусологическое исследование*: заражают 9-11-дневных КЭ в аллантоис, погибших вскрывают, ставят РГА с эритроцитами петуха, идентифицируют в РЗГА.

- *РН* с экстрактом патологического материала на КЭ с разными разведениями вируса, определяют индекс нейтрализации, 10 и больше.

- *Биопроба* на 30-дневных цыплятах, когда их заражают экстрактом патологического материала внутримышечно, гибель через 4-6 дней.

- *РЗГА* с сывороткой крови больных, вакцинированных, диагностический титр 1:16 и больше.

Биопрепараты. Плановая вакцинация повсеместно, применяют вакцины:

- праймер-свакцина против НБ из штамма В₁ применяют суточным цыплятам в неблагополучных местах аэрозольно (Покровский био завод);

- вирусвакцина из штамма Ла-Сота сухая применяют с 10-14- дневного возраста выпаиванием, эту вакцину используют повсеместно (ФГУ ВНИИЗЖ, Владимир, Покровский био завод);

- вирусвакцина из штамма Н сухая для взрослых кур внутримышечно (Ставропольская биофабрика);

- живая вакцина АВИВАК-НБ из штаммов «Бор-74», «Ла-Сота», «В₁» выпаиванием взрослой птице и молодняку (АВИВАК СПб);

- вакцина против НБ инактивированная эмульгированная, ее используют внутримышечно в индосекторе при вспышке заболевания (ФГУ ВНИИЗЖ, Владимир);

- ассоциированная инактивированная эмульгированная вакцина против НБ, ИБК, ССЯ для кур внутримышечно (Покровский био завод);

- вакцина АВИВАК против НБ и ИБК в составе

штаммы (Ласота, В₁, Бор-74 ВГНКИ, Н-120, Н-52) (АВИ-ВАК, СПб).

За напряженностью иммунитета следят, после вакцинации, спустя 10-14 дней берут кровь, определяют титры антител в РЗГА, 1:8 и больше. Если титры антител не обнаружены, вакцинацию повторяют.

Средств лечения нет, убой, сжигание или тушки перерабатывают на консервы в условиях птицеводства.

Контрольные вопросы

Коллоквиум №2 по разделу покс-, герпес-, адено-, ПМВ-вирусы, возбудитель бешенства

1. Характеристика семейства поксвирусов.
2. Возбудитель оспы овец.
3. Возбудитель оспы птиц.
4. Возбудитель миксоматоза кроликов.
5. Возбудитель КЖД
6. Характеристика семейства герпесвирусов.
7. Вирус болезни Ауески.
8. Вирус ИРТ.
9. Вирус ринопневмонии лошадей.
10. Вирус ЗКЛ.
11. Вирус болезни Марека.
12. Вирус ИЛТ.
13. Возбудитель бешенства.
14. Характеристика семейства парамиксовирусов.
15. Вирус ПГ-3.
16. Вирус РС-инфекции.
17. Вирус ЧП.
18. Вирус НБ.
19. Возбудитель аденовирусной инфекции крс.
20. Возбудитель аденовирусной инфекции собак.
21. Вирус ССЯ.
22. Семейство аденовирусов.

ТЕМА № 13

Лабораторная диагностика гриппа животных, биопрепараты

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства вирусов гриппа животных, разобрать лабораторную диагностику гриппа, биопрепараты. Коллоквиум по разделу «Возбудители покс-, герпес-, адено-вирусных заболеваний».

Оборудование и материалы. Сыворотки крови кур, эритроциты кур, вирусный антиген, плексигласовые пластины, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать лабораторную диагностику гриппа млекопитающих и птиц. Поставить РТГА с плазмой (сывороткой кур) кур. Познакомиться с образцами вакцин. Зарисовать результаты реакций

Рис. 16

Лабораторная диагностика гриппа кур по ГОСТ 25581-91. Инструкция по применению набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц от 22.06.2008г.

Инструкция по применению тест-системы для обнаружения вируса гриппа А методом ПЦ от 21.05.2009 г.

Проводят обязательно, материал :

▪ патологический: трахея, селезенка, легкие, головной и костный мозг, готовят 10%-ную суспензию;

- клинический сыворотка (плазма) больных кур.

В лаборатории проводят:

- *Вирусологическое исследование.* Заражают КЭ в аллантоис, амнион, гибель в течение 24-48 часов, обнаруживают вирус в капельной РГА, идентифицируют до субтипа с помощью РТГА;

- *РТГА.* Ищут Ig распространенных субтипов, в первую очередь исключают А-Н₅ N₁, А-Н₅ N₂, А-Н₇ N₇;

- *ИФА* для выявления специфических Ig против субтипа А у обследованных;

- ПЦР для обнаружения вируса субтипа А.

Биопрепараты:

- вакцина против грипп в птиц субтипа Н₅ N₁ инактивированная эмульгированная (Покровский биоизавод);

- вакцина против гриппа птиц и НБ инактивированная эмульсионная ФГУ ВНИИЖЗ, Владимир)

- ФЛУ Протект Н₅ – вакцина против гриппа птиц инактивированная эмульгированная (ФКП Ставропольская биофабрика);

- Вакцина инактивированная бивалентная против высокопатогенного гриппа птиц субтипов Н₁ – Н₅ (СПб)

Лабораторная диагностика гриппа уток по ГОСТ 25581-91 Инструкция по применению набора для выявления антител к вирусу гриппа птиц от 22.06.2008г.

Инструкция по применению тест-системы для обнаружения вируса гриппа А методом ПЦ от 21.05.2009г.

Материал для исследований:

- патологический: трахея, легкие, селезенка, головной и костный мозг, готовят 10%-ную суспензию;

- клинический: сыворотка (плазма) крови больных.

В лаборатории проводят:

- *Вирусологическое исследование.* Заражают УЭ на ХАО, аллантоис – гибель через 48-72 часа, обнаруживают в капельной РГА, идентифицируют до субтипа в РТГА.

- *Биопроба* на утятах 10-дневных, гибель в течение 5 дней, на вскрытии кровоизлияния, отек легких, мозга.

- РТГА. Ищут Ig распространенных субтипов, в первую очередь исключают А-Н₅ N₁, А-Н₅ N₂, А-Н₇ N₇.
- ИФА для выявления специфических Ig против субтипа А у обследованных;
- ПЦР для обнаружения вируса субтипа А

Биопрепараты: вакцины такие же как для кур, вакцинируют уток перед яйцекладкой

Лабораторная диагностика гриппа лошадей по Временному наставлению по лабораторной диагностике гриппа лошадей от 15.01. 1973г. Наставление по применению набора антигенов и сывороток для диагностике гриппа лошадей от 27.02.2004г.

Материал для исследований:

- клинический: сыворотка крови больных, носовая слизь;
- патологический: легкие, трахея, готовят 10%-ную суспензию.

В лаборатории проводят:

- *Вирусологическое исследование*, заражают КЭ в аллантоис, гибель биологических моделей через 2-3 дня. Обнаруживают вирус в РГА, идентифицируют до субтипа в РТГА.

- РТГА с сывороткой крови, эритроцитами петуха, антигеном разных субтипов диагностический титр 1:16.

Биопрепараты:

- инактивированная вакцина против субтипов Н₇ N₇, Н₃ N₈, вакцинируют жеребых кобыл, чтобы был колостральный иммунитет у молодняка. В 3 месяца вакцинируют жеребят (Курская биофабрика);

- Эквилис Преквенза против столбняка (столбнячный токсид) и инактивированный β-пропиолактоном с добавлением сапонина вирусы субтипа Н₇ N₇, Н₃ N₈ (Нидерланды).

Лечение. Для птицы применяют АБП внутрь. При вирусемии лошадей внутрь тамифлю, внутримышечно АБП,

если температура тела выше 40⁰ АБП вводят внутривенно 2 раза в сутки, а также внутривенно раствор Рингера, 5%-ной глюкозы, диуретики, чтобы снять интоксикацию. Миозит лечат местно, используя разогревающие мази.

Контрольные вопросы

1. Семейство реовирусов.
2. Возбудитель африканской чумы лошадей (АЧЛ).
3. Вирус катаральной лихорадки овец.
4. Возбудитель ротавирусной диареи телят.

ТЕМА №14

Лабораторная диагностика реовирусных Заболеваний, африканской чумы свиней

Цель занятия. Изучит биологические свойства основных возбудителей реовирусных инфекций животных, лабораторную диагностику, биопрепараты.

Оборудование, материалы. Электронный ресурс, образцы биопрепаратов.

Задание для самостоятельной работы. Разобрать лабораторную диагностику, средства профилактики и лечения.

Лабораторная диагностика АЧЛ

Материал:

- патологический (селезенка, легкие, лимфатические узлы), готовят экстракт 10%-ной суспензии;
- сыворотка крови больных в период вирусемии.

В лаборатории проводят:

- вирусологическое исследование, заражая патологическим материалом культуры клеток (ВНК-21, М-, Vero), обнаруживают по ЦПД (включения), идентифицируют в РДП, РСК;

- РНГА с сывороткой крови или с экстрактом патматериала, титр 1:32;

- РДП, РСК с экстрактом патматериала и с сывороткой крови;
- ИФА с сывороткой крови для выявления антител и для выявления вируса.

Биопрепараты: вакцина против африканской чумы лошадей культуральная полиштаммная живая против 1,6,8,9 серотипа, выращенных на культуре клеток Vero (ВНК-21, ПСГК) (ФГУ «ВНИИЗЖ» Владимир).

Вакцину применяют до появления лета кровососущих жеребым кобылам, чтобы у жеребят был колостральный иммунитет в течение 5-6 месяцев.

Лечение симптоматическое, бесперспективное, все умирают.

Лабораторная диагностика катаральной лихорадки овец (блютанга) по МУ от 11.06 1986г, №432-5

Материал:

- патологический (кусочки селезенки, скелетных мышц, сердца, языка, стенки книжки и рубца, лимфатические узлы) готовят 10%-ную суспензию;
- сыворотку крови от больных, переболевших.

Лабораторные методы включают:

- патогистологическое исследование обнаруживают включения округлой или овальной формы красного цвета, отек, лизис клеток, значительное уменьшение лимфоцитов в селезенке и лимфатических узлах (опустошение);
- выделение вируса на культуре клеток ПЯ или ВНК-21 с образованием ЦПД - зернистость, округлые клетки, тяжи, вирус можно выделить на КЭ, гибель после 24 часов в течение 5 суток, у погибших вишнево-красная окраска, многочисленные кровоизлияния на голове и на туловище. Идентифицируют вирус в РИФ.

- выявление группоспецифических антител в сыворотках крови больных или переболевших в РДСК, РДП или в РН, которую проводят только во ВНИИВВиМ;

- постановку биопробы на овцах (в сомнительных случаях).

Биопрепараты: вакцина против блютанга культуральная инактивированная. Содержит инактивированный препаратом А-24 или β -пропиолактоном вирус блютанга в моно-, би-, трех-, четырехвалентной форме с добавлением адьюванта гидрооксала, сапонина (ФГУ «ВНИИЗЖ» Владимир).

Эффективного лечения нет.

Лабораторная диагностика ротавирусной диареи телят по Временному МУ по лабораторной диагностике ротавирусного энтерита новорожденных телят от 15.01.1988г.

Материал:

- клинический 5 проб фекалий больных, 10 проб сывороток крови;

- патологический (лимфатические узлы, содержимое тощей кишки)

В лаборатории проводят:

- ИФА, РДП с экстрактом фекалий, патматериалом;
- РДП, ИФА с сыворотками крови (имеют ограниченное значение)

- бактериологическое исследование фекалий и содержимого кишечника, когда разведение 1:10, сеют на агар Эндо, выделяют чистую культуру кишечной палочки, идентифицируют, подтверждают вирулентность в капельной РА с антиадгезивными сыворотками, О-коли агглютинирующими сыворотками, или биопробой.

Биопрепараты: плановая вакцинация стельных коров, применяют:

- вакцина ассоциированная против ВД-БС, корона-, ротавирусной инфекции крс, эмульсионная, инактивированная (ФГУ «ВНИИЗЖ» Владимир);

- «Комбовак-К» ассоциированная вакцина (ООО «Нарвак», ООО «Ветбиохим»);

- вакцина для профилактики корона-, ротавирусной инфекции, колибактериоза у телят (Pfizer);
- Ротавек Корона – вакцина против рота коронавирусной инфекций и эшерихимоза инактивированная, эмульгированная (Германия).

Для лечения эффективны АБП, пробиотики, с последующим применением пребиотиков (Ветелакт).

Лабораторная диагностика африканской чумы (АЧС) по Инструкции по применению «тест-системы для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР» от 25.12.2006г.; по Инструкции по применению ИФА при АЧС от 03.04.2007г

Материал:

- патологический (селезенка, лимфатические узлы подчелюстные и мезентериальные, сгустки крови от павших животных), двукратно замораживают и оттаивают, готовят 20%-ную суспензию;
- клинический (сгустки и сыворотка крови от латентно инфицированных животных).

В лаборатории проводят:

- ИФА с экстрактом патологического материала, проводят по инструкции от 03.04. 2007 г. – ведущее исследование;
- ПЦР с экстрактом патологического материала ставят по инструкции по применению «Тест системы для выявления ДНК вируса АЧС от 25.12.2006 г и тест-системы от 25.12.2015г.

Биопрепаратов нет, лечение не разработано, в очагах немедленное умертвление свиней, сжигание туш.

Контрольные вопросы

1. Семейство флавивирусов.
2. Вирус классической чумы свиней.

ТЕМА №15

Лабораторная диагностика флавирусных заболеваний

Цель занятия. Изучить биологические свойства вируса классической чумы свиней и вирусной диареи крс (болезни слизистых оболочек). Разобрать лабораторную диагностику, биопрепараты, освоить методику постановки РСК для обнаружения вируса КЧС.

Оборудование материалы. Сгустки крови, инструменты, посуда, центрифуга для приготовления экстракта, пробирки Флоринского, пипетки, компоненты для РСК, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы. Поставить РСК с экстрактом патологического материала. Познакомиться с образцами вакцин. Зарисовать результат реакции.

Рис. 17. Результат РСК КЧС

Лабораторная диагностика классической чумы свиней по МУ от 08.06.1978г и по МУ от 30.12.1996г.

Проводят обязательно, несмотря на то, что диагноз можно поставить по результатам вскрытия, чтобы отличить заболевание от африканской чумы. Материал:

- патологический (лимфоузлы, селезенка, сгустки крови), готовят мазки-отпечатки и 20%-ную суспензию, двукратно замораживают и оттаивают;
- клинический (сыворотка крови).

В лаборатории проводят:

- РИФ мазков-отпечатков патологического, обнаруживают специфическое свечение скоплений вируса.

- РСК с экстрактом патологического материала в титре 1:2 и больше.

- Вирусологическое исследование, когда заражают РК-15, ЦПД нет, обнаруживают вирус после 96 часового культивирования с помощью РИФ.

- *Биопроба* на подсвинках, после заражения возникает заболевание, затем гибель.

- ИФА с сывороткой крови, с целью обнаружения специфических антител, чтобы исключить проникновение переболевших-носителей в стадо.

- ПЦР с кровью 10%-ным экстрактом тканей, по Инструкции от 12.02. 2009г.

Биопрепараты: ▪ живая вирусвакцина «ЛК» ВНИИВВи М – биомасса авирулентного штамма вируса, полученная культивированием на РК-15 (Покровский био-завод);

- вакцина «КС» против классической чумы свиней живая сухая культуральная (ООО «Ветбиохим»)

Обе вакцины дают 100%-ный профилактический эффект, соответствуют мировому уровню.

Вирус диареи крупного рогатого скота (болезни слизистых крупного рогатого скота) ВД-БС

Характеристика заболевания. Вирусная диарея (ВД-БС) крупного рогатого скота - контагиозное заболевание молодых животных с эрозивным поражением слизистых пищеварительной системы, ринитом, увеличением лимфоузлов, лейкопенией, перемежающейся диареей.

У больных диарея, ринит, бронхопневмония, персистенция микрофлоры на слизистых обуславливает изъязвление и некроз слизистых, диарея усиливается. Вирус может персистировать.

Восприимчивы крс, буйволы, олени, косули.

Способ заражения: контактный, аэрогенный, алиментарный, половой, трансплацентарный от чего мертворожденные.

Морфологические свойства. Возбудитель принадлежит к семейству Flaviridae род Pestis virus. Представляет сферические частицы с липидным суперкапсидом 40-60 нм. Капсид кубической симметрии, геном односпиральная плюс-РНК.

Культивирование:

- первичные: ПЭК, ТБ;
- перевиваемые: МДБК, КСТ.

Все штаммы вируса ВД по цитопатогенному действию подразделяют на две группы: цитопатогенные и нецитопатогенные. ЦПД отмечают через 48 часов (округлые клетки, лизис клеток) с высоким инфекционным титром вируса. Нецитопатогенные вирусы обнаруживают с помощью РИФ.

Биологические свойства. Вирус проникает через слизистые, циркулирует в крови, накапливается и размножается во многих органах, в клетках эпителия, моноцитах и макрофагах, проникает через плаценту. Гемагглютинацией не обладает. Выделяется с фекалиями, слизью органов дыхания, спермой.

Антигенные свойства. Все штаммы одинаковые, различаются тропизмом, вирулентностью.

Устойчивость. При -4 – 6 месяцев. В патматериале при - 40 сохраняется годами. Чувствителен ко многим дезинфектантам в обычных концентрациях.

Лабораторная диагностика ВД – БС по МУ по лабораторной диагностике вирусных респираторно-кишечных инфекций крс от 25.07.1978г. и Наставлениям по применению набора компонентов для диагностики ВД-БС методом ИФА от 15.0. 1997г. и 03.03. 2008 г.

Материал:

- патологический (трахея, миндалины, изъязвленные участки слизистой), готовят 25-50%-ную суспензию;
- клинический (сыворотка крови, фекалий, носовая слизь).

В лаборатории проводят:

- вирусологическое исследование, вирус культивируют на МДСК, КСТ, обнаруживают по ЦПД, идентифицируют в РИФ, РДП, РСК.
- ИФА с экстрактом патологического материала, используют диагностикум по наставлению от 15.07. 1997г.
- ПЦР для обнаружения вируса ВД в патологическом материале (лимфоузлах грудной полости, кишечнике, селезенки, крови) и в клиническом материале (фекалиях, сперме);
- ИФА с сывороткой крови и диагностикумом «ВД-БС ИФА ВИЭВ».

Биопрепараты: ▪ применяют вакцины стельным животным внутримышечно в дозе 3 мл: Комбовак, Комбовак-Р, Комбовак-К, Комбовак –А, вакцинируют дважды: первый раз – за 40-50 суток до отела, второй раз - через три недели.

▪ вакцина «Тривак» против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 поливалентная сухая живая из аттенуированных штаммов (Ставропольская биофабрика).

▪ «Бовилис» BDV (БВД) инактивированная вакцина против ВД-БС (ООО «Интервет»).

Для лечения АБП внутрь и внутримышечно, паолионные растворы, пробиотики.

Контрольные вопросы

1. Характеристика семейства коронавирусов.
2. Возбудитель коронавирусной диареи телят.
3. Вирус ТГЭС.
4. Вирус ИБК.

ТЕМА № 16

Лабораторная диагностика коронавирусных заболеваний, биопрепараты

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства коронавирусов, разобрать лабораторную диагностику заболеваний, биопрепараты. Поставить ИФА с целью выявления вируса ТГЭС в экстракте фекалий поросят.

Оборудование и материалы. Экстракты фекалий поросят, диагностикум ИФА ТГЭС, пипетки автоматы, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать лабораторную диагностику заболеваний. Поставить ИФА с экстрактом фекалий поросят. Познакомиться с образцами вакцин.

Лабораторная диагностика ТГЭС по ГОСТ 25580-83, МУ по лабдиагностике ТГС от 30.05. 1978 №116-6а, Инструкция по применению реагентов ИФА «ТГС-СЕРОТЕСТ от 12.08.2010, Инструкция по применению набора ТГС и РВС методом ИФА от 21.05.2009 г.

Материал:

- клинический (экстракты фекалий поросят, сыворотка крови свиноматок);
- патологический: (легкие, печень, селезенка в первые дни заболевания), готовят 10%-ную суспензию.

В лаборатории проводят:

- *ИФА с экстрактом фекалий* – ведущее исследование.
- *РНГА с сыворотками крови свиноматок и эритроцитарным диагностикумом ТГЭС*, положительный титр 1:32 и больше. Исследование плановое, подлежат 5% поголовья свиноматок в племенных хозяйствах.
- *Вирусологическое исследование*, заражают ППК-66б, через 2-7 пассажей ЦПД, идентифицируют в РН на культурах клеток.

- ИФА с сывороткой крови

Биопрепараты: ■набор вакцин ТР-1 против ТГС и ротавирусной болезни свиней (РВБС) в составе лиофилизат аттенуированных штаммов ТГС и РБС и инактивированные штаммы с масляным адьювантом;

- вакцина ТР против ТГС и РВБС инактивированная (ООО «Ветбиохим»);

- набор вакцин против ТГС и РВБС, в составе сухая живая вакцина против ТГС, вакцина против ТГС и РВБС, инактивированная эмульгированная или сорбированная. Сухую вакцину вводят свиноматкам на 70-75 и 90-95 дне супоросности, свиноматок первого опороса вакцинируют инактивированной вакциной за 1-2 недели до осеменения, хряков однократно – инактивированной вакциной (НПО «Нарвак»).

Лучшая в мире вакцина «Gastrotefa» производитель Рон-Мерье, вакцина есть оральная форма и для внутримышечного введения.

Для лечения применяют АБП внутрь, полиионные растворы.

Лабораторная диагностика коронавирусной инфекции (диареи) телят по Временному наставлению по лабораторной диагностике от 19.02.1988 г., Наставление по применению набора методов РГА от 11.03.1990 г.

Материал:

- клинический: фекалий больных телят, готовят экстракт, сыворотка крови;
- патологический: кусочки легких, готовят 10%-ную суспензию.

В лаборатории проводят:

- ИФА с экстрактом фекалий.
- Вирусологическое исследование с 10%-ным экстрактом легких, заражают первичные культуры клеток телят,

обнаруживают по ЦПД (округлые клетки и синтиции), идентифицируют в РГА с эритроцитами крысы или мыши;

- РГА и РТГА с сыворотками крови и эритроцитами мыши;

- РГА с экстрактом фекалий и эритроцитами мыши.

Биопрепараты: ▪ инактивированная гидроокисьалюминиевая вакцина против коронавирусного энтерита крс;

- вакцина Комбовак, Комбовак – К, Комбовак – А вакцинируют стельных животных дважды: первый раз – за 40-50 суток до отела, второй раз - через три недели (НПО «Нарвак»);

- вакцина против рота-, коронавирусной инфекций крс инактивированная сорбированная (ФГУ ВНИИЗЖ г. Владимир);

- ассоциированная сухая вакцина культуральная «Роквак» (ООО НПФ «Диавак»);

- Вакцина ассоциированная против ВД-БС, рота-, коронавирусной инфекции крс инактивированная эмульгированная (ФГУ ВНИИЗЖ г. Владимир)

Лечение мало эффективно, применяют АБП, пробиотики, полиионные растворы.

Лабораторная диагностика ИБК (инфекционного бронхита кур) по МУ от 1980 г. № 115-6а.

Материал:▪ патологический: от погибших цыплят берут трахею, легкие, почки, на санбойне у кур – яйцепроводы, КЭ с признаками карликовости и мумификации, готовят 10%-ную суспензию;

- клинический: сыворотка крови, желтки деформированных яиц, готовят экстракт.

В лаборатории проводят:

- Вирусологическое исследование, когда экстрактом суспензии заражают КЭ, после 3-6 пассажа 100%-ная гибель, на вскрытии погибших КЭ карликовость, мумификация, прилипание лапок к голове, ураты. Можно провести идентификацию вируса с помощью РН и РДП;

- Биопроба на 10-25-дневных цыплятах, заражают в трахею, через 5-18 дней гибель с поражением органов дыхания или почек (нефроза-нефрит);
- РН на КЭ, чтобы определить серотип возбудителя, необходимо иметь эталонные сыворотки;
- РДП, ИФА с сывороткой крови.;
- РДП с экстрактом желтков и эталонными сыворотками против разных серотипов.

Биопрепараты:

- вакцина против ИБК из штамма Н-120, применяют интраназально или спрей методом (ОАО «Покровский био-завод»);
- ассоциированная, инактивированная вакцина против ИБК, НББ, ИББ и ССЯ-76 для взрослой птице, применяют внутримышечно (ООО «Кронвет» СПб);
- ассоциированная вакцина против НБ (штаммы Ла Сота, В₁, Бор-74) и ИБК (шт Н-120, Н-52 ООО «Авивак»)

Лечение: АБП: тилан, энрофлон, дорин.

Контрольные вопросы

1. Характеристика семейства ретровирусов.
2. Возбудитель лейкоза крс.
3. Возбудитель инан.

ТЕМА № 17

Лабораторная диагностика лейкоза крс, инфекционной анемии (инан) лошадей

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства вирусов лейкоза крс и инана лошадей, разобрать лабораторную диагностику заболеваний, биопрепараты. Поставить РИД с целью выявления лейкозных антител в сыворотке крови обследуемых, освоить гематологическое исследование для диагностики лейкоза крс.

Оборудование и материалы. Сыворотки крови коров, лейкозный диагностикум, стабилизированная кровь крс, камеры Горяева, меланжеры, предметные стекла, краска Романовского-Гимза, микроскопы, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Поставить РИД (результат зарисовать), подсчитать количество лейкоцитов, определить количество лимфоцитов в образцах крови обследуемых.

Рис. 18. Результаты РИД

***Лабораторная диагностика лейкоза крс по МУ, утв.
МСХ РФ 23.08.2000***

Диагностические исследования на лейкоз проводят: клиническими; патоморфологическими; гистологическими методами, молекулярно-генетическим, серологическим исследованием и биопробой.

● *Клиническое исследование* характеризуется появлением признаков заболевания в опухолевую стадию:

- нарушение половых циклов у телочек (длительная охота), при ректальном обследовании обнаруживают увеличение лимфоузлов таза;
- частые атонии рубца;
- сердечная недостаточность;
- увеличение подкожных лимфоузлов;
- экзофтальмия и исхудание.

С появлением клинических признаков болезнь быстро прогрессирует на фоне исхудания.

- Патоморфологический метод основан на обнаружении опухолей в лимфоузлах, селезенке, печени, почках, сердечной мышце, сычуге, рубце, матке, в скелетной мускулатуре.

- Гистологическое исследование опухолей позволят поставить точный диагноз, так как заболевание протекает по типу острого и хронического лимфоидного лейкоза, лимфосаркомы, миеломной болезни, лимфогрануломатоза. Преимущественно диагностируют хронический лимфоидный лейкоз.

- Серологическое исследование включает постановку РИД по Инструкции применения набора РДП от 21.06.2011, выпускают наборы четырех вариантов, в зависимости от количества обследуемого поголовья и ИФА с сывороткой крови обследуемых по Инструкции применения набора ИФА – Veri Test от 02.02.2004. Ведущее исследование РИД, цель которого обнаружить специфические Ig, которые появляются через 2-4 недели после заболевания. Исследование проводят с 6 месячного возраста, за 30 дней до отела и 30 дней после отела, вакцинации, аллергического исследования. Выпускают наборы для диагностики лейкоза, в составе которого антиген, специфическая преципитирующая сыворотка, порошок агара, растворитель антигена, концентрат для приготовления агарового геля. В центральную лунку вносят антиген, в две крайних лунки специфическую преципитирующую сыворотку (тест-система), в четыре других – испытуемые. Учет через 48 – 96 часов. Обязательно полоса в тест-системе. Если животные содержат лейкозные Ig полоса сливается с полосой тест системы, если загиб в сторону лунки с сывороткой – слабopоложительная реакция, если загиб в сторону лунки с антигеном – резко положительная реакция, такую сыворотку разводят 1:5 и снова

ставят реакцию. Отрицательная реакция, когда против испытуемой сыворотки нет полосы. РИД на лейкоз включена в плановое исследование у коров.

- Гематологическое исследование, материал стабилизированная кровь. Определяют количество лейкоцитов в камере Горяева, подсчитывая в 25 больших (100 малых) квадратах или автоматически. Количество лейкоцитов в квадратах умножают на 50. Определяют количество лимфоцитов, для этого готовят мазки крови, фиксируют этиловым спиртом 20-30 мин, окрашивают по Романовскому-Гимза 20-30 мин, микроскопируют окрашенные мазки, определяют лейкограмму и процент лимфоцитов.

$M \text{ лимфоцитов} = M \text{ лейкоцитов} \times \% \text{ лимфоцитов} : 100,$

Где М – количество клеток.

Результаты анализирую по таблице.

Таблица 19 – Лейкозный ключ

Возраст крс (годы)	Здоровые		Подозрит	Больные
	М лейкоцит	% лимфоц	кол-во лимфоцит	кол-во лимфоцит
1-2	12 тыс.	≤ 75	9-11 тыс.	≥ 11
2-4	До 11 тыс.	≤ 70	8-10 тыс.	≥ 10 тыс.
4-6	До 10 тыс.	≤ 65	6,5 – 9 тыс.	≥ 9 тыс.
≥ 6	До 9 тыс.	≤ 60	5,5 – 8 тыс.	≥ 8 тыс.

Если лейкоцитов, лимфоцитов меньше животные здоровые, если лейкоцитов больше нормативных показателей, а лимфоцитов норма – подозрительные, таких животных исследуют через 1-2 месяца, если получают такие же показатели – больные. Если количество лейкоцитов и лимфоцитов больше нормы животные больные.

- ПЦР исследуют стабилизированную кровь по Инструкции применения тест-системы «Лейкоз» от 19.05.2009г. выпускают тест-системы в двух вариантах с электрофоретической детекцией и детекцией флуоресцентного сигнала в режиме реального времени.

- Биопроба, заражают лейкоконцентратом овец внутрибрюшинно или внутривенно кроликов, через 14-30 дней они реагируют в РИД.

Биопрепараты разрабатываются.

Лечение не разрабатывалось, так препараты для лечения лейкоза человека дорогие, импортного производства (маптера, велкейд, алкеран), не всегда эффективны.

Лабораторная диагностика инан по Временному МУ МСХ СССР №115-6а от 25.03.1983 г.

Проводят с диагностической целью и планово. Материал:

- сыворотка и стабилизированная кровь больных;
- кусочки печени, легких, лимфоузлы, почки погибших.

В лаборатории проводят:

- РДП с сывороткой крови и диагностикумом инан (стерильный гомогенат селезенки лошади, больной инаном), с составе которого антиген, специфическая сыворотка. РДП плановое исследование у лошадей по Инструкции от 24.03. 2009 г.

- *Гематологическое исследование* проводят у положительно реагирующих в РДП, определяют количество эритроцитов (у больных $\leq 4,5$ млн), гемоглобина (Hb ≤ 50 г/л), СОЭ(100-170 мм/час), процент лимфоцитов (60-75%).

- *Биопроба* на рабочих жеребьях, подкожно 100-200 дефибринированной крови подозрительных или 100-200 сыворотки крови, наблюдение 90 дней, появляются клинические признаки б температура, положительная реакция в РДП, положительные гематологические результаты.

- *Гистологическое исследование*, когда в печени, легких, лимфоузлах обнаруживают гемосидерин, гиперплазию селезенки, гломерулонефрит.

Биопрепараты не разработаны, вирус характеризуется антигенным дрейфом, лечение не разработано, заболевание прогрессирует

Вопросы коллоквиума № 3

1. Вирус гриппа кур.
2. Вирус гриппа уток.
3. Вирус гриппа лошадей.
4. Вирус АЧЛ.
5. Вирус бдютанга.
6. Возбудитель ротавирусной инфекции телят.
7. Вирус АЧС.
8. Вирус КЧС.
9. Возбудитель ВБ-БС.
10. возбудитель коронавируса инфекции телят.
11. Вирус ТГЭС.
12. Вирус ИБК.
13. ВЛ КРС.
14. Вирус инан.

ТЕМА № 18

Лабораторная диагностика ящура, болезни Тешена

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства вирусов ящура и болезни Тешена, разобрать лабораторную диагностику заболеваний, биопрепараты. Поставить РСК с целью определения антигенного типа вируса ящура.

Оборудование и материалы. Компоненты для РСК для определения антигенного типа вируса ящура, пробирки Флоринского, пипетки, образцы биопрепаратов, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов.

Поставить РСК по схеме табл.20, учесть результаты, познакомиться с образцами бипрепаратов, лекарственных средств.

Таблица 20 – Методика постановки главного опыта РСК

Компоненты	1	2	3	4	5	6	7
Антиген А	1						
Антиген О	-	1					
Антиген С	-	-	1				
Испытуем	-	-	-	1			
1:2	-	-	-	-	1		
1:4	-	-	-	-	-	1	
1:8	-	-	-	-	-	-	1
Сыворотка А	1	1	1	1	1	1	1
Комплемент	1	1	1	1	1	1	1
Выдерживаем +37 ⁰ С – 30 мин							
Гемсистема	1	1	1	1	1	1	1
Выдерживаем +37 ⁰ С – 30 мин							
Учет							

Гемсистема включает 2%-ную взвесь эритроцитов барана и гемолитической сыворотки.

Лабораторная диагностика ящура по ГОСТ 25384-82

Диагноз ставят по клиническим признакам, но необходимо определить антигенный тип и вариант возбудителя. Материал:

- клинический: содержимое афт, готовят 10%-ную суспензию, сыворотка крови.

В лаборатории проводят:

- РСК с содержимым афт для определения антигенного типа возбудителя с диагностическими ящурными сыворотками.

- Вирусологическое исследование. Содержимым афт заражают ВНК-21, обнаруживают вирус по ЦПД (синтиции), идентифицируют в РСК.

- *Биопроба* на культурах клеток или мышатах сосунах, мышата погибают, результаты подтверждают в РСК

- *РДП с сывороткой крови больных*, переболевших.

Биопрепараты:▪ вакцина ящурная культуральная моно-, поливалентная, сорбированная инактивированная типов А,О.Азия-1 (Щелковский биокомбинат);

- вакцина ящурная культуральная моно-, поливалентная сорбированная инактивированная типов А TUR 2014,О –PAN Азия-2 (Щелковский биокомбинат);

- вакцина против ящура сорбированная моно- и поливалентная (из вируса, выращенного в клетках ВНК-21) типа А (ФГБУ «ВНИИЗЖ», г.Владимир) .

Лечение. Афозный стоматит лечат, применяя:

- 0,001%-ный раствор молочной кислоты, добавляют в воду;

- при значительном поражении слизистой индивидуально применяют: винилин, масляный раствор хлорофиллипта, метрогил-гель;

- телятам вводят кровь переболевших 40 мл подкожно по 10 мл в 4-х местах;

- при поражении межпальцевой складки, венчика после обработки перекисью водорода накладывают повязки с винилином, метрогилом, масляным раствором хлорофиллипта.

Лабораторная диагностика болезни Тешена по МУ

№13-5-02/0368 от23.03.2002 г.

Материал для исследований патологический: головной мозг, 10%-ную суспензию и сыворотка крови готовят.

- *Вирусологическое исследование*, заражают СПЭВ, РК-15, ПТП вирус обнаруживают по ЦПД (скопление округлых клеток в виде виноградных гроздьев), идентифицируют в РН на культурах клеток, можно в или РИФ.

- Биопроба на подсвинках с обнаружением скоплений вируса в мазках с помощью РИФ.

- РН с сывороткой крови (выпускают набор).

Биопрепараты: ▪ инактивированная эмульгированная вакцина из штамма Навля-96 (ООО «Нарвак»).

- Верес-Тешена вакцина из штамма «ГС» культуральная инактивированная с гелевым адьювантом (ООО «Ветбиохим»).

Лечение: применяют глобулин против болезни Ауэски, диуретики, аскорбиновую кислоту, анальгетики.

ТЕМА № 19 для самостоятельной работы **Лабораторная диагностика бирна-, парвовирусных заболеваний**

Цель занятия. Изучить биологические свойства вируса ИББ, парвовирусного энтерита собак, алеутской болезни норок, панлейкопении кошек, биопрепараты.

Оборудование, материалы. Образцы биопрепаратов, лекарственных средств, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы. Познакомиться с биопрепаратами, лекарственными средствами для лечения изучаемых заболеваний.

Лабораторная диагностика инфекционной бурсальной болезни (ИББ) по Временному МУ по диагностике ИББ от 19.07.1990 г., №0443

Материал:

- патологический (сумка фабрицеуса, печень, селезенка, почки), готовят экстракт 10%-ной суспензии;
- клинический сыворотка или плазма крови.

В лаборатории проводят:

- РДП с экстрактом патологического материала;
- РДП с сывороткой крови используют набор «Биотест- РДП»;
- ИФА для выявления специфических антител к вирусу ИББ по Инструкции от 22.06. 2008г.

Биопрепараты:

- вакцина культуральная сухая из штамма «БГ», выпаивают с 7-10-дневного возраста, затем через 14 дней, если в хозяйстве регистрировалось заболевание, то вакцинируют трижды (ОАО «Покровский завод биопрепаратов»;

- «АВИВАК-ИББ» вакцина против ИББ живая сухая в основе штамм «БГ» или «Винтерфильд» (ООО «АВИВАК», Ленобласть);

- «Барсаплекс» живая сухая вакцина (США);

- Вакцина живая сухая «Винтерфильд» (ФГБУ «ВНИИЗЖ» г. Владимир).

Лечение после выбраковки больных, назначают АБП, витамины, электролиты (гепатобустер).

Лабораторная диагностика парвовирусного энтерита собак

Материал:

- клинический (фекалий, сыворотка крови), из фекалий готовят экстракт.

В лаборатории проводят:

- ИФА для выявления антигена вируса по Наставлению от 2002г.

- ГЗГА (РТГА) с сыворотками крови (парные).

Биопрепараты: плановая вакцинация, применяют вакцины:

- «Мультикан -4, 6,7;8» - серия ассоциированных вакцин (НПО «Нарвак»)

- «Астерион»- серия ассоциированных вакцин (ООО «Ветбиохим»;

- «Гексаканивак»- ассоциированная вакцина (ООО Звероцентр);

- «Примадог»- вакцина против парвовирусного энтерита живая сухая («Merial» Франция);

- серия «Нобивак»- ассоциированные вакцины (Нидерланды);

- «Гискан-5», – гипериммунная сыворотка, которую применяют для профилактики в случае высокого риска заражения (ООО «Нарвак»);
- «Глобкан-5»- полиглобулин против чумы, парвовирусного энтерита, аденовириозов собак (НПО «Нарвак»);
- «Иммуновет» -поливалентная сыворотка («Ветзвероцентр»).

Для лечения применяют «Гискан-5», «Глобкан-5», «Иммуновет», полиионные растворы, АБП, противорвотные средства, сердечные (рибоксин, кокарбоксилазу). АБП назначают внутрь и внутривенно, пробиотики.

Лабораторная диагностика алеутской болезни норки

Материал: сыворотка крови больных.

В лаборатории проводят:

- биохимические исследования: реакцию иодной агглютинации и тимоловую пробу, обнаруживают избыток антител;
- серологические исследования: иммуноэлектрофорез и реакцию иммуноэлектроосмофореза (РИЭОФ) по Наставлению № 13-7-2/142 от 23.08.1994г
 , положительный результат характеризуется образованием полосы преципитации.

Профилактика:

- экспериментальная антиидиотипическая вакцина против АБН- специфические антиидиотипические антитела и их фрагменты- иммунохимические аналоги вирусных антигенов (ООО «Иммункумус» Москва).

Лечение, чтобы норки дожили до 6-месячного возраста назначают внутрь аскорутин, глюконат кальция, трентал, можно внутримышечно применять глюконат кальция, фоспренил.

Лабораторная диагностика панлейкопении кошек (ПЛК)

Материал:

- клинический (кровь, фекалий), из фекалий готовят экстракт;
- патологический (лимфоузлы, костный мозг, селезенка, печень) готовят 20%-ную суспензию для ПЦР.

В лаборатории проводят:

- гематологическое исследование, количество лейкоцитов менее 5 тыс., отмечают лимфопению, тромбоцитопению.;
- иммунохроматографический анализ-экспресс метод с сывороткой крови;
- ПЦР с экстрактом патологического материала, экстрактом фекалий.

Биопрепараты: ▪ вакцина «Мультифел -4» против ПЛК, ИРТ, калицивироза и хламидиоза кошек применяют для плановой вакцинации, можно использовать для единовременной комплексной вакцинации кошек с вакциной «Рабифел» (НПО «Нарвак»);

- «Витафел» – специфическая поливалентная гипериммунная сыворотка кошек против ПЛК, калицивироза, ринотрахеита, хламидиоза (ООО «Бионит» г. Владимир),

- «Витафел-С» – специфический глобулин получен из гипериммунной сыворотки кошек против ПЛК, калицивироза, ринотрахеита и хламидиоза (ООО «Бионит» г. Владимир).

- «Витафел Глоб» и «Витафел ГС» - глобулин получен из гипериммунных сывороток лошадей, волов, коз;

- «Феловакс» - вакцина против тех же болезней (США);

- «Леукорифелин» вакцина против ПЛК, ринотрахеита, калицивироза («Мериал» Франция);

- «Нобивак Трикет»- вакцина против ПЛК, ринотрахеита, калицивироза (Нидерланды).

Лечение с применением « Витафел», «Витафел –С», противовирусного средства - фоспренила, АБП, средств препятствующих обезвоживанию и ацидоза (4%-ный раствор соды, трисамина).

ТЕМА № 20 самостоятельной работы
Лабораторная диагностика калицивирозов,
биопрепараты

Цель занятия. Изучить биологические свойства вируса ГБК и калицивироза кошек, разобрать лабораторную диагностику, биопрепараты.

Оборудование и материалы. Образцы биопрепаратов, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы. Познакомиться с образцами биопрепаратов, указать на главные признаки при ГБК, калицивирозе, используя электронный ресурс.

Лабораторная диагностика геморрагической болезни кроликов (ГБК)

Материал:

- патологический (печень), готовят экстракт в соотношении 1:5;

В лаборатории проводят:

- ИФА по типу сэндвич-варианта с экстрактом печени по Наставлению от 10.03.1989г. ведущее исследование;

- РГА с экстрактом печени, у больных, титр 1:64.

Биопрепарат. Плановая вакцинация с использованием вакцин:

- лиофилизированная инактивированная тканевой гидроокисьалюминиевой вакцина (ГФБУ ВНИИЗЖ г. Владимир);

- ассоциированная вакцина против ГБК и микоматоза (ОАО «Покровский биозавод»);

- Раббивак V – инактивированная формалином гидроокисьалюминиевая вакцина против ВГБК (ООО «БиАгро» г. Владимир);

- сыворотка против ГБК.

Лечение малоэффективно.

Лабораторная диагностика калицивирусной инфекции кошек (калицивироза кошек)

Материал: клинический: сыворотка крови, ортофарингальные и глазные пробы/мазки, патологический: легкие, слизистые, готовят 25% суспензию.

В лаборатории проводят:

- ПЦР с суспензией патматериала или с содержанием проб/мазков по Наставлению по применению тест-системы «Калицивир» от 25.06.2003 г.;

- биопроба на котят, гибель в течение 20 дней;

- РНГА с сывороткой крови по МУ от 01.06.1999г.

Биопрепараты. Плановая вакцинация, применяют вакцины серии Мультифел: Мультифел -2 против инфекционного ринотрахеита и КВБК, Мультифел-3 против инфекционного ринотрахеита, КВБК и ПЛК, Мультифел-4 против против ПЛК, ИРТ, калицивироза и хламидиоза кошек (ООО Звероцентр) применяют для плановой вакцинации, можно использовать для единовременной комплексной вакцинации кошек с вакциной «Рабифел»;

Для профилактики и лечения назначают:

- Витафел – специфический глобулин против ПЛК, калицивироза, ринотрахеита;

- Витафел-С – поливалентная гипериммунная сыворотка против ПЛК, калицивироза, ринотрахеита.

Лечение с применением Витафел, Витафел-С, АБП, масляного раствора хлорофиллипта, винилина.

Экзаменационные вопросы по вирусологии

1. Определение «вирус», «вирион».
2. Морфология и структура вирусов.
3. Классификация вирусов.
4. Репродукция вирусов.
5. Понятие вирогении.
6. Культивирование вирусов.
7. Характеристика культур клеток.
8. Перевиваемые культуры клеток.
9. Реакция клетки на вирусную инфекцию.
10. Мутации вирусов.
11. Рекомбинации вирусов.
12. Антивирусные факторы естественной резистентности.
13. Противовирусное значение ИГ .
14. Значение ЕК и цитотоксических лимфоцитов.
15. Иммунопатологическое действие вирусов.
16. Противовирусные средства.
17. Отбор патологического материала, транспортировка.
18. Подготовка вирусосодержащего материала для исследований.
19. Строение КЭ.
20. Способы заражения КЭ.
21. Признаки размножения вирусов в КЭ.
22. Этапы приготовления КФ.
23. Титрование вирусов по ООЕ, БОЕ.
24. Титрование вирусов по ГАЕ, ЦПД₅₀, LD₅₀ .
25. ИФА, сущность, варианты постановки.
26. ПЦР сущность, варианты учета.
27. Сущность РДП, методика постановки, учета.
28. Сущность и методика постановки РЗГА.
29. Сущность и методика постановки РНГА.
30. Сущность и методика постановки РН.

31. Прионы и вириоды.
32. Возбудитель оспы овец.
33. Возбудитель оспы птиц.
34. Возбудитель миксоматоза кроликов.
35. Возбудитель контагиозного пустулезного дерматита.
36. Вирус болезни Ауески.
37. Вирус ринопневмонии лошадей.
38. Вирус ИРТ.
39. Вирус ЗКЛ.
40. Вирус болезни Марека.
41. Вирус ИЛТ.
42. Вирус бешенства.
43. Вирус папилломатоза крс.
44. Возбудители аденовирусной инфекции собак.
45. Вирус АВИ крс.
46. Вирус ССЯ.
47. Вирус ПГ-3.
48. Вирус НБ.
49. Вирус РС-инфекции крс.
50. Вирус чумы плотоядных.
51. Вирус АЧЛ.
52. Вирус катаральной лихорадки овец.
53. Возбудитель ротавирусной диареи телят.
54. Вирус классической чумы свиней.
55. Вирус ВБ-БС.
56. Вирус африканской чумы свиней.
57. Вирус лейкоза крс.
58. Вирус инан.
59. Вирус болезни Тешена.
60. Вирус ящура.
61. Вирус ИББ.
62. Возбудитель парвовирусного энтерита собак.
63. Вирус алеутской болезни норок.
64. Вирус панлейкопении кошек
65. Вирус ТГЭС.

66. Возбудитель коронавирусной инфекции телят.
67. Вирус ИБК.
68. Вирус гриппа кур.
69. Вирус гриппа уток.
70. Вирус гриппа лошадей.
71. Вирус ГБК.
72. Вирус калицивироза кошек.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышников П.И. Ветеринарная вирусология: учебное пособие для вузов. М.: Форум, 2009. 96 с.
2. Бовкун Г.Ф. Вирусология и биотехнология: учебно-методическое пособие для студентов очного обучения. Брянск: Изд-во Брянский ГАУ, 2018. 120 с.
3. Белоусова Р.В., Преображенская Э.А., Третьякова И.В. Ветеринарная вирусология. М.: «Колос», 2007. 423 с.
4. Вирусология и биотехнология / Р.В. Белоусова, Е.И. Ярыгина, И.В. Третьякова, М.С. Калмыкова. СПб.: Изд-во «Лань», 2017. 220 с. (ЭБС «Лань»).
5. Госманов Р.Г., Колычев Н.М., Плешакова В.И. Ветеринарная вирусология. СПб.: «Лань», 2010. 473 с.
6. Калмыкова М.С. Основы ПЦР с разными форматами детекции: учебное пособие. СПб.: «Лань» 2009. 98 с.
7. Лабораторная диагностика вирусных болезней животных: учебное пособие / сост. П.И. Барышников, В.В. Разумовская. 2-е изд., испр. СПб.: Изд-во «Лань», 2015. 672 с.
8. Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии. М.: «Колос», 1999. 245 с.
9. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, А.Я. Самуйленко, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. М.: ВНИТИБП, 1998.

Учебное издание

Бовкун Галина Федоровна

ВИРУСОЛОГИЯ

Учебно-методическое пособие
для студентов очного обучения
по специальности 36.05.01 «Ветеринария»

Редактор Осипова Е.Н.

Подписано к печати 13.04.2022 г. Формат 60х84. 1/16.
Бумага офсетная. Усл. п. л. 6,39. Тираж 100 экз. Изд. № 7251.

Издательство Брянского государственного аграрного университета
243365, Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино, Брянский ГАУ