

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной  
медицины имени Н.Э.Баумана»

**Госманов Р.Г., Равилов Р.Х., Галиуллин А.К.,  
Нургалиев Ф.М.,**

## **ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

Учебное пособие предназначено для студентов, аспирантов, магистров и  
слушателей факультета повышения квалификации

**Казань-2016**

Учебное пособие «Лабораторная диагностика инфекционных болезней» составлено Госмановым Р.Г., Рапиловым Р.Х., Галиуллиним А.К., Нургалиевым Ф.М., Идрисовым Г.Г. и предназначено для студентов, аспирантов, магистров и слушателей факультета повышения квалификации по специальности «Ветеринария».

Печатается по решению Ученого совета факультета ветеринарной медицины Казанской государственной академии ветеринарной медицины имени Н.Э.Баумана

Рецензенты: д.в.н., профессор Макаев Х.Н.  
д.б.н., профессор Латыпов Д.Г.

## Введение

Тщательный анализ всей информации в очагах инфекций позволяет поставить клинико-эпизоотологический диагноз, который носит только предварительный характер, так как многие клинические признаки совпадают, т.е. являются общими при различных заболеваниях.

Для того чтобы поставить окончательный диагноз, необходимо располагать данными лабораторных исследований патологического материала, взятого от больных животных или трупов. Лабораторные исследования проводят независимо от предварительного диагноза. Их значение возрастает особенно в том случае, когда заболевание протекает атипично или в виде смешанной инфекции, а также при расшифровке этиологии новых, ранее неизвестных заболеваний.

Лабораторные методы диагностики как вирусных, так и бактериальных заболеваний, основаны на обнаружении в патологическом материале возбудителей в острой стадии болезни и на выявление прироста специфических антител у животных реконвалесцентов (переболевшие и выздоравливающие).

В учебном пособии изложены методы бактериологической, вирусологической и серологической диагностики инфекционных болезней.

Бактериологическая диагностика включает следующую схему бактериологических исследований: микроскопические и бактериологические методы (культивирование, выделение чистых культур, изучение их культурально-биохимических свойств, проведение биологической пробы), с последующей идентификацией в серологических реакциях.

Вирусологическая диагностика включает рекомендации, направленные на максимальное сохранение образцов биоматериала с момента составления заявки на исследование до доставки пробы в вирусологическую лабораторию. Вирусологические методы включают экспресс-методы, культивирование на различных объектах (культуры клеток и тканей,

развивающиеся куриные эмбрионы, лабораторные животные) и изучение свойств выделенных вирусов с последующей идентификацией.

Серологическая диагностика основана на проведении различных серологических реакций. В основу практического применения этих реакций положен принцип тесной физико-химической связи между родственным антигеном и антителом. На основании этого принципа по одному известному компоненту можно сделать заключение о природе неизвестного. Серологическая диагностика включает следующие реакции: преципитации, агглютинации, связывания комплемента, флуоресцирующих антител, иммуноферментный анализ, нейтрализации, радиоиммунный анализ и иммуноблотинг.

В лабораторной диагностике используют также электронную микроскопию и молекулярно-генетические исследования.

Своевременно и точно поставленный диагноз с использованием бактериологических, вирусологических и серологических методов исследований предопределяет успех борьбы с инфекционными болезнями животных.

# РАЗДЕЛ 1

## БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

### 1. Методы бактериологической диагностики

#### 1.1. Принципы организации и оборудование ветеринарных лабораторий

Лабораторная диагностика проводится ветеринарными лабораториями, которые по масштабу своей деятельности подразделяются на республиканские (областные, краевые), зональные, районные, специальные – на предприятиях, перерабатывающих животноводческую продукцию (мясо-, молочные комбинаты и др.). В ветеринарных лабораториях проводят диагностические исследования инфекционных болезней: на туберкулез, бруцеллез, сибирскую язву, рожу свиней и др.

Бактериологические лаборатории обычно размещаются в нескольких помещениях, которые в зависимости от объема работы и целевого назначения занимают большую или меньшую площадь. В каждой лаборатории предусмотрены: боксы для работы с отдельными группами бактерий или вирусов, помещения для серологических исследований, приготовления питательных сред, стерилизации, мойки посуды; виварий с боксами для здоровых и подопытных животных.

В лаборатории должно быть следующее оборудование: биологический иммерсионный микроскоп с дополнительными приспособлениями (осветителем, фазово-контрастным устройством, темнопольным конденсором и др.), люминесцентный микроскоп, термостаты, оборудование для стерилизации (автоклавы, сушильные шкафы), рН-метр, аппарат для получения дистиллированной воды (дистиллятор), центрифуги, технические, аналитические и торзионные весы; аппаратура для фильтрования (фильтры Зейтца и бактериальные свечи), водяные бани, холодильники, аппарат для

изготовления ватно-марлевых пробок, набор инструментов – бактериологические петли, шпатели, иглы, пинцеты и др., лабораторная посуда (пробирки, колбы, чашки Петри, матрасы, флаконы, ампулы, пастеровские пипетки, градуированные на 1, 2, 3, 4, 5 и 10 мл) и другое оборудование.

В лаборатории необходимо иметь место для окраски микроскопических препаратов, где находятся растворы красителей, спирт для обесцвечивания, фильтровальная бумага и др. Каждое рабочее место должно быть снабжено газовой горелкой (или спиртовкой) и банкой с дезинфицирующим раствором.

Для повседневной работы лаборатория должна располагать необходимыми питательными средами, химическими реактивами, диагностическими сыворотками и другими материалами.

## **1.2. Техника безопасности при работе в ветеринарной лаборатории**

1. Заходить и работать в лаборатории только в халате и белой шапочке (халат должен быть наглухо застегнут, волосы подобраны под шапочку).

2. В лабораторию нельзя вносить посторонние вещи, продукты питания.

3. За каждым студентом под определенным номером закрепляется рабочее место, микроскоп и другое оборудование.

4. На рабочем месте можно размещать только необходимое для выполнения работы оборудование. Обычно это набор красок, промывалка с водой, сливная чашка, чашка с чистыми предметными стеклами, бактериологическая петля, банка с дезинфицирующим раствором.

5. Без ведома преподавателя или обслуживающего персонала нельзя включать электроприборы и аппаратуру.

6. Каждый студент должен строго соблюдать аккуратность в работе, содержать в чистоте рабочее место и оборудование.

7. При распаковке материала, присланного для исследования, необходимо соблюдать осторожность – банки с материалом снаружи обтирать дезинфицирующим раствором и ставить только на подносы.

8. Если в процессе работы инфицированный материал случайно попал на стол, его немедленно удаляют тампоном, смоченным дезинфицирующим раствором. При попадании зараженного материала на кожу, конъюнктиву, в рот – нужно немедленно обратиться к преподавателю.

9. По окончании работы патологический материал, использованные культуры микроорганизмов, инструменты поместить в биксы для обеззараживания.

10. Перед уходом из лаборатории необходимо снять специальную одежду, тщательно обработать руки дезинфицирующим раствором и вымыть с мылом.

### **1.3. Общая схема проведения бактериологической диагностики**

Бактериологическая диагностика начинается с взятия, консервирования и транспортировки патологического материала и включает три этапа исследования:

1. Микроскопические исследования исходного материала позволяют обнаружить наличие в нем возбудителя, изучить его морфологические особенности и тинкториальные свойства.

2. Бактериологические исследования проводятся с целью выделения чистой культуры возбудителя с установлением его морфологических, тинкториальных, культурально-биохимических свойств, а в ряде случаев – антигенной структуры.

3. Биологические исследования (постановка биопробы) проводятся путем заражения лабораторных животных, которые позволяют определить вирулентность возбудителя, а также выделить его в чистой культуре.

Проведенные исследования позволяют определить видовую

принадлежность возбудителя и поставить бактериологический диагноз.

#### **1.4. Правила взятия, консервирования и транспортировки патологического материала**

При отборе и обработке патологического материала для пересылки в лабораторию необходимо придерживаться следующих правил:

- учитывать патогенез болезни и тропизм возбудителя;
- использовать стерильные инструменты и посуду;
- доставлять его в максимально сжатые сроки;
- отбирать материал до начала лечения антимикробными препаратами.

В лабораторию могут быть направлены: а) пробы материала от больных и подозрительных в заболевании животных: кровь, сыворотка крови, кал, моча, молоко, экссудаты, гной, соскобы с кожи и др.; б) патологический материал от трупов животных: абортированный плод, трубчатая кость, лимфоузлы, мышцы, головной мозг, спинной мозг, паренхиматозные органы и др.; в) пробы объектов внешней среды (вода, почва, фураж) клещи, насекомые, грызуны и др.

Трупы мелких животных, а также поросят, ягнят, телят лучше посылать целиком во влагонепроницаемой таре.

Трубчатые кости, отправляемые на исследование, должны быть целыми, с неповрежденными концами, обернутыми в марлю или полотно, смоченное дезинфицирующей жидкостью (5 % раствором карболовой кислоты).

Перед отбором проб молока сосок вымени дезинфицируют 70 % спиртом, сдаивают 100-150 мл молока в банку с дезраствором, а последующие порции в количестве 30 мл – в стерильные сосуды.

Кровь берут в пробирки или колбы из яремной вены с соблюдением стерильности. Кал берут из прямой кишки стеклянной трубкой с оплавленными краями, один конец трубочки закрывают ватно-марлевой

пробкой. После взятия кала трубку опускают в пробирку с физиологическим раствором.

Мочу у животных берут с помощью катетера.

Экссудат берут пастеровскими пипетками или стерильными тампонами.

Соскобы со слизистых оболочек и кожи берут стерильным скальпелем в стерильную посуду с пробкой. Абортированный плод первой половины беременности направляют целиком. От плодов второй половины беременности берут паренхиматозные органы или плод направляют целиком.

От трупов обязательно берут сердце целиком с кровью.

Кусочки селезенки, почек, печени с желчным пузырем берут, используя стерильные инструменты и стерильную посуду.

Желудок и кишечник перевязывают лигатурой с обоих концов и помещают в отдельную посуду.

Мозг для исследования направляют целиком.

При упаковке патологического материала необходимо исключить загрязнение его посторонней микрофлорой из внешней среды.

Патологический материал должен быть доставлен в лабораторию в течение первых 24 часов после его взятия. Если эти условия трудно выполнить, то материал необходимо консервировать 30 % водным раствором глицерина или 10 % водным раствором хлористого натрия или раствором глицерина с хлористым натрием (глицерина – 250,0 мл; хлористого натрия – 5,0 г; дистиллированной воды – 750,0 мл).

Доставка патологического материала в лабораторию осуществляется нарочным. На взятый патологический материал, направляемый в лабораторию, составляется сопроводительное письмо по следующей форме:

**Сопроводительное письмо  
на патологический материал**

В \_\_\_\_\_ ветеринарную лабораторию  
(республиканскую, областную, районную)

Адрес \_\_\_\_\_

При этом для бактериологического, гистологического, токсикологического, микотоксикологического, серологического исследования направляется материал (перечислить с нумерацией весь материал, например: 1 – сердце с кровью, 2 – кусочек печени с желчным пузырем, 3 – трубчатая кость и т.д.)  
от \_\_\_\_\_

(указать вид животного, пол, возраст, инвентарный номер, группу, владельца).

Дата заболевания (животного) \_\_\_\_\_, падежа \_\_\_\_\_

Клиническая картина \_\_\_\_\_

Данные патологоанатомического вскрытия \_\_\_\_\_

Эпизоотологические данные \_\_\_\_\_

Предположительный диагноз \_\_\_\_\_

Прошу исследовать \_\_\_\_\_ на \_\_\_\_\_

Просим исключить заболевание \_\_\_\_\_

Дата \_\_\_\_\_ Должность \_\_\_\_\_

Подпись \_\_\_\_\_ (Фамилия полностью)

Обратный адрес \_\_\_\_\_

## **2. Микроскопические методы исследований**

### **2.1 Устройство микроскопа и правила работы с ним**

Микроскопы позволяют исследовать объекты в проходящем свете. Такие микроскопы состоят из механической и оптической частей.

Механическая часть включает штатив с предметным столиком и тубус. Предметный столик с помощью винтов может перемещаться в горизонтальной плоскости. Он имеет две клеммы, фиксирующие препарат. Верхняя часть штатива – тубусодержатель – может перемещаться с помощью макрометрического и микрометрического винтов, предназначенных соответственно для грубой и точной фокусировки препарата. Микрометрический винт является одной из наиболее хрупких частей микроскопа и обращаться с ним нужно особенно осторожно. Полный поворот его передвигает тубус на 0,1 мм.

В верхней части тубусодержателя находится вращающийся вокруг своей оси револьвер, в отверстия которого ввинчены объективы. В верхний конец тубуса вставляется окуляр.

*Оптическая часть* состоит из объективов, окуляров и осветительного аппарата.

Окуляр вставляется в верхний конец тубуса. Он состоит из двух линз в оправе. На окуляре имеются цифровые обозначения, показывающие степень увеличения изображения в 7, 10, 15 раз.

Объектив представляет собой систему оптических линз. На объективах имеются обозначения, указывающие увеличение, даваемое объективом (x8, x40, x90). Различают сухие и иммерсионные объективы. Объективы, дающие увеличение в 8 и 40 раз, называются сухими, так как при работе между объективом и препаратом находится слой воздуха. Иммерсионным называется объектив, при работе с которым между препаратом и объективом помещается капля иммерсионного (кедрового) масла. Иммерсионное масло имеет оптический коэффициент преломления, близкий к коэффициенту

преломления стекла, благодаря этому световые лучи, не отклоняясь от своего первоначального направления, попадают на линзу объектива. В рассматриваемом микроскопе объектив с увеличением  $\times 90$  является иммерсионным. Общее увеличение, которое дает микроскоп, определяется произведением величины увеличения объектива на величину увеличения окуляра. Отчетливость получаемого изображения зависит от разрешающей способности микроскопа – минимального расстояния между двумя точками, воспринимаемыми раздельно. Световой микроскоп при освещении видимым светом имеет разрешающую способность около 0,2 мкм.

Осветительный аппарат состоит из конденсора, зеркала, ирисовой диафрагмы. Он предназначен для наилучшего освещения препарата. С помощью зеркала лучи, исходящие от источника света, направляются в конденсор, концентрирующий свет в своем фокусе. Поверхность зеркала с одной стороны плоская, с другой вогнутая. При естественном источнике света применяется вогнутое зеркало, при искусственном (осветитель, электролампа) – плоское.

Конденсор с ирисовой диафрагмой представляет собой систему оптических линз и служит для собирания лучей света и направления их с помощью винта. При опускании конденсора поле зрения несколько затемняется, при поднятии – освещается. Ирисовая диафрагма служит для регулирования интенсивности света, которое осуществляется с помощью рычага расширением или сужением отверстия, пропускающего свет к конденсору.

Выпускаются также дополнительные приспособления к микроскопу, которые позволяют максимально использовать все его возможности, облегчают условия работы и значительно расширяют диапазон применения. В микробиологии часто используются следующие приспособления:

1. Конденсор темного поля.
2. Фазово-контрастное приспособление КФ-1, КФ-4 и другие модели.

3. Биноккулярная насадка, приближающая микроскопию к условиям естественного зрения.
4. Осветители ОИ-7, ОИ-19 и другие модели, обеспечивающие оптимальное и стабильное освещение, интенсивность света которых регулируется реостатом.
5. Окуляр-микрометр и объектив-микрометр, предназначенные для измерения микроскопических объектов.
6. Нагревательный столик, который устанавливается вместо предметного столика микроскопа для обеспечения постоянной температуры 37 °С. Применяется для длительного наблюдения за живыми микроорганизмами.
7. Рисовальный аппарат для высококачественной зарисовки препарата, с помощью которого можно одновременно видеть изображение объекта и бумаги, расположенной на столе вблизи микроскопа, и обводить на бумаге контуры объекта.
8. Цветные, нейтральные и тепловые оптические светофильтры устанавливаются между источником света и микроскопом и применяются при микрофотографии и специальных методах микроскопии.
9. Микрофотонасадки МФН-1, МФН-3, и другие модели для фотографирования микроскопических объектов.
10. Микроустановка для цейтраферной (прерывистой) микрокиносъемки, применяющаяся в сочетании с фазово-контрастной микроскопией, позволяет изучить динамику развития и размножения микроорганизмов, влияние на них разных факторов и многие другие вопросы.

Правила работы со световым микроскопом:

1. Установить наилучшее освещение поля зрения микроскопа, для чего:
  - поставить объектив х8 на 1-1,5 см выше от уровня предметного столика микроскопа,

- поднять конденсор до уровня предметного столика (диафрагму открыть),
  - использовать плоское (вогнутое) зеркало и найти наилучшее освещение.
2. Установить препарат, укрепив клеммами.
  3. Нанести каплю иммерсионного масла в центр препарата.
  4. Заменить объектив х8 на х90.
  5. Погрузить объектив х90 в масло с помощью макровинта.
  6. Наблюдая в окуляр, установить макровинтом какое-либо изображение.
  7. С помощью микровинта, вращая его на пол-оборота в ту или иную сторону, установить четкое изображение.

После окончания работы привести микроскоп в порядок для хранения:

1. Поднять макровинтом тубус микроскопа.
2. Убрать препарат.
3. Салфеткой снять с объектива х90 масло и установить объектив х8.
4. Опустить конденсор.
5. Подложить салфетку под объектив и опустить тубус микроскопа.

## **2.2. Виды микроскопии и их назначение**

Для микробиологических исследований используют различные виды микроскопии: световую, люминесцентную, темнопольную, фазово-контрастную, электронную.

Наиболее распространенным методом является световая (оптическая) микроскопия.

В настоящее время отечественная промышленность выпускает самые разнообразные биологические микроскопы: МБИ-1, -2, -3, -4 (микроскоп биологический исследовательский), МБР (рабочий), люминесцентные микроскопы (МЛ-1, МЛ-2), электронные.

При микроскопировании изучают морфологию микроорганизмов, их тинкториальные свойства (отношение к красителям), а также структурные особенности (споры, капсулы), подвижность и др.

*Микроскопия с фазово-контрастным устройством.* С помощью фазово-контрастного устройства различия в фазе световых лучей при прохождении их через прозрачные объекты превращаются в амплитудные, в результате чего объекты становятся контрастными. Метод фазового контраста позволяет увидеть прозрачные объекты более четко (контрастно), но не увеличивает разрешающей способности микроскопа. Основная ценность этого метода состоит в том, что он дает возможность наблюдать живые объекты без их фиксации и окрашивания.

Фазово-контрастное устройство представляет собой приставку к микроскопу и состоит из специальных фазовых объективов, дающих различное увеличение, конденсора с набором кольцевых диафрагм, каждая из которых соответствует определенному объективу, и вспомогательного микроскопа. Все фазовые объективы имеют на оправе букву «Ф».

*Микроскопия в темном поле.* Микроскопия в темном поле основана на освещении объекта косыми лучами света. Лучи не попадают в объектив и остаются невидимыми для глаза, поэтому поле зрения выглядит совершенно черным. Если препарат содержит микроорганизмы, то косые лучи в определенной степени отражаются от их поверхности и, отклоняясь от своего первоначального направления, попадают в объектив. В этом случае на интенсивно черном поле видны ослепительно яркие светящиеся объекты. Такое освещение достигается применением специального темнопольного конденсора, имеющего затемненную среднюю часть. Поэтому центральные лучи света, идущие от зеркала, задерживаются, а в плоскость препарата попадают только боковые лучи, отраженные от зеркальных поверхностей, расположенных внутри конденсора.

При микроскопировании в темном поле можно увидеть объекты за пределами видимости обычного микроскопа. Однако наблюдение объектов в темном поле позволяет различить только их контуры и не дает возможности рассмотреть внутреннее строение.

*Люминесцентная микроскопия.* Люминесцентный микроскоп состоит из

сильного источника ультрафиолетового света, светофильтров и биологического микроскопа. Между источником света и зеркалом микроскопа устанавливается сине-фиолетовый фильтр. Лучи света с короткой волной, попадая на препарат, возбуждают в нем свечение. На окуляр микроскопа ставят желтый фильтр, который отсекает сине-фиолетовые лучи и пропускает длинноволновые лучи, видимые глазом. В люминесцентной микроскопии большое значение имеет иммунофлюоресцентный метод с использованием специфических люминесцентных сывороток.

Их приготовление основано на способности некоторых флюорохромов, например изоцианат флюоресцеина, вступать в химическую связь с сывороточными белками без нарушения их иммунологической специфичности.

При прямом иммунофлюоресцентном методе Кунса специфические антитела, связавшиеся с микробными антигенами, образуют комплексы, которые светятся при люминесцентной микроскопии препаратов. При непрямом методе вначале антиген обрабатывают гомологичными нефлюоресцирующими антителами, образуется комплекс антиген - антитело, для обнаружения которого применяют флюоресцирующую антивидовую сыворотку, соответствующую виду животного продуцента гомологичных антител. Антивидовые сыворотки получают, иммунизируя животных глобулинами животных тех видов, которые служат продуцентами антимикробных антител.

*Электронная микроскопия.* Электронная микроскопия делает возможным наблюдение объектов, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности светового микроскопа (0,2 мкм). Электронный микроскоп (ЭМ) применяется для изучения вирусов, тонкого строения различных микроорганизмов, макромолекулярных структур и других субмикроскопических объектов.

В ЭМ световые лучи заменяет поток электронов, имеющий при

определенных ускорениях длину волны около 0,005 нм, т.е. почти в 100 000 раз короче длины волны видимого света. Высокая разрешающая способность электронного микроскопа, практически составляющая 0,1-0,2 нм, позволяет получить общее полезное увеличение до 1000000 раз.

Наряду с приборами «просвечивающего» типа, используют «сканирующие» электронные микроскопы, обеспечивающие рельефное изображение поверхности объекта. Разрешающая способность этих приборов значительно ниже, чем у электронных микроскопов «просвечивающего» типа.

### **3. Приготовление препаратов для микроскопии**

#### **3.1. Техника приготовления препаратов для микроскопии**

Препараты для микроскопии готовят на предметных стеклах. Для работы необходимо иметь специально приготовленные предметные и покровные стекла, которые должны быть чистыми и обезжиренными.

Новые стекла моют в теплой воде с мылом. Для обезжиривания их помещают на 2-3 дня в смесь Никифорова (равные объемы спирта и эфира в сосуде с притертой пробкой).

Если предметные или покровные стекла были в употреблении, их обрабатывают хромовой смесью, промывают водой, кипятят 30-40 мин в 5 % растворе соды.

Необработанные стекла можно обезжирить, натерев их мылом, а затем почистить сухой тканью. Капля воды, нанесенная на хорошо обезжиренное стекло, растекается равномерно. На недостаточно обезжиренном стекле вода распадается на мелкие капли.

В зависимости от характера исследуемого материала при его взятии используют бактериологическую петлю или пастеровскую пипетку. Петлю делают из платиновой или нихромовой проволоки длиной 5-6 см и закрепляют в петледержателе. На конце проволоки делают петлю. Петлю

держат, как карандаш. Рабочую часть петли стерилизуют в пламени горелки в вертикальном положении, сначала конец петли, затем петледержатель.

Приготовление окрашенного препарата (мазка) состоит из нескольких этапов: 1) приготовление; 2) высушивание; 3) фиксация; 4) окраска.

### *1. Приготовление мазка*

На предметном стекле с обратной стороны восковым карандашом обозначают место мазка диаметром 2-3 см.

Из культуры, выращенной на жидкой питательной среде, стерильной петлей берут каплю материала и распределяют на предметном стекле. Из культур, выращенных на плотной среде, петлей с поверхности берут небольшое количество материала, размещают в заранее нанесенной на предметное стекло капле физиологического раствора или воды и размазывают по стеклу.

Из плотного патологического материала (печень, почки, селезенка и др.) делают мазки-отпечатки. Для этого стерильными ножницами отрезают кусочек органа и прикладывают к предметному стеклу, делая один или несколько отпечатков.

### *2. Высушивание мазка*

Мазки высушивают на воздухе при комнатной температуре или в термостате.

### *3. Фиксация мазка*

Мазки фиксируют после полного высыхания с целью:

- 1) закрепить мазок на стекле;
- 2) убить бактерии;
- 3) убитые бактерии лучше воспринимают краску.

Фиксацию мазков осуществляют одним из двух способов: физическим и химическим. Физический метод заключается в трехкратном проведении обратной стороной мазка через пламя спиртовой горелки, задерживая в пламени на 1-2 секунды.

При химическом способе мазок погружают в жидкости:

- а) этиловый спирт 96 % на 10-15 минут, или
- б) смесь равных объемов спирта и эфира на 10-15 мин, или
- в) ацетон – 5 минут.

#### 4. Окраска мазка

Бактерии различно относятся к красителям, эти свойства называют тинкториальными.

### 3.2. Бактериологические краски

Наиболее широко в микробиологии используют анилиновые красители основного и нейтрального характера. Для окраски мазков применяют красители:

- 1) красные (фуксин основной, нейтральный);
- 2) синий (метиленовый синий);
- 3) фиолетовые (генцианвиолет, кристаллвиолет, метилвиолет);
- 4) зеленые (бриллиантовая зелень, малахитовая зелень).

Все применяемые красители поступают в лаборатории в сухом порошкообразном или кристаллическом виде. Из таких красителей, как основной фуксин, генцианвиолет, метиленовая синь, заранее готовят насыщенные спиртовые растворы.

Рецепты красителей:

#### 1. Карболовый фуксин Циля

Основной фуксин	1 г
Спирт 95 %	10 мл
Карболовая кислота кристаллическая	5 г
Глицерин	5 – 6 капель
Вода дистиллированная	100 мл

Через 48 ч краситель фильтруют. Срок хранения длительный.

## *2. Разведенный фуксин Пфейффера*

Фуксин Циля	1 мл
Вода дистиллированная	9 мл
Срок хранения не более	1 суток.

## *3. Щелочная метиленовая синь Лефлера*

Насыщенный раствор сини спиртовой	30 мл
1 % раствор едкого натра или калия	1 мл
Вода дистиллированная	100 мл
Срок хранения длительный.	

## *4. Карболовый генцианвиолет*

Насыщенный спиртовой раствор генцианвиолета	10 мл
5 % раствор карболовой кислоты	100 мл

Эту краску чаще всего используют при окраске по Граму в модификации по Синеву, пропитывая ей и высушивая полоски фильтровальной бумаги.

## *5. Раствор Люголя*

Йодид калия	2 г
Дистиллированная вода	10 мл
Кристаллический йод	1 г

Смесь хорошо закупоривают и ставят на сутки в термостат, после чего добавляют 300 мл дистиллированной воды.

### **3.3. Простой метод окрашивания препарата**

Окраску препаратов производят на специально оборудованном столе, покрытом линолеумом, пластиком, стеклом. На столе должен быть сосуд с

дистиллированной водой, емкость для слива красителей, подставка из двух стеклянных трубочек, соединенных с обеих сторон резиновыми трубками, флаконы для красок с пипетками и резиновыми баллончиками.

При простом методе окраски пользуются одним красителем: разведенным фуксином (1-2 минуты); щелочной метиленовой синью Леффлера (3-5 минут). Фиксированный препарат помещают мазком вверх на подставку. На мазок пипеткой наносят краситель так, чтобы он весь был покрыт раствором. По истечении необходимого времени краситель сливают, препарат промывают водой и высушивают между листами фильтровальной бумаги или на воздухе (мазки из крови и др.). На сухой мазок наносят каплю иммерсионного масла и микроскопируют препарат иммерсионным объективом микроскопа. Простой метод окрашивания препаратов позволяет установить наличие или отсутствие бактерий в исследуемом материале, изучить их морфологию (форму, расположение).

### 3.4. Изучение основных форм бактерий

При изучении окрашенных препаратов бактерий под иммерсионной системой оптического микроскопа хорошо различимы три основные их формы: шаровидная (кокки), палочковидная или цилиндрическая (бактерии и бациллы) и извитая (вибрионы, спириллы, спирохеты).

**Кокки.** По форме кокки могут быть сферическими, эллипсоидными, бобовидными и ланцетовидными. В зависимости от взаимного расположения они подразделяются на:

1. Микрококки (*micrococcus*), расположение клеток беспорядочное и закономерности в их делении не наблюдается.

2. Стафилококки (греч. *staphylococcus* - виноградная гроздь), скопление особей образуется за счет деления их в нескольких плоскостях, напоминает виноградные гроздья.

3. Диплококки (греч. *diplococcus* - двойной) – клетки, соединенные

попарно. Делятся они в одной плоскости. Диплококки могут иметь круглую, ланцетовидную форму или форму боба, вогнутые стороны которого обращены друг к другу.

4. Стрептококки (греч. *streptococcus* - цепочка) – цепочки различной длины, образованные из клеток, которые делятся только в одной плоскости.

5. Тетракокки (греч. *tetracoccus* - четыре) – кокки, которые располагаются по четыре и делятся в двух взаимно перпендикулярных плоскостях.

6. Сарцины (*sarcio*) – кокки, образующие правильные пакеты по 8-16 клеток.

**Палочковидные бактерии.** Это самая многочисленная группа бактерий, которая подразделяется на две группы: палочки, не образующие споры – бактерии (*bacterium*) и образующие споры – бациллы (*bacillus*).

Палочки, у которых диаметр споры превышает ширину вегетативной клетки, принято называть клостридиями (*clostridium*).

**Извитые бактерии.** Вибрионы – клетки образуют 1/2-1/4 завитка спирали и напоминают запятую (*vibrio*); спириллы (*spirillum*) – бактерии, имеющие форму спирально извитых палочек с 4-6 извитками; спирохеты (*spirochetum*) – бактерии, тело которых представлено множеством завитков вдоль осевой нити.

## **4. Дифференциально-диагностические методы окрашивания бактерий**

### **4.1. Сложные (дифференциальные) методы окрашивания бактерий**

Эти методы позволяют обнаружить бактерии в исследуемом материале и изучить их морфологические особенности. Так же эти методы дают возможность выявить различия химического состава бактериальной клетки (окраска по Граму), а также установить ее структурные особенности – наличие спор, капсул и др. Все эти признаки учитываются в лабораторной

практике при определении вида бактерий.

Сложные методы окрашивания заключаются в том, что применяют несколько реактивов и растворов красителей.

## 4.2. Окрашивание по Граму

Это универсальный дифференциально-диагностический метод окраски. Все бактерии по своему отношению к окраске этим способом делятся на две группы: грамположительные (грамположительные) и грамотрицательные (грамнегативные). Техника окрашивания состоит в следующем. На обычно приготовленный и фиксированный мазок накладывают небольшой кусочек фильтровальной бумаги, заранее пропитанный раствором генцианвиолета (модификация А.В. Синева) и смачивают 2-3 каплями воды. Окраска продолжается в течение 2 минут. Фильтровальную бумагу с генцианвиолетом удаляют и на мазок наносят несколько капель раствора Люголя на 2 минуты (мазок чернеет). Сливают люголевский раствор и действуют 96 % спиртом 30 секунд. Промывают водой. Дополнительно окрашивают разведенным фуксином. Промывают водой, высушивают между листами фильтровальной бумаги и микроскопируют под иммерсионным объективом.

Микрокартина: грамположительные микроорганизмы окрашиваются в темно-фиолетовый цвет, грамотрицательные – в розовый (до красного). Шарообразные формы микроорганизмов в большинстве красятся по Граму положительно, извитые формы – отрицательно, палочковидные формы встречаются как грамположительные, так и грамотрицательные.

Для получения правильных результатов рекомендуется использовать суточные культуры микробов, применять свежеприготовленный раствор разведенного фуксина и проводить окрашивание параллельно с известными культурами микроорганизмов.

Механизм окраски по Граму объясняется физико-химическими

особенностями строения цитоплазмы и клеточной стенки грамположительных и грамотрицательных бактерий. У грамположительных содержится значительно больше рибонуклеиновой кислоты и белков в цитоплазме и пептидогликана в клеточной стенке. Поэтому при обработке препарата генцианвиолетом и раствором Люголя у грамположительных бактерий образуется более прочное соединение ионов йода и красителя.

При обработке спиртом грамположительные бактерии удерживают краситель, а грамотрицательные обесцвечиваются и окрашиваются дополнительно разведенным фуксином в розово-красный цвет.

#### **4.3. Специальные методы окрашивания (по методу Циля-Нильсена и Козловского)**

Кислотоустойчивые бактерии – грамположительные, однако повышенное содержание в клеточной стенке липидов и миколовой кислоты придает клетке гидрофобные свойства, затрудняющие проникновение в нее красителя и усиливающие ее устойчивость к воздействию растворов кислот. Исходя из этих особенностей, был разработан метод, с помощью которого выявляют кислотоустойчивые виды.

Фиксированный мазок окрашивают через фильтровальную бумажку (1 см<sup>2</sup>) карболовым фуксином Циля с подогреванием до появления паров; оставляют на «мостике» до остывания, повторяют нагрев. Общая экспозиция 3-7 минут. Бумажку удаляют, краску сливают, на препарат, не промывая водой, наносят 3-5 % раствор серной кислоты на 5-7 с. Затем препарат промывают водой и окрашивают раствором метиленовой сини Леффлера 4-5 минут, после чего промывают водой и подсушивают фильтровальной бумагой.

Микроскопическая картина: кислота не обесцветила кислотоустойчивые бактерии, и они окрашены в красный цвет; некислотоустойчивые бактерии восприняли дополнительный синий краситель.

Окраска бруцелл по методу Козловского: препарат окрашивают 2 % водным раствором сафранина 2 минуты, промывают водой, докрасивают 1 % водным раствором малахитовой зелени 1 минуту, промывают водой. Микроскопическая картина: бруцеллы красные, остальные бактерии зеленые.

#### 4.4. Окраска спор

Некоторые виды патогенных бактерий способны к образованию устойчивой формы, которая получила название – спора. К спорообразованию способны возбудители сибирской язвы, столбняка, ботулизма и др., а также многие почвенные сапрофиты.

В отличие от вегетативных клеток споры устойчивы к кипячению в воде, действию дезинфицирующих веществ, к высушиванию и другим факторам. Все это дает возможность спорообразующим микроорганизмам длительное время сохраняться во внешней среде – воде, почве, навозе и т.д.

Возбудитель сибирской язвы в виде спор в почве может сохраняться десятилетиями. В связи с этим сибиреязвенные трупы обязательно сжигают.

К окраске спор в лабораторной практике прибегают сравнительно редко. Обычно ограничиваются обнаружением непрокрашиваемых округлых или овальных образований внутри бактериальных клеток при окраске простым методом или по Граму.

##### *Метод Златогорова*

1. Фиксированный препарат окрашивают карболовым фуксином при подогревании до 10 минут.

2. Обесцвечивают 2 % раствором серной кислоты 3-5 секунд.

3. Промывают водой.

4. Дополнительно окрашивают метиленовой синью 4-5 минут.

Микрокартина: споры - красные, вегетативные клетки - синие.

### *Метод Пешкова*

1. Фиксированный препарат окрашивают метиленовой синью при подогревании 3 мин.

2. Окрашивают 1 % водным раствором нейтральрота 10 секунд.

Микрокартина: споры - синие, вегетативные клетки - красные.

Обнаружение спор у микробов является видовым признаком.

## **4.5. Окраска капсул**

Некоторые виды патогенных бактерий в инфицированном организме способны образовывать вокруг себя слизистый слой, который называют капсулой. Капсулу образуют возбудители сибирской язвы, диплококковой септицемии и др.

Физиологическое значение капсулы у патогенных микробов определяют как защиту от влияния факторов иммунитета организма. Обнаружение капсулы у бактерии является видовым признаком, особое значение это имеет при бактериологической диагностике сибирской язвы – по результатам такого исследования немедленно дают предварительный ответ.

### *Метод Михина*

1. Фиксированный мазок-отпечаток, приготовленный из патматериала, окрашивают метиленовой синью при подогревании до 7 минут.

2. Промывают водой.

Микрокартина: капсула – бледно-розовая, бактерии – синие.

### *Метод Ольта*

1. Фиксированный мазок-отпечаток, приготовленный из патматериала, окрашивают 2 % раствором сафранина при легком подогревании 5-7 минут.

2. Слегка промывают водой.

Микрокартина: капсула – желтая, бактерии – красные.

### *Метод Романовского-Гимзе*

1. Фиксированный мазок-отпечаток помещают мазком вниз в чашку Петри, на дне которой устанавливают подставки (спички). Под препарат наливают краску Гимзе. Краску предварительно разводят дистиллированной водой 1:10.

2. Окрашивают разведенной краской Гимзе 50-60 минут.

3. Промывают водой.

Микрокартина: капсула – бледно-розовая, бактерии – синие.

Обнаружение капсул у микробов является видовым признаком.

## **5. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Этот этап предусматривает выполнение работ в следующей последовательности:

- приготовление питательных сред;
- определение и установление в них оптимальной концентрации водородных ионов (рН);
- выбор метода стерилизации питательных сред и ее проведение;
- выделение чистых культур бактерий (посевы и пересевы, методы культивирования):
  - изучение культуральных свойств бактерий на жидких и плотных питательных средах;
  - изучение биохимических (ферментативных) свойств бактерий (сахаролитических, протеолитических, гемолитических и др.);
  - исследование бактерий на подвижность в препаратах «висячая» или «раздавленная» капля, приготовленных из чистых культур выделенных бактерий;
  - определение чувствительности бактерий к антибиотикам.

## 5.1. Назначение и классификация питательных сред для бактерий

Бактериологические исследования связаны с использованием питательных сред, которые предназначены для выращивания микроорганизмов как в лабораториях, так и в промышленных условиях.

Питательные среды необходимы для выделения, накопления, сохранения, изучения культуральных и биохимических свойств микроорганизмов. Они должны включать в себя все компоненты, необходимые для конструктивных и энергетических процессов бактериальной клетки, т.е. должны иметь источники углерода, азота, кислорода, водорода, макро- и микроэлементы, «факторы роста» (витамины).

Метаболизм микроорганизмов разнообразен, следовательно, различны их потребности в источниках питания. Отсюда следует, что универсальных питательных сред, одинаково пригодных для культивирования всех видов микроорганизмов, не существует.

Вместе с тем, можно сформулировать следующие требования, предъявляемые к питательным средам:

- питательные среды должны содержать все питательные вещества, обеспечивающие оптимальный рост микроорганизмов в искусственных условиях;

- в физико-химическом отношении они должны иметь определенную концентрацию водородных ионов (рН), окислительно-восстановительный потенциал, влажность, вязкость и изотоничность;

- питательные среды должны быть стерильными и, по возможности, прозрачными.

По составу среды для культивирования микроорганизмов делятся на две группы: натуральные (естественные) и синтетические (таблица 1).

Таблица 1 – Классификация питательных сред

По составу	По физическим свойствам	По назначению
<p>Естественные: входят компоненты растительного и животного происхождения</p> <p>Синтетические: включают химические компоненты, растворенные в дистиллированной воде</p>	<p>Жидкие</p> <p>Полужидкие</p> <p>Плотные</p> <p>Сухие</p>	<p>Простые</p> <p>Специальные</p> <p>Дифференциально-диагностические</p> <p>Элективные</p>

В состав естественных сред входят компоненты растительного и животного происхождения: овощные, фруктовые соки, молоко, кровь, экстракты из мяса и т.д. Широко применяются из этой группы – мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный агар (МПА).

Синтетическими называют среды, в состав которых входят определенные химические соединения, растворенные в дистиллированной воде. В настоящее время микробиологи располагают синтетическими средами, не уступающими по своему составу натуральным.

По назначению питательные среды разделяются на обычные (простые), специальные, дифференциально-диагностические, элективные (избирательные).

К обычным средам относятся мясо-пептонный бульон и агар, на них растут многие виды микроорганизмов.

При отсутствии роста микробов на простых средах применяются специальные среды, в состав которых входят углеводы, сыворотка крови, кровь, асцит и др.

Дифференциально-диагностические среды позволяют достаточно быстро отличить одну группу бактерий от другой. К ним относятся среды для изучения сахаролитических, протеолитических свойств и др.

Элективные среды обеспечивают преимущественное развитие одного вида или группы микроорганизмов и менее пригодны или даже совсем не пригодны для развития других. В состав этих сред входят химические компоненты, которые задерживают развитие определенных групп микроорганизмов (желчь, краски, антибиотики, азид натрия и др.).

По физическому составу различают жидкие, полужидкие, плотные, сухие среды. Жидкие применяются для выяснения физиолого-биохимических особенностей микроорганизмов, для накопления биомассы или продуктов обмена; плотные – для выделения чистых культур (получение изолированных колоний), для хранения культур, количественного учета микроорганизмов и т.д.

## **5.2. Приготовление питательных сред**

### ***Обычные питательные среды***

К ним относятся мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар (МПА). Основой для приготовления этих сред служит мясной экстракт. Для его приготовления берут 500 г свежей говядины или телятины, освобожденной от костей, жира и сухожилий, пропускают через мясорубку, фарш заливают 1 литром водопроводной воды, хорошо размешивают. Оставляют на сутки в прохладном месте или помещают на 2 часа в термостат при 37 °С. Мясной экстракт отжимают через марлю. Кипятят в течение 20 минут для свертывания белков, дают остыть. Фильтруют через ватный фильтр, доливают водой до первоначального объема. Приготовленный мясной экстракт разливают по флаконам и 20-30 минут стерилизуют в автоклаве. Правильно приготовленный мясной экстракт представляет собой слабокислую (рН=6,2) прозрачную желтоватую жидкость без белков. В ней содержится большое количество аминокислот, солей, углеводов, факторов роста и экстрактивных веществ.

*Мясо-пептонный бульон (МПБ)* – жидкая питательная среда, прозрачная.

В 1 л мясного экстракта растворяют при подогревании и помешивании 10 г пептона (1 %) и 5 г (0,5 %) поваренной соли. Устанавливают рН среды 7,6. Кипятят 30-45 минут для выпадения осадка. Охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр, заливают водой до первоначального объема, проверяют рН. Разливают по пробиркам, флаконам и стерилизуют 15-20 минут в автоклаве при давлении 1 атм.

Пептон представляет собой первичные продукты гидролизата белка. Он состоит из смеси альбумоз, полипептидов и аминокислот, полученных путем пепсинно-трипсинного гидролиза. На мясокомбинатах для производства сухого пептона используют фибрин, кровь и другие отходы. Сушат пептон в распылительной вакуум-сушилке.

*Мясо-пептонный агар (МПА)* – плотная питательная среда. Для его приготовления к мясо-пептонному бульону добавляют 2-3 % агар-агара, расплавляют в водяной бане, фильтруют, разливают по колбам или пробиркам и стерилизуют в автоклаве при давлении 1 атм 15-20 минут.

Для приготовления «скошенного» МПА среда, разлитая до  $\frac{1}{4}$  высоты пробирки, вновь расплавляется и помещается на наклонную плоскость.

Для уплотнения сред чаще всего используют агар-агар, который представляет собой полисахарид, получаемый из красных морских водорослей. Большинство микроорганизмов не используют его в качестве питательного субстрата. В воде агар образует гели, плавящиеся при  $100^{\circ}$ , а затвердевающие при  $40^{\circ}\text{C}$ .

*Мясо-пептонный желатин (МПЖ)* – к мясо-пептонному бульону добавляют 10-15 % мелко нарезанного желатина, после набухания его нагревают до полного расплавления. Устанавливают рН 7,0-7,1 и стерилизуют текучим паром 3 дня подряд по 30 мин. Для обнаружения протеолитических свойств культуру бактерий сеют уколом в столбик желатина, посеvy оставляют на несколько дней при комнатной температуре для учета характера разжижения.

Желатин представляет собой белок, который получают путем выварки

костей, хрящей и др.

### ***Специальные среды***

*Сахарный МПБ и МПА.* К обычным средам добавляют 1-2 % глюкозы, разливают по пробиркам и стерилизуют текучим паром дробно или автоклавируют при 0,5 атм 20 минут.

*Сывороточный МПБ и МПА.* К МПБ добавляют 5-10 % стерильной сыворотки крови и разливают по пробиркам.

МПА расплавляют, остужают до 45-50 °С и добавляют 5-10 % сыворотки крови. Полученную среду разливают в чашки Петри или пробирки.

*Свернутая сыворотка.* Сыворотку разливают по пробиркам (4-5 мл) и в наклонном положении свертывают в аппарате Коха. Свертывание проводят при 80 °С в течение полутора часов. Среду контролируют на стерильность в термостате в течение суток.

*Кровяной МПА.* К стерильному расплавленному и охлажденному до 45 °С МПА, разлитому в пробирки или чашки Петри, стерильно прибавляют 5-10 % дефибринированной крови (кролика, барана).

### ***Дифференциально-диагностические среды***

*Жидкие среды Гисса.* Для их приготовления используется 1 % пептонная вода (рН=7,0) с 0,5 % соответствующего углевода и индикатора (бромтимолблау, Андресэ и др.). Улавливание газа производится путем помещения на дно пробирки поплавков (стеклянных трубок), запаянных с одного (верхнего) конца.

Для улавливания пузырьков газа можно также к жидкой среде Гисса добавить 0,5 % агар-агара.

Стерилизуют среды Гисса при 110 °С в течение 10 минут или текучим паром в течение 30 минут 3 дня подряд.

В настоящее время среды с углеводами выпускают в сухом виде фабричным способом. Они состоят из питательного агара, соответствующего

углевода и индикатора ВР (смесь водного голубого красителя с розоловой кислотой). Для приготовления полужидкой среды 2 г сухой среды растворяют при подогревании в 100 мл дистиллированной воды и доводят до кипения, разливают в стерильные пробирки и стерилизуют 10 минут при 110 °С или дробно. Среда имеет цвет питательного агара.

При ферментации углеводов с образованием кислоты наблюдается посинение среды, с образованием щелочи – покраснение.

Для выделения чистой культуры возбудителей кишечных болезней и их дифференциации от *E. coli* длительное время использовались среды Эндо и Левина, в настоящее время применяется главным образом среда Плоскирева.

*Среда Эндо*, выпускаемая в сухом виде, готовится следующим образом: 5 г порошка растворяют при подогревании в 100 мл дистиллированной воды, кипятят 2-3 минуты при постоянном помешивании и разливают в чашки.

При отсутствии сухой среды Эндо она может быть приготовлена *ex tempore*. К 100 мл стерильного расплавленного МПА добавляют 1 г лактозы, растворенной и прокипяченной в 5 мл дистиллированной воды, и 1 мл насыщенного спиртового раствора основного фуксина, обесцвеченного перед добавлением к агару 10 % водным раствором сульфита натрия до бледно-розового оттенка. Среду смешивают, разливают по чашкам и подсушивают в термостате.

*E. coli* ферментирует лактозу с образованием кислоты. Обесцвеченный фуксин в среде Эндо с изменением реакции в кислую сторону приобретает первоначальный цвет, что и обуславливает красный с металлическим блеском цвет колоний *E. coli*. Патогенные бактерии – возбудители кишечных болезней – не ферментируют лактозу и растут на среде Эндо в виде бесцветных колоний.

*Среда Левина*. Сухая среда Левина готовится аналогично сухой среде Эндо. При необходимости она может быть приготовлена *ex tempore*. К 100 мл стерильного расплавленного питательного агара добавляют 2 г лактозы, растворенной и прокипяченной в небольшом количестве дистиллированной

воды, 2 мл 0,5 % предварительно прогретого водного раствора метиленовой сини и 1,5 мл 1 % водного раствора эозина (растворы красителей готовят заранее, стерилизуют текучим паром), 0,2 г двухосновного фосфорнокислого калия ( $K_2HPO_4$ ), среду перемешивают и разливают по чашкам. Среда темно-лилового цвета. Колонии *E. coli* имеют сине-черный цвет, бактерии, не ферментирующие лактозу, образуют бесцветные колонии. Данная среда, как и среда Эндо, используется в настоящее время главным образом для выделения *E. coli*.

*Среда Плоскирева* содержит сухой питательный агар, набор различных солей, соли желчных кислот, бриллиантовую зелень и нейтральный красный индикатор. *E. coli* в связи с подавлением ее жизнедеятельности солями желчных кислот и бриллиантовой зеленью, растут на этой среде скудно, в виде колоний розового цвета. Микробы из воздуха не растут (чашки в открытом виде подсушивают на воздухе в течение 1 часа). Патогенные бактерии сальмонеллы образуют на среде бесцветные прозрачные колонии.

### ***Элективные среды***

Среда Сент-Иваньи, в состав которой входит МПА с 0,1 % кристаллвиолета и 1 % азидата натрия. На этой среде вырастает только возбудитель рожи свиней.

Для выделения чистой культуры гриба рода кандиды применяют среду, содержащую МПА со стрептомицином.

### ***Сухие питательные среды***

В последние годы в бактериологии широко используются сухие питательные среды, что позволяет лабораториям избавиться от громоздкого процесса приготовления сред.

Для этого навеску, указанную на этикетке, всыпают в емкость с холодной дистиллированной водой и кипятят до полного растворения порошка.

Выпускают обычные, специальные, дифференциально-диагностические и элективные сухие среды.

Часто приходится разливать питательные среды мерно. С этой целью в лабораторной практике используют специальные приспособления.

Определение рН питательных сред производится электрометрическим методом – потенциометром. После установления рН питательной среды (МПБ обычно имеет рН 6,6-6,8) доводят его до нужного (рН 7,4). Для этого по каплям микропипеткой добавляют 0,1 н. едкий натр в стакан с питательной средой, в который опущены электроды потенциометра. После установления количества щелочи, необходимой для получения 7,4 на 1 мл среды делают расчет на нужное количество. Если на 1 мл затрачено 0,08 мл 0,1 н. раствора едкого натра, то к 10 литрам среды необходимо добавить 800 мл щелочи.

Во избежание разбавления питательной среды для получения необходимого рН к ней добавляют 1 н. раствор едкого натра, т.е. всего 80 мл.

Для определения рН плотных питательных сред расплавленный агар или желатин, учитывая буферность этих сред, разводят в 7 раз теплой дистиллированной водой. После установления соответствующего рН среду кипятят, фильтруют, осветляют, разливают во флаконы, пробирки и стерилизуют. Следует учитывать, что после стерилизации среда становится более кислой на 0,2 единицы.

## **6. СТЕРИЛИЗАЦИЯ**

Стерилизацией называют процесс, направленный на полное уничтожение всех живых микроорганизмов в стерилизуемых объектах, как в лабораториях, так и в промышленных условиях.

Большое разнообразие стерилизуемых объектов потребовало разработки различных методов стерилизации.

Главными требованиями в стерилизации являются ее надежность и

сохранение качества стерилизуемых объектов.

Различают физический, химический и механический методы стерилизации. К физическим методам стерилизации относят действие высокой температуры, ультрафиолетовых лучей, ионизирующей радиации, ультразвука и др. Химические методы используют для обработки вакцин, сывороток и других объектов, консервируемых различными антисептиками. Механический метод – фильтрация жидкостей через бактериальные фильтры. С помощью этого метода механически очищают жидкость от бактерий. Фильтрующиеся формы бактерий, вирусы через такие фильтры проходят.

## **6.1. Физические методы**

### ***Термическая обработка***

Имеется множество вариантов, но термическая обработка применима лишь в отношении термоустойчивых материалов и сред.

**1.** Стерилизация в пламени (фламбирование). Этот способ применяется для стерилизации бактериологических петель, игл, предметных и покровных стекол, пинцетов и других мелких металлических и стеклянных предметов.

**2.** Стерилизация кипячением используется в основном для обработки игл, шприцев, хирургических инструментов. Она проводится в специальных стерилизаторах в течение 30 минут. Для повышения точки кипения и устранения жесткости воды добавляют 1 % соды. Этот метод не обеспечивает полной стерилизации, так как споры некоторых бактерий выдерживают кипячение в течение нескольких часов.

**3.** Стерилизация сухим жаром проводится в сухожаровых шкафах (металлических двустенных шкафах, изолированных асбестом или линолеумом, с отверстием в верхней части для термометра). Электрические аппараты для стерилизации горячим воздухом разнообразны по форме, снабжены хорошей тепловой изоляцией.

Необходимая температура поддерживается автоматически при помощи

терморегулятора, работу которого можно наблюдать с помощью контрольной лампы. Стерилизуют горячим воздухом при 160 °С в течение 1,5 часа с момента достижения этой температуры.

При 170 °С бумага и вата желтеют, при более высоких температурах обугливаются. В сухожаровых шкафах стерилизуют лабораторную посуду: чашки Петри, вложенные в специальные металлические пеналы или обернутые в бумагу по одной или несколько штук в пачке, пастеровские и градуированные пипетки, закрытые с одного конца ватой, находящиеся в металлических пеналах или завернутые в бумагу по 10-15 штук. Пробирки и колбы закрывают ватными пробками.

**4.** Стерилизация паром является наиболее эффективным методом и осуществляется двумя способами: насыщенным паром под давлением и текучим паром.

а) *Стерилизация паром под давлением* производится в автоклаве, который представляет собой толстостенный котел цилиндрической формы, покрытый снаружи кожухом, закрывающийся крышкой.

Рабочая камера получает пар от парообразователя, помещенного под камерой и соединенного с ней патрубком. Вода в котел поступает через воронку, соединенную с указательной трубкой. Вода в котле нагревается электрическим током от сети. Крышка автоклава имеет внутри электронагревательный элемент с регулятором, посредством которого регулируется нагрев воды. Контроль за давлением производится с помощью манометра. Для автоматического выхода пара при превышении максимального рабочего давления предусмотрен предохранительный клапан. На шкале манометра обозначается только избыточное давление, нормальное же давление соответствует показанию «О». Работа с автоклавом требует строгого выполнения правил, предусмотренных специальной инструкцией, прилагаемой к каждому аппарату.

Инструкцией предусматривается:

1. Перед работой проверить исправность всех частей автоклава.

2. Через воронку налить воду в маленький котел и закрыть кран.

3. Загрузить стерилизационную камеру материалом, подлежащим стерилизации, закрыть крышку.

4. Включить нагревательную систему при открытых паровыпускающих кранах; с появлением пара будет выходить воздух, а затем пар с конденсатом. Кран закрывают, когда воздух из автоклава полностью вытеснен, о чем свидетельствует непрерывная струя пара. При наличии воздуха в автоклаве показания манометра не соответствует температуре.

5. По окончании стерилизации выключают электронагревательный элемент. После того как давление упадет до нуля, открывают спускной кран и приступают к разгрузке автоклава.

При давлении в 0,5 атм температура в автоклаве равна 110-112 °С, в 1 атм – 120-121 °С, в 1,5 атм – 124-126 °С, в 2 атм – 132-133 °С.

Для контроля работы автоклава между стерилизуемыми предметами кладут стеклянную запаянную трубку с веществом, имеющим определенную точку плавления (бензонафтол – 110 °С, бензойная кислота – 120 °С и др.), и небольшим количеством анилинового красителя. Эффективность стерилизации можно также проверить, помещая в автоклав материал, заведомо зараженный спорами бацилл.

б) *Стерилизация текучим паром* производится в аппарате Коха, широко применяющемся в лабораторной практике. Аппарат Коха представляет собой металлический цилиндр, покрытый теплоизоляционным материалом. В конической крышке аппарата имеется отверстие для выхода пара. В нижней части расположены кран и водомерная трубка. Внутри имеется подставка для стерилизуемых материалов. На дно аппарата заливается вода, которая не должна касаться стерилизуемого материала. Стерилизуют при 100 °С в течение 30-60 минут с момента начала кипения воды, при этом вегетативные формы микробов погибают, а споры сохраняются, и при комнатной температуре через сутки прорастают. Повторное воздействие паром снова обезвреживает вегетативные формы. Третье прогревание убивает все

остальные бактерии, развивающиеся из спор. Стерилизуют таким методом (дробно) питательные среды и другие материалы, изменяющие свои свойства при температуре выше 100 °С: молоко, желатину, картофельные среды и среды с углеводами.

Стерилизация текучим паром может производиться в автоклаве при незавинченной крышке и открытом выпускном кране. Текучим паром стерилизуют и одновременно уплотняют сыворотки, яичные и другие среды. Свертывание сыворотки происходит при 80-90 °С в течение часа в специальном двустенном свертывателе, покрытом теплоизоляционным материалом. На дно в наклонном положении укладывают пробирки со средами, аппарат накрывается вначале стеклянной крышкой, а затем металлической. Вода в аппарат наливается через отверстие, находящееся в верхней части, оно закрывается пробкой, в которую вставлен термометр. В настоящее время широко применяются аппараты с электрическим нагревом.

**5.** Тиндализация представляет собой дробную стерилизацию при температуре ниже 60 °С, предложенную Д. Тиндалем, веществ легко разрушающихся и денатурирующихся при 60-100 °С (сыворотки, витамины). Нагревание производится в специальных приборах с терморегуляторами или в обычных водяных банях повторно в течение 5-6 дней при температуре 56-58 °С по 1 часу.

**6.** Пастеризация (частичная стерилизация). Этот метод был предложен Л. Пастером и направлен на уничтожение бесспорных форм, преимущественно патогенных видов, споры же сохраняются жизнеспособными. Методом пастеризации обезвреживают различные продукты однократным нагреванием до 65-70 °С в течение 1 часа или до 70-80 °С 5-10 минут. Молоко пастеризуют с целью освобождения его от молочнокислых и патогенных бактерий (возбудителей туберкулеза, бруцеллеза, стафилококкозов и др.). При пастеризации пива, вина, плодовых соков уничтожаются возбудители болезней этих напитков. Витамины и вкусовые качества продуктов сохраняются. Пастеризованные продукты хранят в условиях холодильника.

### ***Облучение электромагнитными волнами***

Облучение электромагнитными волнами используют для дезинфекции, стерилизации термолабильных материалов.

1. Ультрафиолетовые (УФ) лучи длиной 250 и 270 нм. Применяют бактерицидные лампы, которые широко используют для обезвреживания воздуха в боксах, операционных и других помещениях.

Вегетативные формы более чувствительны к облучению, чем споры, которые в 3-10 раз более устойчивы.

2. Гамма- и рентгеновское облучение широко используют для стерилизации антибиотиков, гормонов, пластмассовых изделий разового применения (шприцы, чашки Петри, пипетки и др.).

3. Ультразвук может быть использован для обеззараживания молока, воды, других пищевых продуктов.

### **6.2. Химические методы стерилизации**

Применение этих методов сводится к профилактике микробного загрязнения питательных сред, вакцин, диагностических и лечебных сывороток путем включения в их состав различных химических консервантов.

Питательные среды можно консервировать хлороформом, толуолом, эфиром. До посева такие среды прогревают при 56 °С для освобождения от этих веществ.

В биопромышленности вакцины и лечебные сыворотки консервируют карболовой кислотой, доводя концентрацию до 0,25-0,5 %, формалином - до 0,05 %, мертиолятом – до 1:5000-1:10000.

Сыворотки консервируют борной кислотой, толуолом или глицерином.

Различные химические вещества в лабораторной практике получили широкое использование для дезинфекции. С этой целью применяют растворы

карболовой кислоты (3-5 %), хлорамина (1-3 %), этиловый спирт (70 °С) и др.

К химическим методам относится и стерилизация газами. Стерилизующими газами являются: формальдегид, окись этилена и пропиолактон.

Преимущество газов как стерилизующих веществ состоит в том, что их применение не требует нагревания; кроме того, их можно применять для стерилизации больших объемов, например помещений. Однако при их использовании нужно соблюдать большую осторожность, так как они оказывают токсическое действие на животных и людей.

### **6.3. Механические методы**

Они основаны на фильтрации жидкостей через мелкопористые бактериальные фильтры, которые задерживают видимые под микроскопом микроорганизмы. Через них свободно проходят вирусы и микоплазмы, поэтому данные методы следует признать как «частичную» стерилизацию.

Фильтрование – один из очень удобных методов стерилизации тех жидкостей, которые нельзя простерилизовать другими способами, например, сыворотку крови, питательные среды и др.

Наиболее широко в микробиологической практике используют фильтры-свечи и пластинчатые фильтры.

Фильтры-свечи имеют форму цилиндра с толстыми стенками и с полостью внутри. Одна группа свеч (Беркефельда) изготавливается из инфузорной земли. По величине пор в порядке уменьшения они обозначаются буквами W, N, V.

Другая группа свечей (Шамберлана) изготавливается из каолина с примесью песка и кварца. Они имеют различные размеры пор, условно обозначаемые L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub>, и т.д.

Фильтрация жидкостей через свечи может производиться двояко: под повышенным или пониженным давлением. В первом случае через свечу

пропускают фильтруемую жидкость под давлением. Для этого жидкость наливают в сосуд, к которому присоединяют свечу. Нагнетательным насосом накачивают в этот сосуд воздух, который давит на жидкость; последняя поступает в полость свечи и просачивается через поры. Просочившаяся жидкость поступает в другой сосуд, в который вставлена свеча, а из него в присоединенную резиновой трубкой колбу. Давление, создающееся накачиванием воздуха, определяется манометром.

Во втором случае фильтрация производится с помощью уменьшения давления (создания вакуума) в сосуде, куда должна поступить профильтрованная жидкость. Свечу помещают в сосуд с фильтруемой жидкостью и соединяют трубкой с другим сосудом, из которого откачивается воздух. В результате откачивания воздуха создается значительное разрежение как в пустом сосуде, так и в полости соединенной с ним свечи. Жидкость из сосуда, в который помещена свеча, в силу разности давления устремляется в полость свечи (проходит через поры) и поступает в сосуд.

Перед фильтрацией обязательно должны быть простерилизованы свечи, трубки, соединяющие их с сосудами, и сами сосуды.

Отечественные асбестовые фильтры выпускаются с обозначениями Ф<sub>2</sub> и СФ, последние являются стерилизующими мембранными фильтрами. Особенно широкое применение нашли так называемые мембранные фильтры, которые изготавливают из асбеста, бумаги, коллодия, ацетата целлюлозы. Обычно эти фильтры представляют собой диски различного диаметра. Такие диски пронизаны бесчисленным множеством мельчайших цилиндрических отверстий. В зависимости от способа изготовления фильтров диаметр этих отверстий может быть от 1 мкм до менее 0,005 мкм.

Мембранные фильтры монтируют в приборе Зейтца, который состоит из стакана (воронки) и колбы Бунзена, на тубус этой колбы надевают резиновый вакуумный шланг с ватным фильтром.

Собранный прибор завертывается в бумагу и стерилизуется автоклавированием.

Жидкость, подлежащую стерилизации, наливают в воронку прибора, внутри которого создается вакуум и жидкость фильтруется, освобождаясь от бактерий.

Перед стерилизацией лабораторную посуду моют и сушат. Пробирки, флаконы, бутылки, колбы закрывают ватно-марлевыми пробками. Поверх пробирки на каждый сосуд надевают бумажный колпачок. Чашки стерилизуют завернутыми в бумагу по 2-4 штуки.

Для стерилизации пипеток в верхнюю часть каждой из них вкладывают кусочек ваты и затем заворачивают пипетки в плотную бумагу, нарезанную предварительно полосками шириной 2-2,5 см и длиной 50-70 см. На бумаге пишут объем завернутой пипетки. Пипетки можно стерилизовать также в специальных пеналах.

Мелкие металлические инструменты (петли, иглы, пинцеты, ножницы) стерилизуют прокаливанием в пламени непосредственно перед использованием. Изделия из резины (резиновые пробки, перчатки, шланги) стерилизуют автоклавированием. Предметы, изготовленные из термолabileльных материалов: пластмасс, например, центрифужные пробирки, стерилизуют УФ-лучами, окисью этилена.

## **7. Посев бактерий на питательные среды**

### **7.1. Техника посевов бактерий на питательные среды**

При первичных посевах из исследуемого материала или посева из чистых культур бактерий на питательные среды необходимо соблюдать строгую стерильность, чтобы не занести посторонних микробов. Все работы по посевам и пересевам бактерий проводятся в специальных помещениях (в боксах). Инструментами для посева и посева микроорганизмов служат бактериологические петли, иглы, шпатель.

При посеве бактерий на питательные среды или пересеве из одной пробирки в другую соблюдают следующий порядок. Вначале в пламени

горелки стерилизуют петлю и петледержатель, который при посеве входит в пробирку. Пробирки с чистой культурой и с стерильной скошенной средой берут в левую руку в наклонном положении так, чтобы пробирка с культурой была первой по отношению к работающему. В правую руку берут, как писчее перо, петлю и, держа ее вертикально, прокалывают в пламени горелки. Ватные пробки захватывают мизинцем правой руки, вынимают и держат их во время посева в таком положении. Ни в коем случае не допускается класть пробки на стол. Обжигают края открытых пробирок в пламени горелки и вводят стерильную петлю в пробирку с культурой. Петлю охлаждают о внутреннюю стенку пробирки, прикасаются к участку незасеянного агара и, если он не плавится, прикасаются к поверхности культуры бактерий. Пробирку слегка отодвигают от пламени, предохраняя материал от сжигания. Быстро, но осторожно, переносят петлю в пробирку со стерильной средой, опускают, до конденсационной воды, и зигзагообразными движениями распределяют материал по скошенной поверхности агара. Извлекают петлю, обжигают края пробирок и вставляют обожженные пробки, затем стерилизуют петлю.

Посев на плотные среды в чашках Петри проводят бактериологической петлей или стеклянным шпателем. Крышка чашки с агаровой средой приподнимается левой рукой, но полностью не открывается, наносится капля исследуемого материала и растирается на поверхности среды.

При посеве уколом пробирку с агаром или желатином (среда разлита в виде столбика) держат дном вверх или под углом. Посев производят бактериологической иглой, которой прокалывают питательную среду до дна. Посев уколом в столбик применяется для выращивания анаэробов, выявления протеолитических свойств, а также с целью длительного хранения культур.

Для посева в жидкие среды пользуются петлей, стерильными градуированными или пастеровскими пипетками. Техника посева на жидкие среды петлей аналогична технике посева на скошенный агар, но материал на

петле растирают по стенке пробирки и смывают питательной средой.

При пользовании пастеровской пипеткой кончик капилляра отламывается прокаленным пинцетом, пипетку проводят через пламя. На другой конец пипетки надевают резиновый баллончик и опускают ее в пробирку с жидким исследуемым материалом. Небольшое количество материала набирают путем легкого нажатия на баллончик и переносят материал в пробирку с незасеянной питательной средой, выдувая его с помощью груши.

После посева пастеровские пипетки помещают в дезинфицирующий раствор.

## **7.2. Методы культивирования бактерий**

Для успешного культивирования бактерий, кроме правильно подобранных сред и проведенного посева, необходимы оптимальные условия: температура, влажность, аэрация. В среднем температура для культивирования большинства микробов должна быть в пределах 37-38 °С.

Для выращивания микробов в лабораторных условиях используют специальный аппарат – термостат, в котором поддерживается постоянная и определенная температура.

Термостаты бывают различного устройства и размера. Термостат представляет собой шкаф с полками внутри и открывающейся дверцей, сделанные из теплоизолирующих материалов. Источником нагрева в современных термостатах являются электронагревательные элементы, которые прогревают воздух или воду.

Существенной частью любого термостата является система терморегуляции, которая обеспечивает поддержание температуры на оптимальном уровне. Датчиком температуры в большинстве термостатов является ртутный контактный термометр с магнитной головкой. Такой термометр имеет два контакта, один из которых представляет собой

платиновую подвижную проволоку, заключенную в канал термометра, другой присоединяется к ртути. Уровень температуры по положению подвижного контакта регулируется магнитной головкой. При нагревании термостата выше 37 °С замыкаются контакты термометра, и сигнал поступает в электронное устройство, которое с помощью реле отключает источники нагрева. При снижении температуры контакты размыкаются и подается сигнал для включения источников нагрева. Таким образом, в термостатах постоянно поддерживается нужная температура.

В больших лабораториях по такому же принципу создаются комнаты-термостаты.

Свет подавляющему большинству патогенных микробов не нужен: их культивируют в темноте. Однако для изучения пигментообразования, которое происходит активнее на рассеянном свете, бактериальные культуры после термостата выдерживают 2-3 дня при комнатном освещении.

Для успешного культивирования бактерий необходимо применять свежие питательные среды, содержащие определенное количество влаги. Особенно это касается использования плотных питательных сред, которые разливают в чашки и скашивают в пробирках в день посева.

При выращивании аэробов и факультативных анаэробов аэрация происходит в естественных условиях без применения каких-либо дополнительных приспособлений.

Сроки культивирования большинства патогенных микроорганизмов составляют 18-24 часа, но есть и культуры, растущие медленно – до 4-6 недель.

### **7.3. Методы выделения чистых культур бактерий**

Морфологические, культуральные и биохимические особенности микроорганизмов, необходимые для определения вида с целью постановки бактериологического диагноза, изучают, используя чистые культуры

бактерий.

*Микробы, выделенные из внешней среды, организма животных или людей и размноженные на питательных средах, называют культурами.*

В исследуемом материале патогенные микроорганизмы во многих случаях находятся в числе других, чаще сапрофитных бактерий. Выделить чистую культуру возбудителя болезни является основной задачей при проведении бактериологической диагностики.

Чистая культура микробов содержит только один вид микроорганизмов, который определяется по совокупности его свойств. *Культура микроорганизмов, выделенная из определенного источника (организм животного, воздух, почва и др.) получила название штамм.*

Если выделенная бактериальная культура одного вида различается по некоторым признакам, то она называется – вариант.

Методы выделения микроорганизмов из исследуемого материала можно отнести к двум группам – механические и биологические.

### ***Механические методы***

Они основаны на механическом разъединении одной бактериальной клетки от другой с целью получения отдельных изолированных колоний на плотной питательной среде. После культивирования посевов в термостате из отдельной нужной колонии делается пересев на питательную среду, в которой вырастают чистые культуры бактерий.

#### **1 день исследования**

Из исследуемого материала готовят мазки и окрашивают их по Граму. При микроскопии устанавливают наличие бактерий, их морфологические особенности и отношение к окраске по Граму.

Для получения изолированных колоний исследуемый материал высевает на поверхность плотной питательной среды в чашках Петри.

Агар в чашки разливают следующим образом: флакон со стерильной питательной средой помещают в водяную баню. После расплавления агара и

его охлаждения до 42 °С флакон берут в правую руку, левой рукой извлекают пробку, обжигают горлышко флакона, большим и указательным пальцами левой руки слегка приподнимают крышку чашки. Вводят горлышко флакона под крышку чашки (не касаясь краев), наливают 15-20 мл питательного агара, быстро выводят горлышко флакона и закрывают чашку крышкой. Край горлышка флакона подводят к пламени и закрывают его обожженной пробкой. Слегка покачивая круговыми движениями чашку, достигают равномерного распределения среды. Чашки оставляют на месте, пока среда не застынет, а затем их переносят в термостат.

Существует несколько методов посева материала для выделения чистой культуры бактерий. *Посев на чашки штрихом* производится при помощи петли, которой набирают небольшое количество исследуемого материала и, не вынимая петлю из пробирки, стряхивают излишнее его количество. Чашку с питательной средой помещают на столе вверх дном.левой рукой берут дно чашки, держа ее почти вертикально, и густо заштриховывают петлей небольшой участок агара в верхней части чашки. Петлю следует держать свободно большим и указательным пальцами правой руки, ближе к концу петледержателя. Освободив таким образом петлю от лишнего материала, легкими движениями, не повреждая поверхности среды, наносят, отрывая друг от друга, параллельные штрихи на расстоянии около 0,5 см.

В отдельных случаях можно производить последовательный рассев материала, используя для этого несколько чашек с питательной средой. Набрав петлей материал, производят посев штрихами на первой чашке и той же петлей, не набирая материала, вновь наносят штрихи на вторую и третью чашки с питательным агаром. На первой чашке обычно получают рост в виде сплошных штрихов, на второй и, особенно на третьей бактерии развиваются в виде изолированных колоний.

*Посев шпателем.* Посев исследуемого материала нередко производят шпателем, который заранее заворачивают в бумагу и стерилизуют горячим воздухом. Исследуемый материал в количестве одной петли или капли

наносится пастеровской пипеткой в центр чашки со средой, каплю шпателем распределяют на небольшом участке среды, а затем круговыми движениями по всей ее поверхности. На время посева крышка чашки, поддерживаемая левой рукой, остается слегка открытой.

Шпатель из первой чашки быстро переносят во вторую чашку, а затем в третью. По окончании посева шпатель погружают в банку с дезинфицирующим раствором. Чашку с соответствующей надписью на дне помещают в термостат вверх дном для того, чтобы конденсационная вода, скапливающаяся на внутренней поверхности крышки, не попадала на поверхность посева и не размывала выросшие колонии.

### 2 день исследования

Изучают культуральные свойства чистой культуры, выросшие колонии на третьей чашке. Их изучают невооруженным глазом, с помощью лупы, при малом увеличении микроскопа и иногда под стереоскопическим микроскопом.

Нужную колонию отмечают со стороны дна чашки восковым карандашом. Из нее делают мазок и окрашивают по Граму. При микроскопии изучают морфологические особенности и отношение бактерий к окраске по Граму. Из этой колонии делают пересев на питательные среды (МПА и МПБ). Посевы помещают в термостат для культивирования.

### 3 день исследования

Изучают культуральные свойства бактерий на МПА и МПБ, делают мазок, окрашивают по Граму, микроскопируют. Убедившись в том, что бактериальная культура чистая, приступают к изучению ее биохимических (ферментативных) свойств, устанавливают подвижность, определяют чувствительность к антибиотикам и др.

В научно-исследовательской работе, особенно при генетических исследованиях, необходимо получать культуры заведомо из одной клетки. Такая культура называется *клон*. Для его получения чаще всего пользуются микроманипулятором. Этот прибор снабжен инструментами (иглами,

пипетками) микроскопических размеров. С помощью держателя под контролем микроскопа их вводят в препарат с бактериями на предметном стекле и одну нужную клетку засевают в питательную среду.

### ***Биологические методы***

Они основаны на учете тех или иных биологических особенностей выделяемых бактерий в чистую культуру.

#### 1. Выделение спорообразующих микроорганизмов.

При выделении чистых культур из исследуемого материала, содержащего споровые формы микробов, его прогревают 10 мин при 80 °С или 2-3 мин при 100 °С в расчете на то, что менее стойкие неспоровые формы погибнут при этой температуре. При этом споровые формы останутся жизнеспособными.

Из прогретого материала проводится посев на питательные среды, на которых вырастают спорообразующие микроорганизмы.

#### 2. Выделение кислотоустойчивых микроорганизмов.

Для выделения чистой культуры возбудителей туберкулеза и паратуберкулеза из патологического материала используют химический метод. С этой целью исследуемый материал после его гомогенизации обрабатывают 6 % раствором серной кислоты в течение 5-7 минут, добавляя ее в равном объеме. Благодаря этому погибают микробы сопутствующей микрофлоры, а кислотоустойчивые остаются жизнеспособными.

После нейтрализации раствора кислоты проводят посев на специальные питательные среды, на которых вырастают кислотоустойчивые микробы.

#### 3. Выделение подвижных микроорганизмов (метод Шукевича)

Исследуемый материал, из которого выделяется подвижный микроб, засевают в конденсационную воду скошенного МПА. При посеве необходимо следить, чтобы петля с материалом не коснулась поверхности среды над конденсационной водой. Бактерии, обладающие активной подвижностью, вырастут не только в конденсационной воде, но и вне ее, на поверхности МПА. Из верхней части роста производят повторно посев в

конденсат свежей питательной среды. Производя таким образом несколько пересевов, в конце концов получают чистую культуру подвижных бактерий.

#### 4. Выделение патогенных микроорганизмов

Чистые культуры патогенных бактерий выделяют путем заражения исследуемым материалом лабораторных животных, наиболее восприимчивых к тому или иному возбудителю.

После гибели животного из крови и органов трупа делают посеvy на питательные среды, на которых в большинстве случаев вырастает чистая культура возбудителя (этот метод подробно представлен в разделе «Заражение лабораторных животных»).

## **8. КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ**

У выделенных чистых бактериальных культур изучают культуральные свойства.

Культуральными свойствами бактерий называют характер их роста на плотных и жидких питательных средах.

Изучение культуральных свойств бактерий наряду с другими – морфологическими, тинкториальными, биохимическими, серологическими (антигенными) и патогенными – необходимо при проведении бактериологической диагностики с целью идентификации выделенных бактерий из исследуемого материала.

### **8.1. Культуральные свойства бактерий на плотных питательных средах**

На этих средах бактерии растут в виде колоний, которые подвергают изучению.

1. Макроскопическое изучение колоний в проходящем свете проводится невооруженным глазом. Чашку поворачивают дном к себе на расстоянии

лучшей видимости. При наличии двух различных видов колоний их нумеруют и описывают каждую в отдельности. В протоколе отмечают следующие данные:

а) величина колоний (крупная – 4-5 мм в диаметре и более, средняя – 2-4 мм, мелкая – 1-2 мм, карликовая – не более 1 мм);

б) форма очертаний колоний (правильно и неправильно округлая, розеткообразная, ризоидная и др.);

в) степень прозрачности (плотная – непрозрачная, полупрозрачная, прозрачная).

В отраженном свете рассматривают колонии со стороны крышки, не открывая ее, и отмечают:

а) цвет колоний (бесцветная, пигментированная, цвет пигмента);

б) поверхность (гладкая, блестящая, влажная или морщинистая, матовая, сухая и др.);

в) положение колонии на питательной среде (возвышающаяся над средой, погруженная в среду, на уровне среды – плоская, плотно прилегающая к среде – уплощенная).

2. Микроскопическое изучение колоний. Чашку устанавливают вверх дном на предметном столике микроскопа, опускают конденсор и объективом х8 изучают структуру и края колоний:

а) характер краев (ровные, волнистые, зубчатые, бахромчатые и др.);

б) структура колоний (гомогенная, аморфная, зернистая, волокнистая и др.).

## **9.2. Культуральные свойства бактерий на жидких питательных средах**

Рост бактерий в жидких питательных средах характеризуется следующими признаками. Не встряхивая содержимое пробирки с посевом, вначале обращают внимание на поверхностный рост, который может быть в

виде пристеночного кольца или пленки по всей поверхности среды. По своему характеру пленка может быть нежная или грубая, складчатая или ровная; по консистенции – хрупкая, слизистая, сальная.

Отмечают также характер и степень помутнения среды, которое может быть незначительное (в виде опалесценции), слабое, умеренное и интенсивное.

Многие бактерии на жидких питательных средах образуют на дне пробирки осадок, который выявляется при легком встряхивании пробирки. Он может быть незначительным или обильным, зернистым, хлопьевидным, слизистым, крошковидным и т.д.

Ряд бактерий образует водорастворимые пигменты, которые равномерно окрашивают питательную среду в сине-зеленый, ярко-красный и желтый цвета.

После изучения культуральных свойств выделяемых бактерий на плотной питательной среде из отдельной колонии готовят мазок и окрашивают по Граму. Проводят микроскопию. Из этой же колонии делают пересев на скошенный МПА и МПБ для выделения чистой культуры бактерий (2-й день исследования).

## **9. ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ (БИОХИМИЧЕСКИЕ) СВОЙСТВА БАКТЕРИЙ**

### **9.1. Определение ферментации углеводов**

Для такого определения чистую культуру бактерий засевают на дифференциально-диагностические среды, в состав которых входят различные углеводы и индикаторы.

В зависимости от изучаемого рода и вида бактерий выбирают среды с соответствующими моно- и дисахаридами (глюкоза, лактоза, мальтоза, сахароза и др.), полисахаридами (крахмал, гликоген, инсулин и др.), высшими спиртами (глицерин, маннит и др.). В процессе ферментации

бактерии образуют конечные продукты: альдегиды, кислоты и газообразные продукты ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CH}_4$ ).

Для определения ферментативных свойств используют питательные среды: полужидкие с индикатором ВР, жидкие (среда Гисса) и плотные (среды Эндо, Левина, Дригальского и др.).

В полужидкие среды с индикатором ВР посев производится петлей, опущенной до дна пробирки. В результате ферментации углеводов индикатор изменяет свою окраску, а пузырьки газа распределяются в питательной среде и в связи с ее вязкостью могут некоторое время сохраняться в среде.

В жидких питательных средах изменения устанавливают также по изменению цвета индикатора, а образование газа – с помощью поплавка (небольшая пробирка помещается вверх дном), в котором появляется пузырек газа.

При отсутствии ферментации цвет среды не меняется. Поскольку бактерии ферментируют не все, а только некоторые углеводы, входящие в состав сред Гисса, то наблюдается довольно пестрая картина. Поэтому набор сред с углеводами и цветным индикатором был назван «пестрым» рядом.

Для дифференциации микроорганизмов семейства энтеробактерий широко используется их способность расщеплять различные углеводы с образованием кислоты и газа.

На плотных дифференциально-диагностических средах, в состав которых входят углеводы и индикатор, вырастают колонии, имеющие различную окраску. Например, кишечная палочка, ферментирующая лактозу, на среде Эндо образует ярко-красные колонии; сальмонеллы, не ферментирующие лактозу, на этой среде образуют бесцветные или слегка розоватые колонии.

## **9.2. Определение протеолитических свойств**

Наиболее часто для обнаружения протеолитических ферментов производят посев чистой культуры бактерий уколом в столбик мясо-пептонного желатина (МПЖ). Посевы выдерживают при комнатной температуре (20-22 °С) в течение нескольких дней, при этом регистрируют не только наличие разжижения, но и его характер.

Разжижение может быть послойное, что характерно для синегнойных бактерий, стафилококки – в виде «чулка». Характер разжижения желатина возбудителем сибирской язвы напоминает перевернутую елочку.

Протеолитическое действие микроорганизмов можно наблюдать при посевах на свернутую сыворотку крови, вокруг колоний появляются углубления и зоны разжижения.

В молоке наблюдается просветление или растворение образовавшегося вначале сгустка казеина, который расщепляется с образованием пептона, что придает молоку желтоватый цвет (пептонизация молока).

Показателями более глубокого расщепления белка являются его конечные продукты: индол, аммиак, сероводород и др. Для определения этих газообразных веществ производят посев чистой культуры бактерий в бульон или пептонную воду. В пробирки с засеянной средой между стенкой пробирки и пробкой помещают индикаторную бумагу. Посевы выращивают в термостате в течение 1-3 суток.

а) обнаружение индола производится несколькими методами. Наиболее прост и доступен способ Мореля. Узкие полоски фильтровальной бумаги смачивают горячим насыщенным раствором щавелевой кислоты (индикаторная бумага) и высушивают. При выделении индола на 1-3 день нижняя часть полоски бумаги вследствие соединения индола с щавелевой кислотой приобретает розовый цвет.

б) обнаружение аммиака определяют по посинению розовой лакмусовой бумаги, помещенной в пробирку таким же образом, как и для определения индола.

в) обнаружение сероводорода. В пробирку с посевом помещают

индикаторную полоску фильтровальной бумаги, смоченную раствором уксуснокислого свинца. При взаимодействии сероводорода и уксуснокислого свинца бумага чернеет за счет образования сернистого свинца.

### **9.3. Определение редуцирующей (восстанавливающей) способности**

Для этой цели используют метиленовую синь, тионин, лакмус, нейтральный красный и др. К МПА и МПБ прибавляют раствор одного из указанных красителей. При наличии у бактерий редуцирующей способности среда обесцвечивается. Наиболее широкое применение имеет среда Ротбергера (МПА с 1 % глюкозы и несколькими каплями насыщенного раствора нейтрального красного). При положительной реакции красный цвет среды переходит в желтый.

### **9.4. Определение фермента каталазы**

Каталаза разлагает перекись водорода на воду и молекулярный кислород. Для обнаружения каталазы на поверхность 24 часовой культуры на скошенном МПА наливают 1-2 мл 1 % раствора перекиси водорода. Появление пузырьков газа при наклонном положении пробирки регистрируется как положительная реакция. В качестве контроля следует параллельно исследовать культуру, заведомо содержащую каталазу.

### **9.5. Определение плазмокоагуляции**

Является одной из наиболее надежных проб для выявления патогенности стафилококков. Для ее постановки разливают по 1-2 мл стерильной плазмы, вносят бактериологической петлей культуру бактерии и помещают в термостат. Проверяют результаты через 30 минут, 2, 4 часа и на другой день. При положительной реакции происходит коагуляция (свертывание плазмы).

## **9.6. Определение ДНК-азы**

К расплавленному МПА добавляют навеску ДНК из расчета 2 мг на 1 мл среды. Посевы проводят в виде полоски и помещают в термостат на 18-24 часа. На выросший стафилококк наливают 5-6 мл н. НСl. Присутствие в культуре фермента, расщепляющего ДНК, выявляется образованием прозрачных зон вокруг колоний стафилококка.

## **9.7. Определение гемолитической способности**

Исследуемую культуру засевают на поверхность кровяного МПА. Для приготовления этой среды к 2%-ному расплавленному и охлажденному до 45 °С МПА вносят 5% дефибринированной крови лошади, барана или кролика.

Культивирование проводится при 37 °С в течение 24–48 часов.

Вокруг колоний микробов, вырабатывающих гемолизин, образуются зоны просветления вследствие растворения эритроцитов. Различают  $\alpha$ -гемолиз, когда колонии окружены зоной, окрашенной в зеленый цвет, и  $\beta$ -гемолиз при бесцветной зоне.

## **10. Определение чувствительности бактерий к антибиотикам**

*Антибиотики* – это лекарственные препараты, обладающие антимикробным действием. Они получили широкое применение для терапии многих болезней животных и человека. С каждым годом расширяется арсенал антибиотических препаратов, выпускаемых промышленностью. Источником получения антибиотиков являются микроскопические грибы (пенициллин), актиномицеты (стрептомицин, тетрациклин), бактерии (грамицидин, полимиксин). Антибиотические вещества извлекают и из клеток растений (фитонциды лука, чеснока) и животных тканей (лизоцим,

экмолин).

Механизм антагонистического действия антибиотиков сводится к нарушению процессов обмена веществ в микробной клетке.

Антибиотики могут оказывать на микроорганизмы бактериостатическое и бактерицидное действия. При бактериостатическом действии антибиотиков подавляется или задерживается рост микроорганизмов, а бактерицидном – вызывает их гибель.

Создание большого количества разнообразных антибиотиков вызвано, с одной стороны, поисками более эффективных лечебных средств, а с другой, тем, что по мере широкого применения антибиотиков их лечебный эффект снижается вследствие возникновения резистентных (устойчивых) форм микробов.

Эффективность применения антибиотиков во многом зависит от чувствительности возбудителя болезни к применяемому антибиотику, поэтому возникла необходимость определения чувствительности микроорганизмов к этим препаратам.

При определении чувствительности желательно иметь чистые культуры возбудителя, и лишь при необходимости срочного получения ответа используют исследуемый материал, содержащий всю микрофлору.

В лабораторной практике для определения чувствительности бактерий к антибиотикам используют следующие методы.

### **10.1. Методы серийных разведений**

Более точные результаты можно получить, применяя метод серийных разведений в жидкой среде. Бульон Хоттингера (или другую среду, пригодную для роста данного микроорганизма) разливают по 2 мл в пробирки, расставленные в штативы по 10 в каждом ряду. Готовят раствор антибиотика, содержащий 100 ЕД в 1 мл, и добавляют 2 мл этого раствора в первую пробирку. После тщательного перемешивания новой стерильной

мерной пипеткой переносят 2 мл из этой пробирки в следующую и т.д. до девятой пробирки, из которой 2 мл выливают. Десятая пробирка, не содержащая антибиотика, служит контролем роста культуры. Для постановки этого опыта с успехом используются имеющиеся в продаже препараты, на этикетках которых указано количество единиц во флаконе. Например, если флакон содержит 500 000 ЕД пенициллина, то, добавив в него 10 мл дистиллированной воды, получают раствор, содержащий в 1 мл 50000 ЕД, при дальнейшем разведении в 100 раз получают раствор с концентрацией пенициллина 500 ЕД/мл. Для получения требуемой концентрации 100 ЕД/мл нужно развести этот раствор еще в 5 раз; это разведение делают при помощи бульона и 2 мл полученного раствора вносят в первую пробирку. Таким образом, в первой пробирке концентрация пенициллина 50 ЕД/мл, во второй 25 ЕД/мл и т.д. Если на этикетке препарата дозировка указана в весовых единицах, следует иметь в виду, что для большей части антибиотиков 1 г активного вещества соответствует 1 000 000 ЕД. Из этого расчета и следует разводить антибиотик.

Если порошок антибиотика расфасован не мерно и на этикетке указано количество единиц активности в 1 мг, необходимо к точной навеске препарата (20-25 мг), сделанной на аналитических весах, добавить равный объем растворителя, т.е. получить раствор мг/мл, в 1 мл которого содержится столько единиц, сколько их было указано на этикетке. Из этого основного раствора делают дальнейшие разведения по указанной выше схеме. Суточную агаровую культуру испытуемого микроба смывают изотоническим раствором хлорида натрия и, определив концентрацию взвеси по стандарту мутности, разводят до густоты 10 000 микробов в 1 мл. Полученную взвесь по 0,2 мл вносят во все пробирки ряда, начиная с контрольной. Таким образом, во всех пробирках определяют рост после инкубации при 37 °С в течение 18-20 ч. Последняя пробирка с прозрачным бульоном при наличии густого роста в контроле определяет минимальную концентрацию антибиотика, подавляющую рост данного микроорганизма (таблица 2).

Таблица 2 – Критерии оценки чувствительности стафилококков к пенициллину

Чувствительные			Резистентные	
Очень чувствительные	Чувствительные	Умеренно чувствительные	Слабо чувствительные	Резистентные
0,1 ед.	0,1-0,5 ед.	0,5 ед.	1-10 ед.	10 ед.

## 10.2. Метод диффузии в агар (метод бумажных дисков)

Наиболее прост и доступен метод определения чувствительности бактерий с помощью дисков, пропитанных антибиотиками. В стерильные чашки Петри, расположенные на горизонтальной поверхности, разливают по 15 мл МПА или другой питательной среды. Среда подсушивается в термостате и засеивается исследуемым материалом методом «газона».

Для посева используют взвесь патологического материала (кал, молоко, гной, моча и др.) или выделенную чистую культуру возбудителя. Бактериальную взвесь равномерно распределяют по поверхности плотной питательной среды с помощью шпателя и чашки Петри, подсушивают вновь в термостате.

На поверхности засеянного агара пинцетом раскладывают диски с антибиотиками – по 5-6 дисков на каждую чашку на расстоянии 25 мм от центра чашки. Чашки выдерживают в термостате при 37°C 16-18 ч, после чего учитывают результаты опыта путем измерения зон задержки роста микробов вокруг дисков, включая диаметр самого диска. Размер зон зависит от степени чувствительности возбудителя к данному антибиотику. При зоне диаметром до 10 мм штамм расценивается как устойчивый, 11-15 мм – как малоустойчивый, 15-25 мм – как чувствительный. Зоны, превышающие 25 мм, свидетельствуют о высокой чувствительности микроорганизма к данному антибиотику.

## 11. Исследование бактерий на подвижность

Выделив чистую культуру на жидкой питательной среде, определяют подвижность этих бактерий.

Подвижность или ее отсутствие у бактерий является одним из многих признаков для определения их вида.

Органами движения у некоторых видов бактерий являются жгутики. Они состоят из белковых веществ, отличающихся от белков тела клетки. Жгутики – очень тонкие образования, диаметр их 0,02-0,05 мкм. Они во много раз длиннее бактерий.

Передвижение бактерий связано со спиралевидными движениями жгутиков.

Рассмотреть жгутики у бактерий под обычным световым микроскопом невозможно, так как их малые размеры лежат за пределами разрешающей способности микроскопа. Обнаруживают жгутики у бактерий различными способами. Строение их и другие детали изучаются методом электронной и фазово-контрастной микроскопии. Расположение и количество жгутиков можно рассмотреть под световым микроскопом, применяя «сверхокраску» по методу Леффлера. Сложность и недоступность этих методов исключает их использование в условиях практических лабораторий. По расположению жгутиков подвижные микробы условно разделяют на 3 группы.

1. Монотрихи – бактерии с одним жгутиком на конце.
2. Лофотрихи – бактерии с пучком жгутиков на одном конце.
3. Перитрихи – бактерии со жгутиками по всей поверхности тела.

Практически изучение микробов в живом состоянии применяется для определения подвижности, то есть косвенного подтверждения наличия жгутиков. Движение микробов можно наблюдать в препаратах «раздавленная капля» или «висячая капля». Микроскопируют эти препараты сухим или иммерсионным объективом. Лучшие результаты получают при микроскопировании в темном поле зрения.

*Метод «раздавленной» капли.* На середину предметного стекла наносят каплю исследуемого материала. Каплю накрывают покровным стеклом так, чтобы не появились пузырьки воздуха; жидкость должна заполнять все пространство и не выступать за края стекла.

Недостатком метода «раздавленной» капли является быстрое высыхание препарата. При длительном микроскопировании препарата рекомендуют смазывать края покровного стекла вазелином. Кроме того, можно использовать метод «висячей» капли.

*Метод «висячей» капли.* Для приготовления этого препарата используют специальные предметные стекла с углублением («лункой») в центре. Небольшую каплю исследуемого материала наносят на середину покровного стекла, края лунки предварительно смазывают вазелином. Предметное стекло накладывают на покровное так, чтобы капля находилась в центре лунки. Затем его осторожно переворачивают, чтобы капля свисала в центре герметично закрытой полости лунки. В такой замкнутой полости капля защищена от высыхания.

При микроскопии таких препаратов в проходящем свете для получения большей контрастности слегка затемняют поле зрения; конденсор при этом опускают, поступление света регулируют вогнутым зеркалом. Вначале пользуются малым увеличением (объектив х8), после того как обнаружат край капли, устанавливают объектив х40 или иммерсионный.

При недостаточном опыте иногда ошибочно принимают пассивное молекулярное (броуновское) движение за истинное – активное. Следует учитывать, что при активном движении с помощью жгутиков бактерии могут пересекать все поле зрения и совершать круговые движения.

## 12. Биологические методы исследований

### 12.1. Методы заражения лабораторных животных

Экспериментальное заражение лабораторных животных производится с целью:

- выделения из исследуемого материала чистой культуры возбудителя болезни;
- определения вида бактерий при диагностике болезни, т.е. идентификации;
- определения вирулентности;
- испытания на эффективность вакцин и лечебных сывороток.

Заражение животных с целью выделения чистой культуры патогенного микроорганизма, вызвавшего заболевание, производят в том случае, если в исследуемом материале содержится посторонняя микрофлора, которая на питательных средах подавляет рост возбудителя. Например, при исследовании несвежего патологического материала или объектов внешней среды на наличие возбудителей сибирской язвы заражают белых мышей или морских свинок.

У зараженных животных возникает септицемия – размножение микробов в крови. Зараженные животные погибают через 1-3 суток. Чистая культура возбудителя выделяется путем посева на питательные среды крови из сердца и внутренних органов.

Заражение животных производится также для исследования материала, содержащего незначительное количество микробов или их фильтрующие формы, которые не удастся выделить при культивировании на питательных средах. Так, например, если при микроскопическом исследовании мокроты или осадка мочи не удастся обнаружить микобактерии туберкулеза, этим материалом заражают морскую свинку. У экспериментального животного через 4-6 недель развивается генерализованный инфекционный процесс. При вскрытии во всех внутренних органах обнаруживают туберкулы (бугорки),

при микроскопическом исследовании которых выделяют большое количество туберкулезных микобактерий.

Экспериментальное заражение производят при изучении заболеваний, вызванных вирусами и риккетсиями, в тех случаях, когда возбудители не могут быть обнаружены другими путями. Воспроизведение типичного заболевания у животного подтверждает присутствие вируса в исследуемом материале.

Кроме того, заражение животных применяют для определения вирулентности микробов, выделенных из исследуемого материала.

В микробиологической работе используют животных также с целью получения иммунных сывороток и вакцин, изучения их эффективности и безвредности (контроль биологических препаратов), взятия крови, необходимой для проведения различных реакций, и приготовления специальных питательных сред.

Для экспериментального заражения могут служить многие виды животных, но чаще используют белых мышей, морских свинок, хомяков, кроликов, реже голубей, кур, котят и др. Эти животные восприимчивы ко многим инфекционным болезням человека и животных, удобны в обращении и легко размножаются в вивариях.

С целью получения иммунных сывороток используют лошадей, кроликов, баранов, ослов; для приготовления вакцин против оспы, бешенства – телят, кроликов, белых мышей; контроль биологических препаратов производится на кроликах, морских свинках, белых мышах; кровь для приготовления питательных сред берут у баранов, кроликов.

При экспериментальном заражении животных изучаемый материал вводят различными путями: накожно, подкожно, внутрикожно, внутримышечно, внутривенно, внутрибрюшинно, в головной мозг и др.

Подготовка животных к заражению складывается из следующих этапов.

1. Отбор животных. Опыты проводят только на здоровых животных, которые отличаются гладкой блестящей шерстью, опрятны, активно

двигаются и хорошо поедают корм. Кроме внешнего осмотра, перед заражением производят термометрию. У кроликов и морских свинок измеряют температуру ртутным термометром, изогнутым под углом. Термометр вводят в прямую кишку. Нередко температура измеряется не только до заражения, но и в течение всего опыта. Нормальная температура у лабораторных животных колеблется в следующих пределах: у морских свинок – 38-39 °С, у кроликов – 38,5-39,5 °С, у мышей – 37-39 °С.

2. Мелких животных метят, окрашивая анилиновыми красками или насыщенным раствором пикриновой кислоты. В протоколе отмечают место окраски. Более крупным животным (морские свинки и кролики) к ушам прикрепляют бирки с номерами.

3. Подготовка места введения материала. В месте введения шерсть удаляют выщипыванием, выстриганием, выбриванием или с помощью депилятора. Эту операцию производят накануне опыта, так как удаление шерсти любым способом вызывает раздражение кожи. В качестве депилятора очень часто используют смесь сернокислого бария и пшеничного крахмала, которые в равных количествах разводят водой до получения массы в виде густой сметаны. Накладывают эту массу на шерсть и через 3 мин удаляют ее вместе с шерстью, кожу тщательно промывают водой.

4. Животных фиксируют различными способами – в зависимости от вида животного и метода введения материала. Для этой цели используют специальные станки, доски-фиксаторы, ящики. В обычных условиях можно пользоваться более простыми приемами. Кроликов и морских свинок кладут спиной на стол, одной рукой держат за задние конечности, а другой обхватывают грудную клетку, вводя пальцы в подмышечные впадины.

Для взятия крови из сердца животных кладут на спину, растягивая в стороны и немного вверх передние конечности. Для внутривенных инъекций удобнее всего кролика завернуть в полотенце, тесно прижав конечности к туловищу.

Мышей берут за хвост левой рукой, опускают на стол, туловище быстро прижимают к столу двумя пальцами правой руки и, скользя по спине, как бы массируя ее к голове, захватывают кожу над головой, мышь слегка растягивают. Можно держать мышей одной рукой, тогда экспериментатор обходится без помощника.

Место инъекции дезинфицируется спиртом или йодной настойкой или промывают стерильным раствором поваренной соли.

Инструменты, необходимые для заражения животных (шприцы в разобранном виде, иглы, пинцеты), кипятят в течение 10-20 минут и более в зависимости от природы вводимого материала.

Подкожное введение материала. Двумя пальцами левой руки захватывают кожу, вводят подкожно иглу, слегка меняют направление иглы, чтобы материал не выливался, затем вводят содержимое шприца, надавливая поршень левой рукой. По окончании введения иглу быстро извлекают, предварительно положив на нее вату, смоченную дезинфицирующим раствором. У кроликов и морских свинок подкожные инъекции удобно делать на спине и животе, у крыс и мышей – на спине, у корня хвоста. Доза введения не более 0,1 – 0,2 мл.

Внутрикожное введение применяется значительно реже. Кожу растягивают двумя пальцами левой руки или натягивают на палец, как перчатку. Иглу вводят под острым углом отверстием кверху в поверхностный слой эпидермиса так, чтобы конец иглы просвечивался. При введении жидкости появляется пузырек, который не исчезает в течение 5 минут. Внутрикожно вводят материал в объеме 0,1-0,2 мл.

При накожном способе заражения исследуемый материал втирают стеклянной палочкой в неповрежденную или скарифицированную кожу. Скарификацию (насечки) производят скальпелем или пером для оспопрививания. Материал втирают в места, недоступные для слизывания (на спине, ближе к голове).

Внутрибрюшинное заражение. Материал вводят в левую нижнюю треть

живота. Животное держат вниз головой, чтобы кишечник переместился к диафрагме. Кожу прокалывают иглой под острым углом, затем устанавливают шприц под прямым углом. Толчкообразным движением прокалывают брюшную стенку и вводят содержимое шприца.

Методика внутривенного заражения зависит от вида животного. У кроликов материал вводят в краевую ушную вену. После удаления шерсти вдоль наружного края уха для лучшего кровенаполнения зажимают вену у основания уха, растирают, поколачивают щелчками место введения или смазывают ксилолом. Перед введением материала сдавливание вены прекращают. Иглу вводят в вену под острым углом по направлению тока крови. При попадании иглы в вену жидкость свободно поступает в кровь при легком надавливании на поршень шприца. Если игла не в вене, жидкость поступает с трудом, образуя в месте введения вздутие. В таком случае следует извлечь иглу и ввести ее ближе к основанию уха. Перед извлечением иглы прижимают вену стерильной ватой и не снимают ее до прекращения кровотечения.

Мышам и крысам материал вводят в хвостовые вены. Помощник держит мышь и сдавливает корень хвоста. Для более полного кровенаполнения сосудов хвост погружают на 1-2 минуты в воду, нагретую до 50°. Прокол вены лучше производить у основания хвоста, где сосуды расположены поверхностно или в нижней его трети, где вены шире. Во время инъекции сдавливание у корня хвоста прекращается.

Морским свинкам материал вводят в вену внутренней поверхности бедра, предварительно разрезают кожу и отпрепарируют вену. После инъекции на рану накладывают швы.

Для введения материала в сердце или взятия крови из сердца кролика или морскую свинку фиксируют таким образом, чтобы голова животного находилась слева от экспериментатора. Шерсть с левой стороны груди выстригают, кожу дезинфицируют спиртом или йодом. Большим пальцем левой руки экспериментатор слегка надавливает на правую сторону грудной

стенки животного, а указательным пальцем нащупывает толчок сердца и одновременно определяет положение ребер. Игла вводится в месте толчка в межреберный промежуток перпендикулярно грудной клетке. Если игла находится в полости сердца, в шприц толчками поступает кровь, после чего можно вводить материал или набирать кровь. Если кровь не поступает, иглу извлекают и производят прокол вены вновь, тщательно проверив место толчка (нельзя изменять направление иглы, не извлекая ее, так как можно разорвать мышцы сердца). После инъекции кожу дезинфицируют йодной настойкой. Обычно при взятии больших порций крови животному вводят под кожу стерильный раствор хлористого натрия в количестве, равном взятой крови.

Заражение субдуральное (под твердую мозговую оболочку), интрацеребральное (внутри мозга), интраокулярное (в переднюю камеру глаза), через пищеварительный тракт, в дыхательные пути производят в тех случаях, когда иной путь введения не вызывает у экспериментального животного типичного инфекционного процесса.

## 12.2. Определение вирулентности микробов

При изучении свойств патогенных микробов в ряде случаев производят определение их вирулентности. Это необходимо для идентификации микробов, выделенных от больных, носителей и из внешней среды, характеристики силы вакцины, выявления напряженности иммунитета у животных и т.д.

Вирулентность микробов выражается MLD – минимальной смертельной дозой, то есть минимальным количеством микробов, вызывающих гибель животного определенного вида, и LD<sub>50</sub> – дозой, вызывающей гибель 50 % зараженных животных.

*Определение MLD.* Для этой цели пользуются культурами, выращенными на плотных или жидких питательных средах. Культуры на

плотных питательных средах смывают 0,85 % раствором поваренной соли и устанавливают определенное количество микробных тел в 1 мл, пользуясь оптическим стандартом. Культуры, выращенные на жидких питательных средах, разводят то или иное количество раз. Минимальная смертельная доза может резко варьировать в зависимости от вида и штамма микроба, а также вида животного, места введения и других факторов. Например, для определения вирулентности возбудителя пастереллеза; 18 часовую агаровую культуру *P. multocida* смывают физиологическим раствором и устанавливают содержание микробов по оптическому стандарту до 1 млрд. в 1 мл.

В первый ряд пробирок наливают пипеткой 1,8 мл физиологического раствора.

Затем в первую пробирку вносят 0,2 мл из основного разведения культуры микроба, получая разведение 500 млн. микробных тел.

Далее делают разведение 250, 125, 62,5 млн/мл и т.д., каждое разведение готовят отдельной стерильной пипеткой.

Содержимое каждой пробирки вводят подкожно белым мышам массой 18-20 г.

За животными наблюдают в течение 10 дней, отмечая погибших животных. Минимальное количество микробов, вызвавшее гибель белой мыши, принимается за MLD.

*Определение LD<sub>50</sub>.* В настоящее время этот метод определения вирулентности микробов более достоверный и менее зависит от индивидуальной чувствительности животного.

Из культуры бактерий или вирусов делают десятикратные разведения. Каждое разведение вводят нескольким животным.

Очень трудно подобрать такое разведение, которое вызывало бы гибель 50 % животных, поэтому в настоящее время применяется метод статистического учета и исчисления LD<sub>50</sub>, предложенный Л. Ридом и Х. Менчем. При исследовании материала, разведенного от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-8</sup>, потребуется 8 групп животных. После прекращения наблюдения отмечают

количество погибших животных в каждой группе и определяют LD<sub>50</sub> при помощи специальных таблиц.

#### Проведение дермонекротической пробы.

Она применяется для выявления некротоксина, содержащегося в фильтрате бульонной культуры.

Для этого у кролика белой масти на боковой поверхности выбривают участок кожи и дезинфицируют, внутрикожно вводят 0,2 мл исследуемого материала. При положительной пробе вначале отмечают гиперемию, затем отек и в последнюю очередь некроз (обычно через 2 – 3 дня).

### **12.3. Бактериологическое исследование трупа**

Основной целью бактериологического исследования трупа является обнаружение микроба, вызвавшего гибель животного, выделение его в чистой культуре и определение места локализации возбудителя.

При вскрытии трупа животного необходимо соблюдать ряд условий.

1. Вскрытие следует производить как можно быстрее после гибели животного, так как кишечная флора быстро проникает в ткани, кровь, органы. При комнатной температуре это происходит через 10-18 часов, а при температуре холодильника – через 20-22 часа. Труп до вскрытия сохраняют на холоде.

2. Вскрытие трупа, взятие материала для исследования производят с соблюдением правил асептики. Инструменты используют только стерильные и меняют при вскрытии каждой полости или каждого органа.

3. Необходимо исключить возможность заражения работающих и загрязнение окружающих предметов. Перед вскрытием трупы мелких животных погружают в дезинфицирующий раствор, у более крупных животных шерсть увлажняют этим раствором. Вскрывают трупы на хорошо выстроганной окрашенной доске, помещенной в металлическую ванночку или кювету с дезинфицирующим раствором. После окончания вскрытия труп

уничтожают.

4. Все данные вскрытия обязательно протоколируют. Записи должны быть подробными и четкими. В протоколе отмечают дату заражения и описание материала, которым производили заражение.

*Порядок вскрытия.* Труп кладут спиной на доску, растягивают в стороны лапы и фиксируют препаровальными иглами или острыми гвоздями. До фиксирования производят осмотр трупа. Отмечают изменение наружных покровов, выпадение шерсти и изменение цвета кожи (при злокачественном отеке и т.п.).

Перед вскрытием инструменты переносят из стерилизатора в банку со спиртом и ватой на дне, перед употреблением их обжигают в пламени.

*Вскрытие наружных покровов.* Вскрытие начинают с продольного разреза кожи от нижней челюсти до лобка. Отсепарируют ее по сторонам, делают надрезы по направлению к конечностям и откидывают в стороны лоскутки кожи, обнажая всю переднюю поверхность. Отмечают состояние подкожной клетчатки и лимфатических узлов. Если последние изменены, делают посевы на питательные среды и препараты-отпечатки (методом разреза прикасаются к предметному стеклу). Использованные инструменты погружают в дезинфицирующий раствор.

*Вскрытие грудной полости.* Обжигают спиртом вскрытую поверхность (протирают спиртом и поджигают его). Пинцетом захватывают мечевидный отросток, делают поперечный разрез под ним и два продольных, перерезая ребра в местах их соединения с хрящами. Лоскут в виде треугольника (основание у диафрагмы, а вершина у ключиц) откидывают вверх и изучают органы грудной клетки, отмечают наличие экссудата, производят посев крови и делают препараты-отпечатки из ткани легких. Кровь из сердца берут пастеровской пипеткой. Предварительно разрезают сердечную сорочку и прижигают поверхность мышцы сердца, прикладывая раскаленный скальпель.

Капилляр пипетки вводят в область желудочка или предсердия через

прижатое место, кровь сама поступает в капилляр, после чего пипетку извлекают, кровь сеют на питательные среды, а из остатка делают мазки.

*Вскрытие брюшной полости.* Осторожно, чтобы не захватить петлю кишки, приподнимают пинцетом брюшную стенку, делают ножницами разрез диафрагмы до лобка и два поперечных. Отвернув мышечные лоскуты, исследуют органы брюшной полости, обращая внимание на величину, цвет и консистенцию селезенки, печени, надпочечников. Обязательно производят посевы из тканей селезенки, печени, мезентериальных лимфатических узлов и экссудата. Материал для посева берут петлей. Поверхность органа прижигают раскаленным скальпелем и производят разрез в этом участке; петлей делают соскоб в месте разреза и сеют на питательные среды. Для приготовления мазков вырезают небольшой кусочек ткани, берут его пинцетом и прикасаются к поверхности предметного стекла местом среза (препарат-отпечаток) или распределяют тонким слоем.

Труп животного после вскрытия сжигают, автоклавируют или кипятят в течение одного-двух часов в карболовом растворе. Все инструменты стерилизуют в автоклаве под давлением или кипячением в стерилизаторе.

### **13. Культивирование анаэробных микроорганизмов**

К группе патогенных анаэробных микроорганизмов принадлежат возбудители эмфизематозного карбункула, столбняка, ботулизма, злокачественного отека, дизентерии ягнят, бродзота, энтеротоксемии, некробактериоза.

Для выделения и культивирования анаэробных микроорганизмов необходимы следующие условия, которые сводятся к созданию анаэробнозона, а также к использованию специальных питательных сред.

Создание анаэробнозона достигается несколькими методами.

1. *Физический метод.* Заключается в том, что посевы помещают в герметичный сосуд, из которого выкачивают воздух и помещают его в

термостат. В этих целях применяют ряд приборов, из которых наиболее распространенным является анаэроустат. Он представляет собой толстостенный металлический цилиндр, закрывающийся сверху массивной, хорошо притертой крышкой. Для создания наибольшей герметизации между крышкой и корпусом помещена резиновая прокладка. Внутри находится этажерка для размещения чашек Петри. В крышке прибора вмонтированы кран и вакуум-манометр.

После того как во внутрь анаэроустата помещены чашки Петри с посевами, его закрывают крышкой, которую фиксируют винтом. К открытому крану присоединяют масляный вакуумный насос и необходимую степень разряжения устанавливают по показателю вакуум-манометра. Когда воздух откачен, кран закрывают и анаэроустат отсоединяют от насоса, а затем помещают в термостат.

При отсутствии анаэроустата для выращивания анаэробов можно использовать эксикатор с краном в крышке.

2. *Химический метод* заключается в том, что в сосуд с посевами помещают химические реагенты, жадно поглощающие кислород. Для этого используют эксикаторы. В эксикатор помещают чашки Петри с посевами и открытую чашку с 10 % раствором едкого натра. На бортик эксикатора помещают пакетик с сухим пирогаллолом. Крышку эксикатора закрывают и легким движением высыпают пирогаллол в раствор едкого натра. Происходит мгновенная реакция с поглощением кислорода. В качестве поглотителя кислорода можно использовать также реакцию между углекислой содой и гидросульфитом натрия.

3. *Комбинированный метод*. Посевы помещают в эксикатор с краном и из него удаляют воздух механическим методом. Предварительно в эксикатор помещают химические реагенты – поглотители кислорода, которые дополнительно создают анаэробные условия.

4. *Биологический метод* создания анаэробноза основан на совместном выращивании анаэробов и аэробов на плотных питательных средах в

загерметизированных чашках Петри. Вначале вырастают аэробы, которые используют кислород, при его отсутствии начинают расти анаэробы. Этот метод ненадежен и может быть использован только для культивирования нестрогих анаэробов.

Питательные среды, на которых выращивают анаэробы, по своему составу аналогичны обычным средам. Отличаются лишь тем, что они сами по себе должны создавать анаэробные условия. С этой целью питательные среды разливаются высоким столбиком, до посева жидкие среды кипятят для удаления из них кислорода, а на их поверхность наслаивают вазелиновое масло для изоляции от атмосферного кислорода. Кроме этого в состав питательных сред входят различные редуцирующие вещества, уменьшающие содержание в них свободного кислорода. В качестве редуцирующих веществ обычно используют глюкозу (1-2 %), муравьинокислый натрий 0,3-0,5 % и пр. Часто в жидкие питательные среды опускают какие-либо пористые вещества (кусочки тканей, пемзу, вату), которые адсорбируют на своей поверхности воздух.

Для выделения анаэробных бактерий из патологического материала, а также для их накопления и сохранения используют жидкую питательную среду Китта-Тароцци (мясо-пептонный печеночный бульон — МППБ). В состав МППБ входит печеночный экстракт с МПБ (1:1), который разливают по пробиркам высоким столбиком. На дно пробирки предварительно помещают кусочки вареной печени, а сверху после разлива среды наслаивают вазелиновое масло.

В ряде случаев к МППБ добавляют стерильный раствор глюкозы в количестве 0,5 % (в пересчете на сухое вещество).

Для дифференциации патогенных анаэробов используют среды: кровяной агар Цейслера, сахарный МПА, молоко, железо-сульфатный агар (среда Вильсона-Блера) и др.

*Кровяной агар (Цейслера):* 3 % мясо-пептонный агар с 1-2 % глюкозы, смешивают (при температуре 50 °С) с 15-20 % свежей дефибрированной

крови барана, крупного рогатого скота, лошади.

Пользуются также кровью кролика или морской свинки, добавляя ее в количестве 5-7 %. Питательную среду разливают по чашкам Петри и подсушивают в термостате 20-30 мин. После посева культуры выращивают в анаэробных условиях.

*Сахарный агар* готовят на бульоне Мартена с добавлением 0,1 % глюкозы и 2 % агар-агара.

*Молоко* обезжиривают и разливают по пробиркам высоким столбиком и сверху наслаивают вазелиновое масло.

*Железо-сульфитный агар (Вильсона-Блера)*. К 100 мл 3 % МПА с 10 % глюкозы прибавляют 10 мл 20 % раствора сульфита натрия и 1 мл 8 % раствора хлорида железа. Черные колонии образуют анаэробные бактерии за счет восстановления сульфита натрия в сульфат натрия, который, соединяясь с хлорным железом, образует черный осадок сульфида железа.

Изолированные колонии анаэробов можно получить, используя различные методы.

Метод Виньяль-Вайона основан на том, что исследуемый материал разводят в расплавленном до 45 °С сахарном МПА. Затем из каждой пробирки быстро насасывают агар в стерильную пастеровскую пипетку. Тонкий конец пипетки запаивают. Запаянные пипетки помещают в термостат в стеклянном цилиндре. В зависимости от исходной концентрации в той или иной пипетке через 2-3 суток после посева можно наблюдать образование изолированных колоний. При необходимости исследовать колонию, трубку надпиливают и разламывают, а столбик агара выдавливают в чашку Петри и извлекают колонии бактериологической петлей.

Получить изолированные колонии анаэробов можно, используя метод Перетца. Для этого в чашки Петри помещают стеклянные палочки или спички и на них укладывают стеклянные пластинки размером 6х6 см. Исследуемый материал разводят расплавленным и остуженным сахарным МПА. Содержимое пробирок быстро перемешивают и выливают в чашки

таким образом, чтобы агар заполнил пространство между стеклянной пластинкой и дном чашки. Толщина агарового слоя под стеклом должна быть равна 1-2 мм. Посевы инкубируют в термостате при 37 °С. Через 18 ч под пластинкой вырастают колонии анаэробов. Выделение чистых культур анаэробных бактерий проводится в следующем порядке.

Первый день. Исследуемый материал засевают в несколько пробирок в среду накопления Китта-Тароцци градуированной или пастеровской пипеткой. Перед посевом эту среду прогревают в кипящей водяной бане 10-20 мин для удаления растворенного в ней воздуха, а затем охлаждают до 30-37 °С.

Часть пробирок с посевами прогревают в водяной бане при 80 °С 20 мин для уничтожения неспорных форм бактерий. Затем все посевы культивируют в термостате при 37 °С.

В этот же день проводят заражение лабораторных животных исследуемым материалом.

Второй день. При росте анаэробов в среде Китта-Тароцци обнаруживают появление помутнения или помутнение и газообразование. Материал для приготовления мазков берут пастеровской пипеткой, которую опускают через слой масла до дна пробирки. Масло с поверхности стенок пипетки удаляют стерильной ватой при помощи пинцета. Эту операцию производят аккуратно над сосудом с дезинфицирующим раствором.

Мазки готовят обычным способом, фиксируют на пламени и окрашивают по Граму. При микроскопии регистрируют наличие грамположительных палочковидных форм (со спорами или без спор) и пересевают культуру из среды Китта-Тароцци на плотные питательные среды: для выделения чистой культуры и изучения культуральных свойств бактерий. Для этого подготавливают три чашки Петри с кровяно-сахарным МПА. Каплю материала со среды Китта-Тароцци наносят на поверхность плотной питательной среды, распределяют ее стеклянным шпателем. Этим же шпателем последовательно производят посев на вторую и третью

чашки.

Посевы на 24-48 часов помещают в анаэроустат или другие приборы и инкубируют при 37 °С.

Изолированные колонии анаэробных микробов можно получить в глубине плотной питательной среды. Для этой цели используют также метод последовательного разведения с применением трубок Вейон-Виньяля или метод Перетца.

Третий день. Производят изучение выросших изолированных колоний и из типичных делают мазки и отсевают в среду Китта-Тароцци для выделения чистой культуры анаэробных бактерий.

Четвертый день. Из выросшей культуры на МППБ готовят мазки, окрашивают по Граму, проводят микроскопию и убеждаются в том, что выделена чистая культура бактерий.

Полученную культуру засевают на дифференциальные питательные среды: кровяно-сахарный МПА, сахарный МПА, молоко, на среду Вильсона-Блера.

Пятый день. Проводят идентификацию выделенной культуры из исследуемого материала по морфологическим, тинкториальным, культуральным, биохимическим, а также и вирулентным свойствам.

После гибели лабораторного животного от заражения производят бактериологическое исследование трупа. С этой целью из патологического материала готовят мазки, окрашивают их по Граму, проводят посев на МППБ и дифференциальные питательные среды.

При необходимости проводят исследования по обнаружению токсина биологическим методом на лабораторных животных.

Сроки лабораторного исследования на анаэробные инфекции колеблются от 8 до 15 дней.

## 14. Методы изучения микроскопических грибов и актиномицетов

Грибы (*Fungi*) – низшие растения, характеризуются следующими свойствами: широко представлены в природе, не имеют хлорофилла, наличие у большинства видов вегетативных органов гиф, которые, переплетаясь, образуют мицелий. Они относятся к аэробам, по типу питания – метатрофы, нетребовательны к условиям внешней среды.

Значение микроскопических грибов (плесени) в патологии сводится к тому, что они могут вызывать различные болезни, а их токсины массовые отравления у животных и человека.

Болезни, вызываемые патогенными грибами у человека и животных, называют микозами.

К микозам относятся дерматомикозы: стригущий лишай (трихофития, микроспория), парша; бластомикозы, кандидамикозы, аспергиллезы и др.

Болезни, возникающие при поедании животными кормов, пораженных различными видами токсических грибов, называют микотоксикозами. К ним относятся фузариотоксикоз, аспергиллотоксикоз, дендродохиотоксикоз, клавицепстоксикоз и др. Патогенные и токсигенные грибы относятся к классам: зигомицеты, аскомицеты, базидомицеты, дейтеромицеты. Они отличаются друг от друга по типу мицелия, по наличию и строению органов плодоношения, по типу спор и другим признакам.

При морфологическом изучении у грибов устанавливают вегетативное тело, которое у большинства грибов состоит из тонких ветвящихся нитей – гиф, образующих сплетение – мицелий.

По строению мицелия грибы подразделяются на низшие и высшие.

У низших грибов (фикомицеты) гифы не септированы и они представляют собой одну гигантскую клетку с многочисленными ядрами без перегородок.

У высших грибов (микомицеты) гифы имеют перегородки, разделяющие их на отдельные одноядерные или многоядерные клетки, называемые

септами.

Другая группа грибов не образует мицелия – дрожжи, дрожжеподобные клетки, одноклеточные организмы, относящиеся к классу аскомицетов (сумчатые грибы).

Размножение грибов происходит двумя способами: вегетативным и репродуктивным. К последнему относится бесполое и половое размножение.

*Вегетативное размножение* может происходить за счет случайно оторвавшейся части мицелия.

Часть мицелия может превращаться в оидии (артроспоры), дающие начало новой грибнице. На более высших ступенях развития грибов на мицелии могут появляться хламидоспоры, которые отличаются от оидий более толстой оболочкой.

У дрожжей очень часто при размножении происходит простое деление клеток, которые остаются связанными вместе (почкование).

*Репродуктивное размножение* происходит с помощью спор, которые образуются бесполом и половым путем. Фикомицеты размножаются половым и бесполом путем. У микомицетов преобладает бесполое размножение.

Наиболее распространено бесполое размножение с помощью спор, развивающихся на особых ответвлениях мицелия (спорангиеносцев), имеющих структуру мешков-спорангиев, в которых формируются споры (эндоспоры), характерные для низших мукооровых грибов. У грибов аскомицетов спорангии называют асками, а споры – аскоспорами.

Экзогенные споры – конидии – образуются на концевых участках особых гиф – конидиеносцы, которые могут быть простыми или разветвленными. У аспергиллов конидиеносец на конце имеет округлое вздутие, на поверхности которого сплошным слоем расположены клетки в один или два ряда – стеригмы.

Микологическая диагностика сводится к:

1) микроскопии первичного исследуемого материала;

2) выделению чистой культуры возбудителя с использованием специальных питательных сред и определению его родовой и видовой принадлежности;

3) определению патогенных и токсигенных свойств на биологических моделях.

При микозах в лабораторию направляют соскобы с кожи с захватом волос на границе со здоровой тканью, соскобы со слизистых оболочек ротовой полости, молоко, трупы птиц и мелких животных и др.

При микотоксикозах направляют пробы кормов (солома, сено, зернофураж, комбикорм, отруби и др.), рвотные массы, от трупов – желудок, кишечник с содержимым, паренхиматозные органы и др.

Для микроскопического исследования на дерматоксикозы патологический материал предварительно обрабатывают 10-20 % раствором NaOH или KOH в течение 15-20 мин. Небольшое его количество препаровальной иглой или глазным пинцетом переносят на предметное стекло, добавляют 50 % водный раствор глицерина и накрывают покровным стеклом.

Микроскопию препарата «раздавленная капля» проводят под световым микроскопом с использованием объективов х8 и х40 в затемненном поле зрения (с прикрытой диафрагмой конденсора).

Морфологическая картина в препаратах, приготовленных из патологического материала, представлена: при трихофитии – мицелий не разветвлен, гифы и споры лежат правильными рядами вдоль волоса, при микроспории гифы и споры, по отношению к волосу, располагаются беспорядочно.

Для выделения чистой культуры микроскопических грибов проводят посевы на специальные питательные среды: сусло-агар, Сабуро, Чапека и др.

В состав суслового агара входит неохмеленное пивное сусло и 2 % агар-агара, среда Сабуро включает в себя глюкозу, пептон и агар-агар, среда Чапека – глюкозу, набор минеральных солей и агар-агар.

Посевы культивируют в термостате при 25-30 °С.

Рост грибов на средах появляется на 7-10 день.

При определении рода и вида грибов изучаются их морфологические особенности в динамике на питательных средах при соответствующих условиях. С этой целью колонии грибов, выросших на средах, микроскопируют под стереоскопическим или обычным микроскопом с объективом х8. Далее готовят препараты «раздавленная капля». Для этого препаративными иглами или микологическим крючком отделяют небольшой участок мицелия с плодоносящими гифами и прилегающим к нему слоем питательной среды, переносят на предметное стекло в каплю 50 % водного раствора глицерина и придавливают покровным стеклом. Такие неокрашенные препараты микроскопируют как обычно.

Для выявления дрожжей и дрожжеподобных организмов готовят препараты для микроскопии, фиксируют физическим или химическим методами, окрашивают раствором метиленовой сини и микроскопируют.

Особенности строения некоторых низших и высших микроскопических грибов характеризуются следующими признаками.

Мукоровые грибы, или головчатая плесень (*Mucor*), относятся к фикомицетам – грибам с ветвящимся одноклеточным, пушистым, серовато-сизого цвета мицелием.

В мицелии отсутствуют перегородки. Из мицелия поднимаются вверх спорангии в виде головок, которые содержат эндоспоры.

Пенициллиум, или кистевидная плесень (*Penicillium*), – род плесени, имеющий большое количество видов. В верхней части конидиеносец разветвлен и формирует кисть из стеригм с цепочками конидий на них (экзоспоры).

Аспергилл, или леечная плесень (*Aspergillus*), обладает многоклеточным мицелием. На конце плодоносящей мицелиальной нити выступают округлые или булабовидные образования, от которых отходят в радиальном направлении короткие отростки – стеригмы, на конце последних экзоспоры.

Фузариум (*Fusarium*) – плесень, обладающая мицелием, окрашенным в зависимости от вида гриба в различный цвет (желтый, коричневый и др.). Образует конидии серповидные: одноклеточные – микроконидии, многоклеточные – макроконидии. Гриб может образовывать также хламидоспоры.

Стахиоботрис (*Stachyobotrys*) – мицелий септирован, многоклеточный, от которого вверх поднимаются спороносные гифы конидиеносцы со стеригмами и сидящими на них конидиями. Конидиеносцы бесцветные, гладкие, в верхней части бородавчатые, оливко-бурого цвета.

Дрожжевые грибы представляют собой крупные клетки овально-сферической формы. Они не образуют мицелия и размножаются различными путями: почкованием, делением, половым путем и эндоспорами, которые располагаются в особых сумках (асках) и называются аскоспорами.

Дрожжеподобные грибы не образуют истинного мицелия. Однако при размножении их клетки располагаются цепочками, вытягиваются в длинные нити, которые называют псевдомицелием.

Для определения токсичности грибов готовят экстракт из пораженного корма и выросшей культуры. Экстрагируют эфиром (можно ацетоном или хлороформом) в аппарате Сокслета или стеклянной банке с притертой крышкой. Экстракт выпаривают в водяной бане при 45-50 °С под тягой. Токсичность определяют алиментарно (скармливанием) или постановкой кожной пробы.

Алиментарную пробу проводят на белых мышах, морских свинках, кроликах, цыплятах путем скармливания им исследуемого корма или вытяжки в течение трех дней.

Кожная проба ставится на кроликах. Для этого на свежесбранный участок (размером 4-5 см<sup>2</sup>) втирают экстракт. В положительном случае через 1-3 дня отмечается гиперемия, отечность и далее некроз. Биопробу можно проводить на куриных эмбрионах, аквариумных рыбках, парамециях.

Актиномицеты (лучистые грибы) имеют сходное строение с

микроскопическими грибами. Тело их представляет собой одну, очень разветвленную клетку (мицелий), которая состоит из цитоплазмы, недифференцированного ядра и оболочки. Толщина ветвящихся нитей мицелия – гиф – незначительна: от 0,2 до 1,2 мкм, длина может достигать нескольких десятков микрометров. На плотной питательной среде они образуют плотные колонии, врастающие в среду, которые сверху имеют конидиеносцы со спорами в виде мучнистого налета.

Учитывая особенности роста актиномицетов, мазки готовят следующим образом. Препаровальной иглой отделяют небольшой участок мицелия и помещают в каплю глицерина, затем покрывают его покровным стеклом и слегка прижимая, раздавливают мицелий. Готовые препараты микрокопируют под малым и средним увеличением микроскопа с прикрытой диафрагмой.

Из патологического материала готовят обычным способом мазки, окрашивают простым методом и по Граму. Микрокопируют иммерсионным объективом.

Патогенные актиномицеты вызывают у животных и у человека болезнь, которая называется актиномикоз.

В организме больных животных актиномицеты образуют друзы – мелкие желтовато-белого цвета зерна.

Друзы извлекают из гноя петлей и помещают в каплю глицерина на предметное стекло, слегка придавливают покровным стеклом и вводят каплю раствора метиленовой сини. Микрокопию проводят объективами x8 и x40.

В центре друзы обнаруживают густое сплетение укороченных нитей с лучеобразно отходящими гифами, колбовидно утолщенными на концах. Окрашиваются актиномицеты метиленовой синью в бледно-голубой цвет, элементы гноя – в интенсивно синий цвет.

## **15. Методы изучения риккетсий, хламидий и микоплазм**

### **15.1. Методы изучения риккетсий**

Риккетсии – группа микроорганизмов, особенностью которых является облигатный паразитизм. Они могут вызывать различные болезни животных и человека, лихорадку Ку, гидроперикардит, риккетсиозный моноцитоз собак, риккетсиоз жвачных и всеядных.

При проведении лабораторной диагностики из патологического материала готовят мазки-отпечатки и окрашивают их по Романовскому-Гимзе, по Граму.

При микроскопии видны мелкие полиморфные клетки: диаметр кокковидных форм около 0,5 мкм, размеры палочек 1-1,5x3-4 мкм; нитевидные формы имеют длину 10-40 мкм. Риккетсии не образуют спор и капсул, неподвижны, Гр-.

Риккетсии не растут на искусственных питательных средах, для их культивирования используют куриные эмбрионы, культуры клеток млекопитающих, заражают белых мышей.

При диагностике риккетсиозов широко используют серологические реакции.

### **15.2. Методы изучения хламидий**

Хламидии относятся также к облигатным паразитам. Они могут вызывать различные болезни животных и человека – орнитоз, хламидиозы рогатого скота и других видов сельскохозяйственных животных.

Лабораторная диагностика сводится к микроскопии исследуемого материала, выделению из него хламидий и проведению серологических реакций.

Хламидии имеют очень малые размеры (0,2-1,3 мкм), полиморфны – палочковидные или сферические. Размножаются делением, процессу деления

предшествует образованию вокруг частицы хламидий капсулы, напоминающей бактериальную. Хламидии не образуют спор, неподвижны, Гр-.

Хорошо окрашиваются по Романовскому-Гимзе.

Хламидии не растут на искусственных средах, для их культивирования используют куриные эмбрионы, культуры клеток и белых мышей.

### **15.3. Методы изучения микоплазм**

Микоплазмы вызывают у крупного рогатого скота перипневмонию, у коз инфекционную агалактию, у птиц респираторный микоплазмоз.

При лабораторной диагностике микоплазм проводят микроскопию исследуемого материала, выделение из него микоплазм на питательных средах и заражение животных.

При микроскопии препаратов, окрашенных по Романовскому-Гимзе, по Граму, устанавливают полиморфные микроорганизмы шаровидной или палочковидной формы, которые имеют очень малые размеры – от 0,2 до 1,3 мкм.

Микоплазмы не образуют спор и капсул, неподвижны, Гр-.

Отличительной особенностью является отсутствие клеточной оболочки, благодаря чему они не имеют постоянной формы, проходят через бактериальные фильтры и не чувствительны к пенициллину. Размножаются делением, относятся к факультативным анаэробам и весьма требовательны к питательным средам – растут на средах с добавлением к ним стиролов и фосфолипидов.

## **16. Методы идентификации возбудителей инфекционных болезней**

После выделения инфекционного агента из материала от больного животного необходимо их идентифицировать, т. е. определить вид микроба.

Ориентировочно определить вид выделенного микроба можно на основании клинических признаков, эпизоотологических данных, патологоанатомических изменений, изучения морфологических, тинкториальных, культуральных и биохимических свойств.

Окончательное и быстрое типирование неизвестного микроба возможно с помощью комплекса серологических методов. Для этого выделенный микроб используют в качестве антигена и с ним ставят несколько серологических реакций. В каждой реакции применяют иммунные сыворотки, содержащие специфические антитела к заведомо известным микробам. Та сыворотка, с которой выделенный микроб будет давать положительную серологическую реакцию, и укажет на вид микроба. Важно правильно выбрать нужную серологическую реакцию.

Большое значение для идентификации выделенного микроба приобрела реакция связывания комплемента (РСК) с разными разведениями известных сывороток и несколькими дозами комплемента; предпочтительно на холоде.

Если микроб выделен на культуре клеток, и он дает гемадсорбцию, то его следует идентифицировать в реакции торможения гемадсорбции (РТГАд), а если обладает гемагглютинирующей активностью – в реакции торможения гемагглютинации (РТГА). Если у выделенного микроба указанные свойства отсутствуют, то его идентификацию проводят с помощью реакции диффузной преципитации (РДП) в агаровом геле. Но для постановки этой реакции у антигена и гипериммунной сыворотки должны быть высокие титры, так как РДП обладает сравнительно низкой чувствительностью.

Реакция нейтрализации (РН) обладает высокой специфичностью. Она наиболее универсальна и обеспечивает достоверные результаты при идентификации выделенных микробов. Вместе с тем постановка РН отличается трудоемкостью.

## РАЗДЕЛ 2

### ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Современная вирусология обладает широким выбором средств обнаружения, культивирования и идентификации вирусов, что позволяет своевременно установить причину и характер заболевания, распознать и определить болезнь, т.е. поставить диагноз. Для постановки диагноза необходимо собрать фактические данные о проявлениях заболевания и анамнезе животных, произвести сопоставление и анализ информации и только после этого сделать заключение о болезни. Своевременно и точно поставленный диагноз предопределяет успех борьбы с болезнью.

В большинстве случаев постановка диагноза начинается со сбора данных об эпизоотической обстановке, клинических признаках болезни и патолого-анатомических изменениях. Эпизоотическую обстановку характеризуют сведения об источнике возбудителя, механизмах и скорости распространения болезни, об охвате поголовья заболевших животных, о случаях падежа, сезонности, наличии переносчиков инфекции, массовых прививках, перегруппировках и др. Клинические признаки болезни включают данные о температуре, пульсе, дыхании, поведении животного, состоянии кожных покровов, характере приема корма и т. д. Патолого-анатомические изменения включают сведения об отклонениях от нормы размеров, формы, цвета, консистенции органов и тканей, а также появлении образований – узелков, кровоизлияний, пузырей и т. д.

Тщательный анализ всей информации позволяет поставить клинико-эпизоотологический диагноз, который носит только предварительный характер, так как многие признаки совпадают, т. е. являются общими при различных заболеваниях.

Для того чтобы поставить окончательный диагноз, необходимо располагать данными лабораторных исследований вирусосодержащего материала, взятого от больных животных или трупов. Лабораторные

исследования проводят независимо от предварительного диагноза. Их значение возрастает особенно в том случае, когда заболевание протекает атипично или в виде смешанной инфекции, а также при расшифровке этиологии новых, ранее неизвестных заболеваний.

Лабораторные методы диагностики вирусных инфекций, как и бактериальных, основаны на обнаружении в патологическом материале возбудителей на острой стадии болезни и на выявлении прироста противовирусных антител у животных-реконвалесцентов (переболевшие и выздоравливающие).

В лабораторию следует направлять такой материал, который с наибольшей вероятностью может содержать возбудителей болезни. При взятии патологического материала необходимо соблюдать следующие правила: 1) материал берут строго асептически, так как наличие в пробах других микроорганизмов ведет к разрушению вирусов. Применение дезинфицирующих средств недопустимо; 2) материал немедленно консервируют, чтобы предотвратить разрушение вирусов ферментами и другими факторами. Это достигается его замораживанием в термосе с охлаждающей смесью или добавлением 50 % стерильного глицерина (химически чистый глицерин смешивают пополам с физиологическим раствором и стерилизуют в автоклаве при 120 °С в течение 30 мин; рН раствора доводят до 7,2-7,6. Кусочки органов должны быть полностью покрыты раствором глицерина); 3) на пробирке, флаконе с материалом должна быть несмываемая этикетка, на термосе – бирка. Нарочному дается сопроводительное письмо с указанием названия хозяйства, больных животных, предварительного диагноза, вида и количества патматериала, четко сформулированной задачи, на что провести исследования, даты и фамилии врача отправляющего материал.

Патологический материал берут в стерильную посуду (пробирку, флакон с резиновой пробкой) в небольшом количестве – 5-10 г. В зависимости от клинических признаков болезни и локализации возбудителя

от больного животного прижизненно берут следующие пробы: слюну, глазные и носовые истечения; содержимое везикул и пустул; стенки везикул и корочки на коже; фекальные массы непосредственно из прямой кишки, мочу; кровь или сыворотку крови, взятые дважды – в начале болезни и через 2-3 недели.

От трупов патологический материал берут не позднее 2-3 ч после клинической смерти или вынужденного убоя животного: это кусочки пораженных органов и тканей, в первую очередь из печени, селезенки, легких, головного мозга, лимфатических узлов, в которых вирусы чаще всего локализуются.

Лабораторная диагностика вирусных болезней включает: 1) экспресс-методы; 2) вирусологические методы; 3) серологические методы (ретроспективная диагностика).

## **17. Экспресс – методы**

Экспресс-методы позволяют в короткие сроки обнаружить в патологическом материале вирусы в неактивной форме, а именно вирусные антигены, тельца-включения и элементарные тельца.

Для обнаружения вирусных антигенов в патологическом материале используют наиболее чувствительные методы, так как их концентрация в нем обычно низкая. Наибольшее распространение получила реакция иммунофлуоресценции (РИФ). Для этого на мазки-отпечатки или срезы из патматериала наносят меченные флуорохромами гипериммунные сыворотки, при этом образуются светящиеся иммунные комплексы. Препараты просматривают с помощью люминесцентного микроскопа. Этот метод флуоресцирующих антител отличается быстротой и очень высокой чувствительностью. Однако его результаты требуют подтверждения другими методами из-за возможного неспецифического свечения.

Вирусные гемагглютинины в патматериале обнаруживают с помощью

реакции гемагглютинации (РГА). Гемагглютинин – это белок, расположенный в оболочке вируса. Явление гемагглютинации обусловлено склеиванием эритроцитов крови с помощью вируса. Механизм его состоит в том, что одна вирусная частица с помощью своего гемагглютинина адсорбируется одновременно на двух эритроцитах, образуя «мостик» между ними, в результате чего эритроциты склеиваются между собой и выпадают в осадок в виде раскрытого зонтика.

Тельца-включения и элементарные тельца вирусов указывают на присутствие вирусов в патологическом материале. Тельца-включения – это внутриклеточные элементы, образующиеся в клетках как результат репродукции в них некоторых вирусов (около 100 вирусов). Как правило, РНК-вирусы образуют цитоплазматические включения, ДНК-вирусы – внутриядерные. Тельца-включения, образуемые вирусом осповакцины, называют тельцами Гварниери, оспы овец – Борреля, оспы кур – Боллингера, чумы плотоядных – Лейтца, инфекционного ларинготрахеита кур – Зейфреда. Наиболее известны и имеют практическое значение тельца Бабеша-Негри, образуемые вирусом бешенства в цитоплазме нервных клеток: на их обнаружении основан один из методов лабораторной диагностики бешенства. Для этого из определенных отделов головного мозга (аммоновы рога, мозжечок, продолговатый мозг) подозреваемого на заболевание бешенством животного готовят гистологические срезы или препараты-мазки. Срезы окрашивают по Муромцеву (Туревичу, Селлерсу и др.), препараты-мазки обрабатывают меченой флуорохромом иммунной сывороткой. Гистосрезы просматривают под световым микроскопом, препараты-мазки – под люминесцентным микроскопом. Если в серии препаратов будут обнаружены тельца Бабеша-Негри, то наличие вируса бешенства считается доказанным. Обнаружение телец-включений при других вирусных болезнях имеет лишь вспомогательное диагностическое значение.

Крупные вирусы, названные в свое время элементарными тельцами, в патологическом материале обнаруживают под обычным световым

микроскопом после их обработки солями тяжелых металлов (например, элементарные тельца при оспе).

### **18. Вирусологические методы**

Вирусологические методы предназначены для обнаружения активных форм вируса путем его выделения на живых биологических системах – культурах клеток и тканей, развивающихся куриных эмбрионах и лабораторных животных.

Для этого из патологического материала делают 10 % суспензию на стерильном физиологическом растворе (рН 7,2-7,4), затем освобождают ее от крупных частиц путем центрифугирования в течение 20-30 мин при оборотах 2000-3000 мин<sup>-1</sup>. Для подавления бактериальной микро- и микофлоры к суспензии добавляют смесь антибиотиков (обычно пенициллин и стрептомицин по 200-1000 ЕД каждого на 1 мл жидкости и нистатин) или для очистки пропускают ее через бактериальные фильтры. Эффективность такой обработки суспензии контролируют с помощью посевов ее на специальные питательные среды (для аэробов и анаэробов). Полученной и обработанной таким образом суспензией заражают живые биологические системы и регистрируют появление у них признаков репродукции вируса, что служит показателем наличия вируса в патматериале. Однако вирус не всегда проявляет свое действие в первом пассаже и иногда требуется провести 2-3 «слепых» пассажа, чтобы вирус адаптировался к биологической системе и накопился в достаточном количестве для проявления своего действия.

### **19. Культивирование вирусов в живых биологических системах**

Культивирование вирусов производят для накопления вируссодержащего материала с целью обнаружения и изучения иммунобиологических, антигенных, морфологических и других свойств вирусов, а также для приготовления биологических препаратов (вакцин, гипериммунных сывороток и др.).

Известно, что вирусы являются облигатными паразитами, т. е. репродуцируются только внутри живых клеток. Поэтому до настоящего времени не удалось получить культуры вирусов в искусственной среде, не содержащей живые клетки. Хотя за последние годы появились сообщения относительно биосинтеза компонентов вирусов в системе разрушенных клеток. Способность вирусов размножаться только в живых клетках является наиболее характерным их свойством.

В настоящее время существуют следующие методы культивирования вирусов:

- 1) на восприимчивых домашних и лабораторных животных (телята, мыши, белые крысы, кролики, морские свинки, хомяки, цыплята);
- 2) на развивающихся куриных эмбрионах, деэмбрионированных яйцах и эмбрионах других видов птиц;
- 3) в культурах ткани и клеток.

## **20. Культивирование вирусов на естественно-восприимчивых и лабораторных животных**

Последовательные пассажи вирусов на восприимчивых животных способствуют их репродукции и усилению патогенности. Для культивирования вирусов в каждом конкретном случае подбирают наиболее чувствительных домашних или лабораторных животных, в организме которых сложились наиболее благоприятные условия для репродукции.

Культивирование вирусов в организме животных является самым простым и древним методом, например, еще Л. Пастер с сотрудниками в 1885 г. культивировал уличный вирус бешенства в организме кроликов.

Следует отметить, что не все вирусы можно культивировать в организме лабораторных животных. Большая часть вирусов не продуцируется подобным образом. Это зависит от чувствительности животных к вирусам. Например, вирус осповакцины человека репродуцируется в организме всех видов животных. Наоборот, вирус оспы

свиней репродуцируется только в организме данного вида.

Влияют на чувствительность животных к вирусам следующие факторы.

1. Возраст. Наиболее восприимчивы молодые животные - (мышата, крольчата и др.), так как у них нет совершенной системы защиты организма. Однако эмбрионы некоторых животных, находясь в утробе матери, начинают вырабатывать специфические антитела. Например, эмбрионы крупного рогатого скота с 6 месячного возраста вырабатывают антитела.

2. Наличие неспецифических ингибиторов, которые выполняют защитную функцию организма. В организме молодых животных низкое содержание ингибиторов, но с возрастом их концентрация увеличивается и соответственно повышается сопротивляемость организма к вирусам.

3. Пол животных. Наиболее чувствительны особи женского пола – самки (болезнь Марека), менее – мужского пола (самцы).

4. Генетические линии. Одни животные более чувствительны, другие – резистентны. Например, к болезни Марека резистентны линии птиц. Это связано с проявлением активных иммунологических реакций всего макроорганизма в целом, а не с проявлением клеточных факторов.

Для культивирования вируса чумы крупного рогатого скота используют телят в возрасте 6-8 мес; для культивирования вируса ящура – телят, крольчат, морских свинок, белых крыс и новорожденных белых мышей.

В 1879 г. Гольтье впервые осуществил культивирование вируса бешенства, заразив кролика мозгом больной собаки. Левенштейн 1919 г. первый опубликовал данные об успешной передаче вируса герпеса от человека кролику. Грютер в 1920 г. доказал возможность культивирования вируса герпеса на кроликах.

Перед заражением всех животных выдерживают в карантине в течение 2-3 недель. В этот период за ними ведут клиническое наблюдение, ежедневно двукратно измеряют температуру тела, проводят бактериологические, серологические и гематологические исследования для исключения

инфекционных и паразитарных болезней. Для культивирования вирусов используют только животных клинически здоровых, одного возраста и породы, из хозяйства, благополучного по инфекционным заболеваниям. В последние годы, как за рубежом, так и в нашей стране начали использовать для культивирования гнотобиотов (безмикробных, стерильных животных).

**Метод заражения подопытных животных.** Животных подбирают с учетом тропизма культивируемого вируса (к данному виду).

При культивировании *нейротропных* вирусов, развивающихся в клетках нервной системы, животных заражают в головной мозг (фиксированный вирус бешенства, нейротропные штаммы вируса Ньюкаслской болезни, вирус энцефаломиелита лошадей, шотландского энцефалита овец, болезни Ауески, или псевдобешенства, и др.).

Наиболее восприимчивы к большинству нейротропных вирусов мыши, поэтому пассажи чаще проводят на белых мышах. Зараженных животных в период ясно выраженной клинической болезни убивают эфиром или хлороформом, тушки дезинфицируют растворами дезсредств. Затем с головы животного отделяют кожу, вскрывают черепную коробку, извлекают головной мозг, помещают его в стерильную баночку или пробирку, или чашку Петри. От мозга каждого животного отрезают маленький кусочек и помещают в пробирку с сахарным бульоном для контроля на бактериальную загрязненность. Через 2-3 суток после просмотра посевов из стерильных образцов вирусного материала готовят 10 % суспензию для заражения очередной партии подопытных животных (следующий пассаж вируса).

При культивировании *пневмотропных* вирусов (инфекционная плевропневмония коз, инфлюэнца свиней, грипп и др.) в качестве вирусодержащего материала используют легкие, смывы из носовой и ротовой полостей, зева. Из них готовят 10 % суспензию на фосфатном буфере, затем центрифугируют при сравнительно малых оборотах (2000-3000 мин<sup>-1</sup>); надосадочную жидкость используют для заражения животных интраназальным или интратрахеальным способами. У животных, заболевших

после заражения с типичной клинической картиной, в качестве вирусодержащего материала берут легкие.

При *пантропных инфекциях* (чума свиней, классическая чума птиц, чума крупного рогатого скота, африканская чума свиней и др.) используют в качестве вирусодержащего материала кровь, селезенку, печень, лимфатические узлы больных животных, которые извлекают с соблюдением условий стерильности. Из органов и тканей готовят соответствующую суспензию, которую применяют для последующего заражения внутривенным или подкожным методами.

Для культивирования *дерматропных* вирусов (оспа овец и птиц, ящур, ларинготрахеит птиц, эктима овец и др.) используют пораженные участки кожи больного животного, суспензию из везикул и пустул (при оспе, ящуре), из оспенных эпителиом или дифтеритических клеток (при оспе, дифтерите птиц) или материал, взятый из трахеи (при ларинготрахеите птиц). Вирусодержащий материал лабораторным животным вводится внутрикожно.

Культивирование вирусов в организме животных имеет недостатки: 1) не все вирусы культивируются в организме лабораторных животных; 2) лабораторные животные потенциально могут быть носителями различных скрытых инфекционных заболеваний; 3) материальные затраты на кормление, содержание животных.

## **21. Культивирование вирусов в развивающихся куриных эмбрионах**

Культивирование вирусов в куриных эмбрионах наиболее совершенный метод. Впервые был применен Раусом в 1911 г. для выделения вируса саркомы белых мышей. В 1931 г. Вудрафф и Гудпасчер заразили хорион-аллантаисную оболочку куриного эмбриона вирусом оспы птиц.

Вирусы, имеющие эпителиотропные свойства (оспа, осповакцина, оспа

птиц, ларинготрахеит и др.), успешно развиваются на хорион-аллантаической оболочке, вызывая макроскопически видимые изменения. Различные представители миксовирусов (грипп А, В и С, Ньюкаслская болезнь, классическая чума птиц, эпидемический паротит, инфекционный бронхит птиц, вирусный гепатит утят, арбовирусы и др.) хорошо репродуцируются в курином эмбрионе при введении их в аллантаическую полость. Некоторые крупные вирусы культивируются в желточном мешке эмбриона, вакцинные штаммы вируса чумы крупного рогатого скота репродуцируются в эмбрионе при внутривенном его заражении.

Культивирование в куриных эмбрионах – наиболее доступный и удобный метод, как для первичного выделения многих вирусов животных, так и для последующего культивирования их в лаборатории.

В основе метода лежит удаление эмбриона (деэмбрионирование) в период, когда к его скорлупе изнутри полностью прилегает хорион-аллантаическая оболочка. Если внутрь такого яйца добавить питательную среду, то образуется своеобразная культура ткани, в которой может репродуцироваться вирус.

Метод обладает рядом преимуществ, так как позволяет получить более чистый вирус, чем в аллантаисно-амниотической жидкости, что важно для снижения алергизирующих свойств вакцин, приготовленных из этого материала, а отсутствие желточного мешка и, следовательно, содержащихся в нем специфических антител способствует размножению некоторых видов вирусов.

Для культивирования используют живые куриные эмбрионы 5-15 суточного возраста. На размножение вирусов в них существенное влияние оказывают температура инкубации, возраст эмбрионов, метод заражения и количество введенного вируса. Многие вирусы (чумы птиц, гриппа, герпеса и др.) активно репродуцируются при температуре от 32 до 37 °С. Некоторые специально селекционированные штаммы удовлетворяет более низкая температура (23-28 °С), но скорость репродукции при этом значительно

ниже. При 39-40 °С вирусы размножаются быстрее, а при 41-42 °С, как правило, они не размножаются. Наиболее активно накапливается вирус при введении в эмбрион 1000-10000 инфекционных доз.

Существует несколько способов заражения куриных эмбрионов 1) на хорион-аллантоисную оболочку; 2) в аллантоисную полость; 3) в амниотическую полость; 4) в желточный мешок.

После введения вируса все зараженные эмбрионы помещают в термостат для инкубирования. Максимальное накопление вируса происходит в течение 24-96 ч в зависимости от его вида. Эмбрионы погибают, после чего их вскрывают, собирают вирусосодержащий материал.

Недостатки метода культивирования вирусов в куриных эмбрионах:

1) куриные эмбрионы могут быть носителями микроорганизмов (сальмонеллы, туберкулезная палочка), в том числе вирусов (лейкоз птиц, бронхит кур и др.) и противовирусных антител; 2) не все вирусы культивируются в куриных эмбрионах.

Культивирование вирусов в деэмбрионированных яйцах – удобный метод для изучения динамики изменения гемагглютининов в зараженном яйце, а также противовирусных свойств различных препаратов.

## **22. Культивирование вирусов на культурах тканей и клеток**

Впервые русский исследователь А.Е. Голубев в 1874 г. дал теоретическое обоснование возможности культивирования тканей вне организма. В 1885 г. профессор Харьковского университета И. П. Скворцов поставил опыт по культивированию клеток крови лягушек, птиц, человека при летней температуре в 1 % растворе либиховского экстракта во влажной камере; ему удалось выращивать клетки в течение нескольких месяцев.

В 1907 г. американский эмбриолог Р. Гаррисон длительно культивировал клетки спинного мозга головастиков по методу висячей капли, показав, что вне организма функция нервных клеток сохраняется, и из них

вырастают нервные волокна. Методика Гаррисона была легко воспроизводима и стала подлинным началом применения метода культуры ткани.

Большой вклад в развитие метода культуры тканей внесли отечественные исследователи. А. А. Кронтовский и Л. И. Палев в 1913 г., изучая жировой обмен клеток культуры тканей, положили начало биохимическим и физико-химическим методам исследования тканевых культур. А. М. Максимов в 1916 г. ввел методику фиксации культур тканей центриформолом с последующим заключением в целлоидин и окраской гематоксилином и азурэозином. В 1925 г. он предложил для большей стерильности культивировать кусочки ткани в сгустке плазмы крови на покровном стекле.

Начиная с 1940-х годов, метод культивирования тканей получает весьма широкое применение во многих областях экспериментальной биологии, в том числе при исследовании ряда теоретических и практических вопросов вирусологии. В настоящее время культуры тканей и клеток стали одними из экспериментальных моделей генной инженерии (клеточная инженерия).

Под культурой ткани и клеток понимают кусочки органов и тканей или отдельные их клетки, которые сохраняют жизнедеятельность и способность размножаться в питательной среде вне организма.

**Культивирование клеток.** Для роста и размножения клеток вне организма необходим комплекс физико-химических факторов. Для клеток млекопитающих и птиц оптимальная температура размножения колеблется в пределах 36-38,5 °С. Для поддержания жизнедеятельности клеток большое значение имеет солевой состав питательной среды, создающий необходимую буферность и изотоничность. Для роста клеток животных обязательно присутствие в среде ионов Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, карбонатов и фосфатов, которые входят в состав всех физиологических солевых растворов. Оптимальный рост и развитие клеток возможны в среде при pH 7,2-7,4;

значительное отклонение от указанного оптимума отрицательно сказывается на росте культуры клеток.

Для роста клеток обязательны кислород и диоксид углерода, при участии которых образуется энергия и осуществляется биосинтез составляющих клетку компонентов.

Для культивирования клеток вне организма необходимо присутствие в среде тех аминокислот, которые не могут быть синтезированы клеточными культурами. К таким основным аминокислотам относят: глутамин, лейцин, изолейцин, валин, фенилаланин, лизин, гистидин, триптофан, метионин, треонин, цистин, тирозин. Особенно важная роль принадлежит глутамину, который обеспечивает разнообразные функции в обмене веществ культуры клеток.

Одним из существенных компонентов питательной среды культуры клеток служит глюкоза. Потребность клеток в глюкозе определяется прежде всего ее энергетической ролью в обмене веществ. Но клетки используют ее и для пластической цели, а именно для синтеза некоторых заменимых аминокислот, а также жирных и нуклеиновых кислот.

Наличие в среде витаминов, особенно группы В, – одно из существенных условий размножения клеток. Клетки растут лучше, если витамины группы В добавляют в виде коэнзимов, например в виде аденозиндифосфорной кислоты (АДФ), аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и др.

Приготовление растворов для культур клеток требует соблюдения ряда условий: чистоты химических веществ, последовательности растворов и т. д. Для этих целей наиболее употребительны растворы Хенкса и Эрла.

В зависимости от входящих компонентов питательные среды делят на две группы: 1) содержащие естественные компоненты (сыворотку, амниотическую жидкость и др.); 2) синтетические и полусинтетические.

Натуральные среды состоят из смеси соответствующего солевого раствора (Хенкса, Эрла), сыворотки (животных и человека), тканевого

экстракта (эмбрионов кур, коров, человека), гидролизата лактальбумина.

Выращивание вирусов в культурах тканей в последние 35-40 лет заняло главенствующее положение в вирусологических исследованиях. Метод тканевых культур сыграл исключительную роль в изучении таких основных биологических процессов, как механизм репродукции вирусов и изменение их наследственных свойств. С помощью этого метода расшифрована этиология и разработана диагностика некоторых вирусных заболеваний, созданы высокоэффективные средства специфической профилактики при многих вирусных инфекциях. Значительная заселенность животного организма вирусами, свидетельствующая о широком распространении латентной (скрытой) формы взаимодействия в системе вирус-организм, также была установлена благодаря применению культуры ткани.

Аналогично методу выращивания бактерий в питательных средах культура ткани стала своеобразной питательной средой для репродукции вирусов. Способность вирусов репродуцироваться только в живых клетках обусловлена тем, что они используют энергетические ресурсы живой клетки.

Вирусы животных и человека культивируют на клеточных культурах, полученных из тканей человека и животных. Это в основном эмбрионы человека, кур, коровы, почки обезьян, овец и поросят, селезенка различных видов животных, амнион человека и др.

Материал для культивирования тканей *in vitro* берут на мясокомбинате от здоровых молодых животных сразу после полного обескровливания. Недостаточное обескровливание способствует загрязнению культуры ткани продуктами распада форменных элементов крови (эритроцитов), которые токсично влияют на растущие клетки. Ткани молодых животных обладают большей потенцией роста и лучше адаптируются к условиям размножения или переживания в питательной среде.

После убоя животного необходимый орган в капсуле извлекают из туши под спиртовым пламенем, чтобы избежать бактериального загрязнения.

Затем его помещают в колбу с охлажденным (2-4 °С) раствором Хенкса или фосфатного буфера с антибиотиками. На 1 мл жидкости (раствора) добавляют 200 ЕД пенициллина и 200 мг стрептомицина. Колбу помещают в термос со льдом и доставляют в лабораторию.

Культуры тканей различают в зависимости от условий выращивания клеток.

1. Культуры переживающих тканей в жидкой среде и на агаре, которые или вообще не размножаются *in vitro*, или дают очень слабый рост, т. е. в них отсутствует процесс размножения клеток. Методика получения этих культур, которая была разработана супругами Мейтланд в 1928 г., заключается в следующем: измельченные кусочки ткани помещают в питательный раствор, состоящий из набора аминокислот, солей, витаминов и сыворотки крови. Заражение культур ткани вирусом производят в момент их приготовления. Затем вирус выращивают в условиях термостата при 35-37 °С в течение 3-4 суток. Для подавления роста бактерий в питательный раствор добавляют антибиотики. В такой культуре клетки выживают не более 30 суток.

2. Культуры растущих тканей или клеток, активно размножающиеся *in vitro* при благоприятных условиях питания:

культуры фиксированных кусочков ткани (капельно-плазменные, выращенные во флаконах Карреля; культуры во вращающихся и неподвижных пробирках). Во всех случаях клетки развиваются из кусочков ткани, заключенных в свернувшуюся плазму крови;

однослойные культуры клеток;

культуры суспензированных во взвешенном состоянии клеток.

Наиболее широкое применение находят однослойные культуры клеток, к которым относятся первично-трипсинизированные культуры, культура перевиваемых и диплоидных клеток.

Метод получения однослойных культур клеток заключается в следующем: ткань измельчают и диспергируют ферментом – трипсином.

Затем трипсин удаляют с помощью центрифугирования, а к полученному осадку добавляют определенный объем жидкой питательной среды. Клетки выращивают в виде одного слоя (монослоя) на внутренней поверхности стекла (пробирки, флакона, матраса). Заражая такую культуру клеток вирусом, через определенное время можно получить большое количество вирусодержащего материала. Недостаток первичных однослойных клеток – постоянная потребность в органах от здоровых животных.

Для культивирования вирусов широко применяют культуры перевиваемых клеток, т.е. культуры клеток, способных к размножению вне организма неопределенно длительное время. Наиболее распространены культуры клеток, выделенные из нормальных и раковых тканей человека. Среди них широко известна линия клеток *Hela*, полученная в 1951 г. От 16-летней девушки, у которой была обнаружена карцинома шейки матки.

В настоящее время имеется много перевиваемых линий клеток животного и человеческого происхождения, в том числе линий, обладающих высокой чувствительностью к вирусу ящура (ВНК, СП и др.).

Преимущества перевиваемых клеток:

- 1) независимость от источников тканей, так как клетки пересеваются бесконечно;
- 2) на клетки не влияют большие концентрации антибиотиков;
- 3) соответствие стандартному состоянию.

Недостатки перевиваемых клеток:

- 1) безграничный рост – свойство опухолевых клеток;
- 2) быстрое наступление деструктивных изменений.

При длительном культивировании перевиваемые (растущие) клетки, происходящие из нормальных тканей, часто подвергаются изменчивости. При этом отмечается клеточный и ядерный полиморфизм, появляются гигантские многоядерные клетки. Таким образом, почти у всех перевиваемых клеток наблюдаются изменения хромосомного аппарата и превращение их в полиплоидные клетки. Эти изменения сближают перевиваемые клетки,

происходящие из нормальных тканей, с перевиваемыми клетками раковых опухолей. Поэтому для решения ряда теоретических и практических задач биологии необходимо, чтобы в клетках сохранялся нормальный диплоидный (парный) набор хромосом.

**Культура диплоидных клеток.** Это морфологически однородная популяция клеток. Для нее характерны: 1) стабильность в процессе культивирования *in vitro*; 2) ограниченный срок жизни; 3) наличие фаз стабилизации, активного роста и старения; 4) сохранение в процессе пассирования содержания каротина на уровне исходной ткани.

С 1958 г. для культивирования вирусов используют культуры диплоидных клеток, у которых на всем протяжении культивирования сохраняется доброкачественный характер. Важно отметить, что культуры диплоидных клеток свободны от микоплазм и латентных (скрытых) вирусов. Диплоидные клетки особенно пригодны для длительного культивирования вирусов в бессывороточных средах (или если нежелательно менять питательную среду). Кроме того, диплоидные клетки обладают широким спектром чувствительности к вирусам, что позволяет выращивать в них большинство видов вирусов, патогенных человеку и животным.

В настоящее время культуры диплоидных клеток получены из различных тканей человека и животных (из мозжечка, легких, кожно-мышечной ткани, почек, аммонова рога эмбриона человека, животных и др.) путем отбора первично-трипсинизированных клеток. Они обладают способностью перевиваться до 50-80 раз и при этом сохраняют нормальный парный хромосомный аппарат.

Культивирование вирусов в культурах тканей применяют в следующих случаях: 1) для замены лабораторных и домашних животных; 2) для получения большого количества вирусов, необходимых для производства биологических препаратов – вакцин, сывороток и диагностикумов; 3) для изучения развития вирусов в зараженных клетках.

Однако при углубленном изучении современных методов

культивирования вирусов в культурах тканей вскрылся ряд недостатков, требующих безотлагательного разрешения.

**Выделение вирусов на культуре клеток (тканей).** Перед заражением вирусом культуры клеток микроскопируют и отбирают культуры только с хорошим ростом монослоя клеток. Затем удаляют питательную среду и в каждую пробирку (флакон) вносят 0,1-0,2 мл вируса или вирусосодержащего материала (исследуемого материала), прибавляют по 1,5 мл питательной среды, содержащей по 100-200 ЕД пенициллина и стрептомицина в 1 мл. Зараженные культуры клеток инкубируют при 37 °С в течение 1-2 ч, после чего сразу же удаляют питательную среду и заменяют ее свежей (1,5-2 мл). Это вызвано тем, что исследуемые материалы могут оказать токсическое действие на клетки.

Зараженные культуры просматривают под микроскопом в течение 4-8 суток, начиная со 2 дня после заражения. Под влиянием вируса активность процессов обмена в тканевой культуре (клеток) изменяется, что приводит к морфологическим изменениям в самих клетках, т. е. наступает цитопатический эффект. Существенным недостатком тканевых культур, осложняющим их применение в вирусологической диагностике и особенно в производстве вакцин, является частое загрязнение исходного тканевого материала латентными вирусами, микоплазмами. В культурах почечных клеток обезьян и некоторых видов домашних животных обнаружены десятки латентных вирусов; некоторые из них обладают онкогенными свойствами. Поэтому разработка метода быстрого обнаружения латентных вирусов, выяснение спектра их патогенности и изыскание средств обеззараживания – неотложные задачи современной биологической науки вообще и вирусологической в частности.

Культивирование вирусов в опухолевых образованиях позволяет получить большое количество вирусосодержащего материала и, самое главное, изучать взаимодействие вируса с опухолевыми клетками. В опухолях успешно культивируются вирусы осповакцины, бешенства, чумы

птиц.

В клетках злокачественных опухолей происходит относительно быстрое изменение свойств вирусов, что позволяет использовать их для получения вакцинных штаммов.

Хранение культур клеток. Для сохранения клеток в жизнеспособном состоянии в течение нескольких дней пригодна температура 2-4 °С. Как первичные, так и перевиваемые культуры клеток часто приходится консервировать, так как при продолжительном пассировании клеточных линий *in vitro* существует опасность бактериального загрязнения и генетических изменений самих клеток. Наиболее простой метод консервирования культур клеток – хранение их при 4 °С в течение 6 недель.

Хранение при 4-6 °С трипсинизированной суспензии перевиваемых клеток обеспечивает способность их к размножению в течении 12-20 суток. Кроме сухого льда для успешного хранения применяют жидкий азот (-196 °С). Другой способ сохранения ценных клеточных линий – глубокое замораживание с глицериновой защитой.

Жизнеспособность клеток при длительном хранении (до 2-3 лет) различна и зависит от вида культур клеток. Сохранность жизнеспособности перевиваемых клеток составляет 85-97 %, диплоидных клеток – 70-90 %; наименьшая в первично-трипсинизированных суспензиях – 40-45 %.

Однослойные культуры клеток нашли широкое применение в вирусологии. Благодаря их использованию был преодолен барьер видовой невосприимчивости лабораторных животных, что повлекло за собой открытие множества новых вирусов. Культуры клеток оказались также удобными для накопления вирусов, изучения их репродукции, а в сочетании с радиоактивными изотопами – для биохимического изучения особенностей метаболических процессов в зараженной клетке и синтеза вирусных и вирусспецифических продуктов. Метод однослойных культур клеток сделал возможным развитие исследований по молекулярной биологии вирусов животных.

Прежде всего заражают культуры клеток. Для этого в пробирки, флаконы или матрасы с выросшим монослоем клеток вносят небольшое количество суспензии для осуществления контактирования на 80-90 мин (для адсорбции и проникновения вируса в клетки), затем добавляют поддерживающую питательную среду, которая не обеспечивает дальнейшего размножения клеток; флаконы, пробирки и матрасы помещают в условия, благоприятные для инкубации. Происходит репродукция вируса в клетках. Пораженные вирусом клетки погибают, разрушаются, новое поколение вирусов выходит в культуральную жидкость, и происходит заражение новых клеток, из них – в следующие и так до тех пор, пока есть живые клетки. Обнаружение вируса в культуре клеток производят под малым увеличением светового микроскопа по цитопатическому действию (ЦПД) или эффекту (ЦПЭ). ЦПД – это любые изменения (дегенерация, гибель) клеток под влиянием размножающегося в них вируса. Формы ЦПД разнообразны – от едва заметных изменений в цитоплазме до полного распада клеток на фрагменты.

Обнаружение вируса, обладающего гемагглютинирующими свойствами, в культуре клеток возможно методом гемадсорбции. Гемадсорбция – это прилипание эритроцитов к поверхности клеток, зараженных гемагглютинирующим вирусом. Для наблюдения гемадсорбции необходимо из пробирки, флакона и т. д. с зараженной вирусом культурой клеток удалить культуральную жидкостью, добавить 2-3 капли 2,5 % суспензии эритроцитов. Пробирки, флаконы оставляют в горизонтальном положении в течение 10 мин, затем слой клеток споласкивают физраствором, чтобы смыть эритроциты. Если в зараженной культуре клеток происходит репродукция вируса, то на таких клетках под микроскопом видны адсорбированные эритроциты.

Большое значение имеет другая биологическая система для выделения вирусов – живые куриные эмбрионы 5-13 суточного возраста. Вирусы в них могут репродуцироваться в клетках самого зародыша, на хорион-

аллантаической оболочке, в стенках желточного мешка, накапливаясь в этих же структурах и в жидкостях аллантаической и амниотической полостей. Признаками размножения вируса в куриных эмбрионах являются их гибель и патолого-анатомические изменения на эмбриональных оболочках и структурах. Куриные эмбрионы чувствительны к большинству вирусов птиц и некоторым вирусам млекопитающих (грипп, оспа, чума и др.).

В качестве биологической системы для выделения вирусов также используют лабораторных животных (белые мыши, белые крысы, хомячки, морские свинки, кролики, птицы и др.). Существует большое количество методов введения инфекционного материала. Выбор метода заражения зависит от тропизма вирусов и чувствительности животного. За зараженными животными устанавливают контроль, отмечая изменения в их поведении, сроки появления специфических признаков болезни. Признаками репродукции вирусов в организме животных являются их гибель, клинические признаки болезни и патолого-анатомические изменения в органах и тканях. При отсутствии моделей лабораторных животных при некоторых вирусных болезнях для выделения вирусов используют естественно-восприимчивых животных.

### **23. Структура вирусологической лаборатории. Правила техники безопасности и режим работы**

Вирусологические лаборатории или отделы при районных, межрайонных, областных, краевых и республиканских ветеринарных диагностических лабораториях призваны осуществлять диагностику вирусных болезней, контролировать заболеваемость животных, состояние и напряженность постинфекционного и поствакцинального иммунитета, участвовать в организации и проведении профилактических мероприятий и ликвидации вирусных болезней.

Организация и структура вирусологической лаборатории определяются

задачами и особенностями ее деятельности, которые обусловлены повышенной опасностью вирусных инфекций и необходимостью специальных условий для диагностических исследований. Существует общий для всех диагностических лабораторий минимум требований, без которых невозможно проведение вирусологических исследований.

Вирусологическая лаборатория или вирусологический отдел при бактериологической лаборатории должны иметь следующие подразделения: подготовительный отдел (моечная, биохимическая лаборатория, дезинфекционная), отдел культивирования клеток и тканей, диагностики и серологии вирусов. Лаборатория должна быть изолирована от других лабораторий и вспомогательных отделов, чтобы предотвратить возможность проникновения и распространения инфекции в другие помещения.

Все рабочие процессы, начиная с мойки посуды и кончая инаktivацией использованного материала, должны осуществляться только в вирусологическом отделе.

Правила техники безопасности при работе с вирусами и вирусосодержащим материалом предусматривают следующие меры: обеспечение безопасности персонала от заражения вирусами при работе с вирусосодержащим материалом; исключение возможности рассеивания вирусов в окружающей среде; предотвращение возможности загрязнения (контаминации) вирусов и вирусосодержащего материала другими микроорганизмами.

В вирусологических лабораториях установлен специальный режим.

1. Все работы с вирусами, вирусосодержащим материалом выполняют только в специальных комнатах (боксах). Причем каждый бокс должен иметь предбоксник, который от него отделен стеной с герметичной дверью, чтобы исключить циркуляцию воздуха.

Бокс и предбоксник должны быть оснащены ультрафиолетовыми бактерицидными лампами: 6 ламп на 12 м<sup>2</sup> площади. Во время работы в боксе их выключают, а при кратковременном пребывании надевают

защитные очки.

2. В боксах работают только в защитной одежде (стерильный халат, маска, шапочка) и сменной обуви; в некоторых случаях надевают очки и перчатки. После окончания работы весь бокс, инструменты, предметы немедленно подвергают дезинфекции.

3. Все окна вирусологической лаборатория должны быть затянуты сеткой для предупреждения проникновения мух и других насекомых. Полы должны быть выстланы плиткой или линолеумом, не имеющим трещин.

4. Воздух в боксах должен быть стерильным, а давление несколько выше, чем атмосферное.

5. Остатки вирусодержащего материала помещают в специальный контейнер с дезинфицирующим раствором.

6. Вирусологические лаборатории должны иметь отдельный сток со специальным сборником, из которого сточные воды поступают в дезинфекционный котел для термодезинфекции; сточные воды не должны попадать в общую канализацию.

7. Для предохранения вирусного материала от микробного загрязнения используют стерильные инструменты, посуду и антибиотики. Вирусологические лаборатории должны быть оснащены высококачественным оборудованием, инструментами и посудой: холодильники, термостаты, центрифуги, сушильные шкафы, автоклавы, микроскопы (световые, люминесцентные, электронные), магнитные мешалки, штативы для пробирок, подставки для куриных эмбрионов, стеклянная посуда и др.

## **24. Схема лабораторной диагностики вирусных болезней животных**

Диагностика (от гр. *diagnostikos* – способный распознавать) составляет основное звено в борьбе с вирусными инфекциями животных и человека. Быстрый и точный диагноз позволяет предпринять своевременные меры

профилактики и ликвидации эпизоотии. Наоборот, ошибочный диагноз или промедление в его постановке и, соответственно, неправильные и несвоевременные меры борьбы с инфекцией способствуют распространению болезни и приводят к экономическим потерям.

Лабораторная диагностика вирусной инфекции обычно включает предварительный диагноз на основе эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных, который служит ориентиром для лабораторного исследования с целью постановки окончательного диагноза (таблица 3).

Атипичные, латентные, смешанные формы вирусной инфекции, когда болезнь вызвана не одним, а несколькими вирусами и бактериями, могут быть диагностированы только лабораторными методами.

Экспресс - методы позволяют быстро установить присутствие вируса или его антигенов в патологическом материале с помощью серологических реакций (РИФ, РСК) и реакция гемагглютинации (РГА); светового микроскопа (обнаружение телец включений и крупных вирионов – элементарных телец), а также электронной и иммуноэлектронной микроскопии.

Вирусологические методы позволяют выделить активные формы вируса в чувствительных живых системах (животные, куриные эмбрионы, культуры клеток) и идентифицировать их в серологических реакциях. Естественно-восприимчивых животных редко используют для выделения вирусов (ящур, чума крупного рогатого скота, свиней, оспа овец и др.) и только в том случае, когда необходимо воспроизвести типичную клинику болезни.

Таблица 3 – Общие принципы диагностики вирусных болезней

ЖИВОТНЫХ.

Клинико-эпизоотологическая диагностика. Обследование животных и хозяйств	Лабораторная диагностика		
	Экспресс-методы*	Вирусологические методы*	Серологические методы**
Установить:	Обнаружить:	Последовательность:	РН, РСК, РДП, РТГА, РНГА: установить динамику титра антител к вирусам в парных сыворотках
1.Эпизоотологические данные	1.Вирусные антигены с помощью РИФ, РСК	I этап: выделение активного вируса на чувствительных культурах клеток, куриных эмбрионах, лабораторных или естественно-восприимчивых животных	
2.Клинические симптомы	2.Элементарные тельца вирусов	II этап: идентификация выделенного вируса в серологических реакциях (РА, РТГА, РТГАд, РСК, РДП)	
3.Патологические изменения	3.Вирусные тельца-включения	III этап: 1) доказательство этиологической роли выделенного агента; 2) установление прироста антител к выделенному агенту в парных сыворотках или 3) воспроизведение болезни на том же виде животных	
	4.РГА		
<i>Достоинства, недостатки</i>			
Диагноз только предварительный	Быстрота. Необходимость подтверждения результата другими методами	Точность. Трудоемкость. Длительность	Достоверность. Ретроспективность.

\*Исследование патологического материала от больных животных и трупов.

\*\*Исследование сывороток крови.

Лабораторных животных используют в диагностике и с целью поддержания вирусов. Однако для ряда вирусов не подобраны чувствительные лабораторные животные (оспа овец, коз, птиц и др.), а вирусами ящура и бешенства удается заразить несколько видов животных.

Исследователь, ориентируясь на спектр патогенности выделяемого вируса, в каждом конкретном случае подбирает вид лабораторного животного для диагностики.

Куриные эмбрионы и наиболее универсальная для диагностики лабораторная система культур клеток как биологические тест-системы более удобны и экономически выгодны для выделения и изучения вирусов, чем животные. Цитопатический эффект вирусов на культурах клеток указывает на репродукцию и для ряда вирусов служит диагностическим признаком.

Следующий этап — идентификация вируса с помощью специфической серологической реакции, выбор которой определяется свойствами самого вируса. Например, если вирус проявил гемагглютинирующие свойства, то для его окончательной идентификации проще и надежнее использовать реакцию торможения гемагглютинации.

Выделение вируса не всегда доказывает этиологию болезни, так как возможно и бессимптомное вирусоносительство. Для подтверждения этиологической роли выделенного агента можно воспроизвести болезнь на группе здоровых животных того же вида путем заражения их выделенным вирусом.

Ретроспективная диагностика позволяет с помощью стандартных антигенов точно установить этап (серологический вариант) антител, образование которых вызвано вирусом, выделенным от больных животных. Но факт образования антител должен быть подтвержден многократностью повышения титра антител при сравнении его в так называемых парных сыворотках, т. е. полученных до заражения или в начале болезни и через 2-3 недели после.

Наиболее достоверные результаты можно получить в реакции нейтрализации, так как вируснейтрализующие антитела ответственны за специфическую противовирусную защиту организма.

## 25. Получение вирусосодержащего материала от больных животных и трупов: консервация, транспортировка и подготовка к исследованию

Получение и обработка патологического материала. В лабораторной диагностике вирусных болезней точность диагноза, прежде всего, зависит от правильности взятия патологического материала, его транспортировки, качества приготовления и техники исследования вирусосодержащего материала.

Материал для исследования от заболевших, павших или вынужденно убитых животных следует брать сразу при появлении выраженных признаков болезни или не позже 2-3 ч после клинической смерти или убоя. В поздние сроки болезни количество вируса может снизиться в результате воздействия защитных механизмов организма.

Общий принцип взятия патматериала основан на четком представлении о патогенезе предполагаемой инфекции и преимущественной локализации вируса в тех или иных органах или тканях, а также на знании тропизма вируса, входных ворот, путей распространения в организме, путей и сроков выделения из организма (таблицы 4,5).

Таблица 4 – Выделение и идентификация вирусов млекопитающих животных из вирусосодержащего материала

Инфекции. Вирус	Патологический материал	Тесты для идентификации вирусов
Респираторная инфекция КРС, свиньи, собаки (аденовирус)	Носовые и глазные выделения, фекалии, легкие, мозг, миндалины	ВК (ЦЭ), ГА, КФ, ИФ, НВ
Инфекционный гепатит собак (аденовирус)	Селезенка, печень, лимфатические узлы, почки, кровь	ВВ (ЦЭ), ГА, ИФ, НВ
Вирусная диарея КРС (болезнь слизистой оболочки) (пестивирус)	Носовые выделения, оральные повреждения, легкие, селезенка, кровь, брыжеечные лимфатические узлы, кишечная слизистая оболочка, вагинальные выделения, ткани плода	ВВ (ЦЭ или вирусная интерференция), ИФ, НВ
Инфекционный ринотрахеит собак (герпесвирус)	Носовые и глазные выделения, легкие, трахеальный мазок, сегмент трахеи, мозг, вагинальные выделения, сыворотка, абортрованный плод, печень, селезенка, почки	ВВ (ЦЭ), ИФ, НВ
Инфекционный ринотрахеит кошачьих (герпес-вирус)	Носовые и глоточные выделения, конъюнктивы, печень, легкие, селезенка, почки, слюнные железы, мозг	ВВ (ЦЭ), ИФ

Ринопневмония лошадей (герпесвирус). Грипп (лошади, свиньи) (ортомиксовирус)	Плацента, плод, легкие, носовые выделения, лимфатические узлы, глазные выделения, трахеальный мазок	ИФ, ВВ (ЭКЯ и ЦЭ), НВ, ВВ (ЭКЯ), ГА, ИГ
Парагрипп КРС, лошадей, свиней, овец, собак (парамиксо-вирус)	Носовые и глазные выделения, легкие, трахеальный мазок	ВВ (ЭКЯ), ГА, ИГ, НВ
Респираторный синцитиальный вирус КРС (пневмовирус)	Трахея, легкие, носовые выделения, свернувшаяся кровь	ВВ (ЦЭ), ИФ
Коровий герпесвирус	Трахея, легкие, носовые выделения, плод, свернувшаяся кровь	ВВ (ЦЭ), ИФ, НВ
Реовирус (КРС, лошади, собаки, кошки)	Фекалии, слизистая оболочка кишечника, носовые и глоточные выделения	ВВ, ГА, ИГ
Африканская болезнь лошадей (орбивирус)	Цельная кровь в антикоагулянте, пораженные ткани, носовые и глоточные выделения	ВВ (ЦЭ или мышцы), НВ
Злокачественная катаральная лихорадка (герпесвирус)	Цельная кровь в антикоагулянте, лимфатические узлы, селезенка, легкие	ВВ (ЦЭ), ИФ, НВ, ЭМ
Псевдобешенство (герпесвирус)	Носовые выделения, миндалины, легкие, мозг (средний мозг, варолиев мост, костный мозг), спинной мозг (овцы и КРС), селезенка (свиньи), вагинальные выделения, сыворотка	ВВ (ЦЭ и кролики), НВ, ИФ, ФИСА
Собачий герпесвирус	Почки, печень, легкие, селезенка, носовые, ротоглоточные и вагинальные выделения	ВВ (ЦЭ), ИФ, НВ
Ринит свиней (цитомегаловирус). Лошадиный риновирус	Носовая раковина, слизистая оболочка носа. Носовые выделения, фекалии	ЭМ, ВВ (ЦЭ), ИФ, НВ, ВВ (ЦЭ), НВ
Прогрессирующая пневмония висна-мэди овец (ретро-вирус, лентивирус)	Цельная кровь, слюнные железы, легкие, лимфатические узлы средостения, хороидное сплетение, селезенка	ВВ (ЦЭ и овцы), НВ, КФ
Коровий риновирус. Лихорадка долины Рифт (КРС, овцы) (флебовирус)	Носовые выделения. Цельная кровь в антикоагулянте, плод, печень, селезенка, почки, мозг	ВВ (ЦЭ), НВ, ВВ (ЦЭ и мышцы), ИФ, НФ, КФ
Коровий энтеровирус трансмиссивный	Фекалии, ротоглоточный мазок	ВВ (ЦЭ), НВ
Гастроэнтерит (коронавирус)	Фекалии, носовые выделения, тощая кишка, подвздошная кишка	ВВ (новорожденные поросята), ИФ, ЭМ
Неонатальная диарея: ротавирус	Фекалии, тонкая кишка	ВВ (ЦЭ с трипсином), ИФ, ЭМ, ФИСА
парвовирус	Фекалии, слизистая оболочка кишечника, периферические лимфатические узлы, мозг, сердце	ВВ (ЦЭ), ИФ, ЭМ, ГА, ИГ, НВ
коронавирус	Фекалии, тонкая кишка	ВВ (ЦЭ с трипсином), ИФ, ЭМ
Пикорнавирус (энтеровирус)	Фекалии, кишечник, мозг, миндалины, печень	ВВ (ЦЭ), НВ, ЭМ
Полиоэнцефалит (Тешена, Талфан) (энтеровирус)	Мозг, кишечник, фекалии	ВВ (ЦЭ), НВ
Чума рогатого скота (морбилливирус)	Кровь в антикоагулянте, селезенка, брыжеечные лимфатические узлы	ВВ (ЦЭ и КРС), ИДАГ, КФ, НВ
Бешенство (лисса-вирус)	Мозг, слюнные железы	ВВ (мышцы), ИФ, НВ

Лошадиный энцефаломиелит (альфавирус)	Цельная кровь, мозг, цереброспинальная жидкость, носовые и глоточные выделения, поджелудочная железа	ВВ (ЭКЯ и мышцы), ГА, ИГ, НВ, КФ
Гемагглютинирующий энцефаломиелитный вирус (коронавирус)	Мозг, спинной мозг, миндалины, кровь	ВВ (ЦЭ), ГА, ГАД, НВ, ИФ
Японский энцефалит В (флавивирус)	Мозг	ВВ (ЭКЯ и мышцы), ИН, КФ, ИГ, ИФ
Болезнь Ворна (не классифицирован). Скрейпи (почесуха) (не классифицирован)	Мозг, спинной мозг. Мозг	ВВ (ЭКЯ и кролики), ИФ, КФ, ВВ (мышцы и овцы)
Свиная оспа (суйпоксвирус); коровья оспа (ортопоксвирус); овечья и коровья оспа (кариплексвирус)	Соскоб с пораженных участков, везикулярная жидкость, корочки, печень, селезенка	ВВ (ЭКЯ, ЦЭ и кролики), ГА, ИГ, НВ, ИФ, ЭМ
Ящур (афтовироз)	Материал с пораженных участков, миндалины, везикулярная жидкость, пораженные копыта, жидкость из пищевода и глотки, все ткани	ВВ (ЦЭ и новорожденные мышцы), КФ, НВ, ИФ, ИДАГ, ФИСА
Коровий маммит (герпесвирус)	Соскоб с пораженных участков, мазок из соска, жидкие экссудаты из пораженных мест	ВВ (ЦЭ), НВ
Везикулярный стоматит (везикуловироз)	Везикулярная жидкость, эпителиальный покров пораженных участков, цельная кровь, периферические лимфатические узлы, мазок с языка	ВВ (ЦЭ), НВ, КФ
Везикулярная экзантема свиней: калицивирус  энтеровирус	Везикулярная жидкость, эпителиальный покров пораженных участков ног, лимфатические узлы миндалин, сыворотка, пораженные участки рта и носа  Везикулярная жидкость, эпителиальный покров пораженных участков, пораженные участки рта и носа	ВВ (ЦЭ), КФ, НВ, ЦДАГ  ВВ (ЦЭ), НВ, ИФ, ИДАГ
Папилломавирус	Материал пораженных участков, бородавки, соскоб кожи	ЭМ, клеточная трансформация, ИФ
Контагиозная экзема (параплексвирус)	Стручья, пораженные участки губ	ВВ (ЭКЯ и ЦЭ), НВ, ИДАГ, ИФ, ЭМ
Коровий пастулезный стоматит (параплексвирус)	Биопсия поврежденных участков, соскоб с морды, рот, соски	ВВ (ЦЭ и ЭКЯ), ЭМ
Генитальные инфекции/или выкидыши (энтеровирус)	Вагинальные выделения, сыворотка свиноматки, миндалины, мазок из носа, мозг (свиньи), фекалии (КРС и свиньи)	ВВ (ЦЭ), НВ
Эпизоотическая геморрагическая болезнь оленей (орбивирус)	Сыворотка от маток, сердце плода, гепаринизированная кровь, селезенка, костный мозг, лимфатические узлы, легкие, сперма	ВВ (ЦЭ и ЭКЯ), КФ, ИДАГ, ИФ, НВ, ЭМ
Лошадиный вирусный артериит (пестивирус)	Цельная кровь, носовые и глоточные выделения, плацента, плод, селезенка, ноздри, лимфатические узлы, конъюнктивная сумка, сперма	ВВ (ЦЭ), КФ, ИДАГ, ИФ
Пограничная болезнь (пестивирус)	Мозг, селезенка, кровь, костный мозг  Плацента, мышцы плода, нервная ткань	ВВ (ЦЭ), ИФ, ВН  ВВ (ЦЭ и новорожденные мышцы), ИФ НВ, ГА, ИГ

Чума свиней (пестивирус)	Миндалины, селезенка, печень, мозг, лимфатические узлы	ВВ (свиньи), ИФ, НВ
Лошадиная инфекционная анемия (ретровирус, пентивирус)	Цельная кровь, селезенка, лимфатические узлы	ВВ (ЦЭ и лошади), ИФ, НВ, КФ, ИДАГ, ФИСА,
Африканская чума свиней (иридовирус)	Кровь в антикоагулянте, селезенка, печень, миндалины, лимфатические узлы	ВВ (ЦЭ и свиньи), ГАД, ГА, КФ, ИФ, РИА, ФИСА, иммуноэлектро-осмофорез
Найробийская болезнь овец (найровирус)	Селезенка, кровь (плазма), брыжеечные лимфатические узлы	ВВ (новорожденные мыши), ИФ
Лихорадка долины Рифт (флебовирус)	Плод, кровь в антикоагулянте, печень, селезенка, почки, мозг, сыворотка	ВВ (ЦЭ и новорожденные хомяки или мыши), НВ, КФ, ИДАГ, ИГ, ИФ
Неоплазия КРС, кошки (ретровирус)	Лимфатические узлы, метастазы, кровь в антикоагулянте, сыворотка	ВВ, обратная транскриптаза, ЭМ, ИФ, ФИСА, Вестерн-иммуноблот

Примечание: ИДАГ – иммунодиффузия на агаровом геле; КФ – комплементная фиксация; ЦЭ – цитопатогенный эффект; ЭКЯ – эмбриональные куриные яйца; ЭМ – электронная микроскопия; ИФ – иммунофлуоресценция; ГА – гемагглютинация; ГАД – гемадсорбция; ИГ – ингибция гемагглютинации; РИА – радиоиммуноанализ; ВВ – выделение вируса; НВ – нейтрализация вируса; ФИСА – ферментативный иммуносорбентный анализ.

Таблица 5 – Выделение и идентификация вирусов птиц из патологического материала.

Инфекция. Возбудитель	Патологический материал	Тесты для идентификации вирусов
Болезнь Ньюкасла (ВНБ) (парамиксовирус)	Трахеальный или клоакальный мазки, легкие, селезенка, печень, почки, костный мозг	ВВ (ЭКЯ, ЦЭ), НВ, ГА, ИГ
Птичий грипп (вирус куриной чумы) (ортомиксовирус)	Трахея, легкие, воздушный мешок, синусный экссудат, печень, селезенка, кровь, клоакальный мазок	ВВ (ЭКЯ), ГА, ИГ, АП, НВ
Инфекционный бронхит (коронавирус)	Легкие, трахея, трахеальный мазок	ВВ (ЭКЯ), НВ, ГА, ИГ, ЭМ
Респираторная инфекция попугаев (болезнь Пачеко), серых журавлей, голубей, сов, соколов (герпесвирус)	Печень, селезенка, кишечник	ВВ (ЭКЯ, птицы), НВ, ИФ, ЭМ
Ларинготрахеит (герпесвирус)	Трахея или трахеальный экссудат	ВВ (ЭКЯ, ЦЭ), АП, НВ, ИФ
Респираторная инфекция (птичий аденовирус)	Трахея, легкие, воздушный мешок, кишечник, фекалии	ВВ (ЭКЯ, ЦЭ), АП, НВ, ИФ

Коронавирусный энтерит индюков	Кишечник, сумка Фабрициуса	ВВ (ЭИЯ), ИФ,НВ
Реовирус	Кишечник, фекалии	ЭМ, ВВ
Птичий энцефаломиелит (энтеровирус)	Мозг	ВВ (цыплята, ЭКЯ), НФ, ИФ
Альфовирусная инфекция (восточный и западный экцефалитные вирусы)	Сыворотка, мозг, сердце, селезенка, печень	ВВ (ЭКЯ, мышцы, ЦЭ), НВ,КФ, ИГ
Индюшачий менинго-энцефалит (флавивирус)	Мозг, селезенка, сыворотка	ВВ (ЭКЯ, мышцы, ЦЭ), НВ, ИГ
Авипоксвирус: 1. Голубиная оспа. 2. Канареечная оспа. 3. Куриная оспа. 4. Индюшачья оспа	Узелковые повреждения кожи, струппя	ВВ (ЭКЯ, ЦЭ), АП, ГА, НВ, ИФ, иммунопероксидаза
Вирусный артрит (реовирус)	Синовиальная жидкость из голеностопного или бедренного суставов, селезенка	ВВ (ЦЭ, ЭКЯ), АП,НВ,ИФ
Утиная чума (утиный вирусный энтерит)	Печень, селезенка, кровь	ВВ (ЦЭ, ЭУЯ),НВ
Геморрагический энтерит индюков, мраморная селезенка фазанов (аденовирус тип 2)	Кишечник, селезенка	ВВ (ЦЭ, индюшата), АП, ЭМ
Индюшачий вирусный гепатит (не классифицирован)	Печень	ВВ (ЭКЯ)
Птенцовая болезнь (паповавирус). Анемия цыплят (парвовирус)	Костный мозг, почки, сердце, селезенка. Селезенка, слизистые сумки, тимус, кровь	ВВ (ЦЭ), НВ, ЭМ, ИФ ВВ (цыплята), ЭМ, НВ, ФИСА
Лейкоз и саркома (ретровирус, онковирусы)	Цельная кровь, плазма, клоакальный мазок, меконий, эмбрионы, опухоли	ОТ, ВВ (ЦЭ, клеточная трансформация, ЭКЯ), ИФ, КФЛП
Ретикулоэндотелиоз (ретровирус, онковирусы). Болезнь Марека (герпесвирус)	Селезенка, опухолевые ткани, гепаринизированная кровь. Кровь, опухоль, почки, селезенка, перья	ВВ (ЦЭ, ЭИЯ), ИФ, ОТ, АП, НВ, ВВ (ЦЭ, ЭКЯ), АП, НВ, ИФ

Примечание: АП – агаровый преципитин; КФ – комплементная фиксация; КФЛП – комплементная фиксация для лейкоза птиц; ЦЭ – цитопатогенный эффект; ЭКЯ – эмбриональные куриные яйца; ЭУЯ – эмбриональные утиные яйца; ЭИЯ – эмбриональные индюшачьи яйца; ЭМ – электронная микроскопия; ИФ – иммунофлуоресценция; ГА – гемагглютинация; ИГ – ингибция гемагглютинации; ОТ – обратная транскриптаза; ВВ – выделение вируса; НВ – нейтрализация вируса; ФИСА – ферментативный иммуносорбентный анализ.

При респираторных инфекциях (грипп, болезнь Ауески, парагрипп, ларинготрахеит, инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота) для выделения вирусов из организма больного животного берут носоглоточные смывы, мазки из носа и глотки; для выделения энтеровирусов – кал;

дермотропных агентов — свежие поражения кожи; при ящуре и оспе — стенки афт, содержимое везикул, пустул; при чуме — кровь и др.

Мазки с конъюнктивы, слизистой оболочки носа, задней стенки глотки, прямой кишки и клоаки у птиц берут стерильными ватными тампонами, которые погружают в пенициллиновые флаконы или пробирки, содержащие 3-5 мл соответствующей жидкости (раствор Хенкса или среда для культур клеток с антибиотиками — пенициллином или стрептомицином из расчета по 500 ЕД на 1 мл среды).

Вытекающую изо рта слюну можно собирать в пробирку. Если ее выделяется мало, то пропитывают слюной стерильный тампон на палочке, который затем помещают в пробирку с небольшим количеством физиологического раствора.

Мочу собирают с помощью катетера в стерильную посуду. Фекалии берут из прямой кишки с помощью шпателя или палочки и затем помещают в стерильную пробирку или пенициллиновый флакон.

Стенки афт, корочки с поверхности кожи снимают пинцетом. Спинномозговую жидкость берут асептично с помощью пункции.

Для ретроспективной диагностики от каждого животного берут кровь дважды: первый раз в начале или в разгар болезни, второй раз через 2-3 недели после первого в зависимости от инфекции. Сыворотки крови используют для постановки различных серологических реакций.

После смерти животного особенно важно как можно быстрее взять, соблюдая стерильность, кусочки органов, чтобы избежать посмертных изменений тканей (аутостерилизация), а также бактериального обсеменения.

В качестве патологического материала чаще всего берут кусочки тех органов (размером в несколько кубических сантиметров), которые имеют видимые отклонения от нормы (форма, размер, цвет, консистенция, наличие необычных образований). Могут быть поражены или содержать вирус на основании клинической картины болезни перед смертью или наиболее часто содержат вирус — печень, селезенка, легкие, головной мозг, лимфатические

узлы и почки.

Пробы органов нервной системы исследуют при подозрении на бешенство, энцефалиты, болезнь Ауески, энцефаломиелиты птиц и другие инфекции.

Материал, направляемый для исследования, должен быть помещен в условия (консервация, упаковка проб), обеспечивающие его сохранность и безопасность окружающих. Надежный способ консервации вирусодержащего материала – замораживание, но при этом следует избегать колебаний температуры, особенно резких перепадов, а также повторных замораживаний и оттаиваний.

Если замораживание образцов по ряду обстоятельств невозможно, то используют для консервации химические растворы, 50 % раствор глицерина (глицерин и физиологический раствор в равных объемах); смеси: 1) сухой лед и этиловый спирт в равных объемах; 2) физиологический раствор (33 части) и обычный лед (100 частей). Каждый вирусодержащий материал должен быть снабжен этикеткой с указанием материала и вида животного, названия хозяйства, предварительного диагноза, даты взятия материала и фамилии ветеринарного специалиста.

Подготовка материала для вирусологических исследований. Поступивший для исследования патологический материал регистрируют и подвергают исследованию по трем направлениям:

1) вирусологическое исследование – непосредственное выделение активных форм вируса, его идентификация, доказательство его вины в инфекции;

2) экспресс-методы – обнаружение в патматериале вирусного антигена, внутриклеточных включений, гемагглютинаина вируса;

3) ретроспективное (серологическое) исследование – обнаружение в сыворотке крови специфических антител и определение их титра в различных реакциях.

Для вирусологических исследований патматериал размораживают.

Суспензию из него получают путем растирания в ступке и разведения стерильным физиологическим раствором (1:10). Затем проводят осветление полученной суспензии методом центрифугирования в течение 20-30 мин при 2000-3000 об/мин после чего надосадочную – вирусосодержащую – жидкость отсасывают.

В суспензии (жидкости) для подавления посторонней микрофлоры (бактерий, грибов) добавляют антибиотики из расчета от 100 до 2000 ЕД на 1 мл суспензии (доза 100 ЕД/мл – профилактическая, 2000 ЕД/мл – стерилизующая). Обычно используют комбинацию пенициллина и стрептомицина в равных количествах или других антибиотиков. Суспензию с антибиотиками оставляют при комнатной температуре на 30 мин. Затем проводят бактериологический контроль путем посева этой суспензии на сахарные МПА и МПБ. Полученную суспензию хранят в замороженном состоянии.

## **26. Микроскопические методы обнаружения элементарных телец и вирусных телец-включений**

Световой микроскоп при вирусологических исследованиях используют в следующих целях: для обнаружения в исследуемом материале крупных вирионов (элементарных телец) после предварительной обработки специальными методами; для обнаружения в культурах клеток разрушительных процессов, происходящих под влиянием вирусов.

Только крупные вирусы (оспа, эктима) могут быть обнаружены при соответствующих методах окраски в обычном световом микроскопе (вирусоскопия) при увеличении в 1350 раз (объектив 90, окуляр 15).

Мазки или отпечатки готовят из срезов свежего патматериала (везикулы, пустулы, мозг и др.); участок срезают лезвием безопасной бритвы и внутренней поверхностью среза однократно проводят (прикасаются) по предметному стеклу. Мазок высушивают на воздухе и на 3 мин помещают в

дистиллированную воду.

Для обнаружения крупных вирионов (элементарных телец) препарат обрабатывают специальными методами «сверхокраски», которые направлены на искусственное увеличение размеров вирионов до разрешающей способности светового микроскопа за счет адсорбции металла на поверхности вирусных частиц.

*Метод окрашивания по Морозову.* Мазок покрывают на 1-2 минуты жидкостью Руге, промывают дистиллированной водой и протравливают 1-2 минуты смесью танина и карболовой кислоты при подогревании до появления паров. Тщательно промывают дистиллированной водой и покрывают раствором аммиачного серебра на 1-2 минуты при легком подогревании, пока препарат не приобретет темно-коричневую окраску. Вновь промывают и сушат фильтровальной бумагой.

При недостаточной промывке мазка после танина раствор серебра может пожелтеть (дать осадок), тогда препарат следует вновь промыть и посеребрить.

Под микроскопом на препарате элементарные тельца видны как мелкие округлые образования темно-коричневого цвета, расположенные поодиночке, парами, короткими цепочками и в виде скоплений.

**Микроскопия вирусных телец включений.** Тельца-включения встречаются при многих вирусных инфекциях. Они представляют собой скопления вирусных частиц или клеточного материала, изменившегося при репродукции вирионов. Для постановки диагноза принимают во внимание локализацию телец-включений (внутриядерные или цитоплазматические), вид нуклеиновой кислоты (ДНК-, РНК-содержащие), тинкториальные свойства (базофильные, оксифильные), гомогенность (аморфные, зернистые)

При некоторых инфекциях обнаружение телец-включений является одним из основных экспресс-методов диагностики (бешенство, оспа, ринопневмония лошадей и др.). При других инфекциях – это лишь вспомогательный метод (грипп, болезнь Ауески, ларинготрахеит птиц и др.).

Тельца Бабеша-Негри при бешенстве – это скопление в цитоплазме вирусных частиц в сочетании с продуктами клеточной реакции (в клетках центральной и периферической нервной системы, чаще в клетках аммоновых рогов).

Для их выявления препарат окрашивают по одному из методов (по Муромцеву, Манну, Туркевичу и др.) кислыми красками (эозином) в красный цвет; по периферии расположена светлая зона – мантия.

## **27.1. Лабораторные животные и их использование в вирусологии.**

### **Постановка биологической пробы на лабораторных животных**

Для культивирования вирусов в лабораторных условиях широко используют живые биологические тест-системы: естественно-восприимчивых и лабораторных животных, развивающиеся куриные эмбрионы, культуру клеток и тканей.

Большинство вирусов различных таксономических групп отличают друг от друга по патогенности их для лабораторных животных разных видов или возрастов.

В вирусологии для постановки биопробы используют следующие виды лабораторных животных: белые мыши, белые крысы, морские свинки, хомячки, кролики, кошки, собаки, птицы, обезьяны и др.

Лабораторные животные должны отвечать определенным требованиям: 1) быть абсолютно здоровы, т. е. свободными от инфекции и инвазии; 2) обладать стандартной чувствительностью (восприимчивостью) к определенным вирусам; лучше использовать животных одной линии; 3) быть одинакового возраста (желательно молодые) и пола, породности, упитанности и массы тела.

Плохая упитанность животных, взъерошенный волосяной покров, катаральные явления (насморк, затрудненное дыхание), отказ от корма, понос и другие признаки дают основание предполагать о заболевании

животного.

В виварии лабораторных животных содержат в изолированных помещениях: 1) для чистых, т. е. здоровых; 2) для зараженных, т.е. больных. Кормление лабораторных животных должно быть строго по соответствующему рациону, содержание соответствовать зоогигиеническим нормам.

Лабораторных животных используют: 1) для первичного выделения вируса из исследуемого материала (патологического); 2) определения вида выделяемого вируса при диагностике вирусных инфекций, т. е. для идентификации; 3) накопления вируса, т.е. для получения большого количества вируссодержащего материала, необходимого для изучения биологических свойств возбудителя (патогенных, вирулентных, иммуногенных) и изготовления биопрепаратов (антигена, вакцины); 4) освежения вирусов и подтверждения их жизнеспособности; 5) титрования, т. е. для определения его количества и активности.

Перед заражением всех животных маркируют различными методами: 1) кроликам выстригают шерсть на спине и боку, на ушах делают насечки и дырочки, закрепляют бирки; 2) морских свинок различают по пятнам и окраске, выстригают шерсть на спине; 3) птицам навешивают бирки на крылья, надевают кольца с номером на ноги; 4) мышам и крысам на кожный покров наносят краску на места, соответствующие порядковому номеру, ампутируют пальцы (мышатам).

Вирусы обладают тропизмом – способностью репродуцироваться в определенных тканях. Этим, по существу, при выделении вирусов на лабораторных животных и определяется выбор пути введения (метод заражения) инфекционного материала. С целью выделения нейротропных вирусов животных заражают в мозг, для выделения респираторных – интраназально и т.д. Для введения вируссодержащего материала применяют пероральное, ректальное, интраназальное, перкутанное (накожное), кутанное (кожное), интракутанное (внутрикожное), субкутанное (подкожное),

интрамускулярное, интравенозное, внутрисердечное, внутрибрюшинное, интраплевральное, интрацеребральное, субдуральное (под твердую оболочку мозга) и другие методы заражения (таблицы 6, 7).

Таблица 6 – Использование лабораторных животных в качестве биологической пробы при вирусных болезнях сельскохозяйственных животных и птиц

Вид животного	Восприимчивость к вирусу	Метод введения	Признаки размножения вируса
Кролики	Бешенства	Интрацеребрально, внутримышечно	Параличи, гибель
	Ящура (новорожденные)	Подкожно	То же
	Болезни Ауески	Внутримышечно, подкожно	Энцефалитическая, зудневая и менингеальная формы, гибель
	Контагиозной эктимы овец	Скарификация кожи, слизистых оболочек	Оспенные поражения на месте введения
	Миксомы кроликов	Внутрикожно, Подкожно	Отек в области головы, гениталий
Морские свинки	Бешенства	Интрацеребрально	Паралич, гибель
	Ящура (новорожденные)	Внутрикожно	Афты на месте введения
	Везикулярного стоматита	То же	Везикулы, поражение почек, Печени
	Ринопневмонии лошадей	Внутрибрюшинно	Аборты
	Чумы плотоядных	Подкожно, перорально	Подъем температуры
Белые крысы	Гриппа свиней	Интраназально	Симптомы поражения органов дыхания, гибель
	Болезни Ауески	Подкожно, интраназально	Параличи, гибель
Белые мыши	Бешенства	Интрацеребрально, подкожно	Параличи, гибель
	Ящура (новорожденные)	Интрацеребрально	Спастическая параплегия, параличи, гибель
	Болезни Ауески	Подкожно, интрацеребрально	Параличи, гибель
	Везикулярного стоматита	Внутрибрюшинно, интрацеребрально	Симптомы энцефалита, гибель
	Гриппа лошадей	Интраназально	Конъюнктивит, симптомы пневмонии, гибель
	Гриппа свиней	То же	То же
	Африканской чумы однокопытных	Интрацеребрально	Симптомы энцефалита, гибель

Таблица 7 – Максимальные объемы вводимого вирусного материала для лабораторных животных, мл

Метод введения	Кролики	Морские свинки	Белые крысы	Белые мыши
Внутрикожно	0,1	0,1	0,05	0,02
Подкожно	5,0	3,0	3,0	0,5
Внутримышечно	5,0	2,0	1,0	0,3
Внутрибрюшинно	10,0	5,0	2,0	1,0
Внутривенно	5,0	2,0	2,0	1,0
Интрацеребрально	1,0	0,3	0,1	0,03
Интраназально	0,3	0,05	0,03	0,02

Очень часто при первичном заражении не выявляется вирус, тогда через эти же биологические системы осуществляют второй и третий пассажи вирусов – «слепые пассажи». При отрицательном результате трех пассажей исследования по выделению активных форм вирусов прекращают.

За зараженными животными ведут наблюдения, отмечая изменения в их поведении, появление специфических симптомов болезни в соответствии с инкубационным периодом данной инфекции.

Действие вируса проявляется на лабораторных и естественно восприимчивых животных следующим образом: 1) гибелью через определенный период времени; 2) развитием клинических признаков болезни; 3) патоморфологическими изменениями в органах и тканях павших животных.

## **27.2. Вскрытие трупов лабораторных животных и получение вирусосодержащего материала**

Для установления патологоанатомических изменений и получения вирусосодержащего материала экспериментально зараженных животных вскрывают независимо от того, погибли они или нет. Не погибших животных умерщвляют на пике клинических проявлений болезни или в сроки максимального накопления предполагаемого вируса. Во избежание влияния

посторонней микрофлоры на содержание вируса в тканях и органах вскрывать животных следует сразу же после их гибели или умерщвления. До вскрытия труп должен храниться на холоде.

Вскрытие следует производить на отдельном столе с соблюдением всех условий, предохраняющих труп от обсеменения посторонней микрофлорой и различные предметы от загрязнения заразным трупным материалом. Вскрывают труп стерильными инструментами с соблюдением правил асептики. Извлеченный материал (органы и ткани) не должны соприкасаться с дезинфицирующими веществами. На столе раскладывают все инструменты и материалы, нужные при вскрытии: банку, наполненную до половины спиртом, с находящимися в ней инструментами (ножницы, скальпель, пинцеты); ватные тампоны, смоченные спиртом, спиртовку, стерильные чашки Петри, фарфоровые ступки, пастеровские пипетки, предметные стекла; физиологический раствор; обычные питательные среды для контроля посева на бактериальную загрязненность; бактериологическую петлю, кварцевый песок, спички и др.

Подготовку трупов мелких лабораторных животных (белые мыши, крысы, морские свинки, цыплята) к вскрытию производят следующим образом: животное захватывают пинцетом или руками в резиновых перчатках, кладут брюшком кверху на специально подготовленный столик, покрытый оберточной бумагой, который помещен в эмалированную или оцинкованную кювету (можно использовать кювету с парафином). Все четыре лапки животного прикрепляют к столику острыми гвоздями, иглами, булавками. Трупы более крупных лабораторных животных (кроликов, собак, обезьян, кур) фиксируют в кюветах, на пластинах или досках, не допуская утечки жидкости. Трупы лабораторных животных перед вскрытием обрабатывают спиртом или дезинфицирующим раствором (3 % NaOH); кур на 20-30 с погружают в 2 % раствор карболовой кислоты. Основное правило при вскрытии – прикасаться к трупу только инструментами или руками в резиновых перчатках. Вскрытие и исследование трупа производят

последовательно в четыре этапа:

1. Отпрепарирование кожи от подкожной клетчатки и мышц. Кожу разрезают от симфизиса (от паха) до шеи по средней линии; разрез продолжают до подмышечных и подколенных ямок. Кожу оттягивают в сторону и обнажают подкожные, подколенные и подмышечные лимфатические узлы. Отмечают изменения в подкожной клетчатке; кровоизлияния, отек, расширение кровеносных сосудов, наличие новообразований.

2. Вскрытие грудной полости. Поверхность грудной клетки протирают спиртовым тампоном, затем, захватив мечевидный отросток, делают над ним небольшой поперечный надрез и, вставив в этот разрез ножницы, перерезают ребра в местах соединения с хрящами. Вырезанную грудину откидывают кверху, производят осмотр грудной полости, отмечая видимые изменения – наличие экссудата, крови, цвет и внешний вид легких и сердца. Одновременно с осмотром берут стерильно кусочки легочной и сердечной ткани, которые помещают в сухие стерильные пробирки или чашки Петри.

3. Вскрытие брюшной полости. В последнюю очередь вскрывают брюшную полость. Для этого производят продольный разрез брюшной стенки от мечевидного отростка вдоль белой линии и поперечный – вдоль реберных дуг; лоскуты брюшной стенки отворачивают влево и вправо. Кишечник оттягивают пинцетом влево до тех пор, пока не обнажатся почки, печень и селезенка.

При осмотре брюшной полости обращают внимание на отклонения от нормы размеров, формы, цвета и консистенции органов, а также наличие новообразований. Для вирусологического исследования берут кусочки органов брюшной полости и лимфатические узлы.

4. Вскрытие черепной коробки. В некоторых случаях вскрывают черепную коробку. Для этого животное фиксируют в брюшном положении (спиной кверху), делают круговой разрез кожи по шее и, подрезая ушные раковины, стягивают ее вперед чулком. Обнажившуюся крышку черепа

удаляют путем ее выламывания, стараясь не повредить головной мозг. Осмотр отделов головного мозга обычно не выявляет патологоанатомических изменений.

Поэтому берут кусочки мозга из разных отделов и делают препараты отпечатки на предметном стекле (к обезжиренному стеклу прикладывают срезы мозговой ткани).

Из всех взятых проб органов и тканей готовят 10 % суспензии по известной методике, проводят контрольные посевы на обычные МПА и МПБ или сахарные на бактериальную загрязненность, до получения результатов суспензии хранят при температуре от -20 до -70 °С.

### **28.1. Культивирование вирусов в развивающихся куриных эмбрионах**

Метод культивирования вирусов в развивающихся куриных эмбрионах получил широкое развитие после работ Вудруффа и Гудпасчура, которые в 1931 г. произвели заражение хорион-аллантаической оболочки куриного эмбриона вирусом оспы кур.

Культивирование вирусов в куриных эмбрионах проводят для следующих целей:

- 1) первичного выделения вирусов (индикация) из исследуемого материала при диагностике вирусных болезней;
- 2) получения большого количества вирусосодержащего материала, необходимого для изготовления биологических препаратов (вакцин);
- 3) поддержания жизнедеятельности вирусов в лабораторных условиях;
- 4) титрования вирусов;
- 5) идентификации вирусов в реакции нейтрализации.

Культивирование вирусов в куриных эмбрионах имеет следующие преимущества перед другими биологическими системами:

чувствительность к большинству зоопатогенных вирусов, низкая зараженность латентными инфекциями, которые часто встречаются у

лабораторных животных;

простая техника культивирования;

экономичность.

Однако этот метод имеет и отрицательные стороны: не все вирусы размножаются в куриных эмбрионах; эмбрионы часто бывают заражены посторонними бактериями и вирусами — сальмонеллами, вирусами лейкозов, бронхита птиц, болезни Марека.

Для культивирования вирусов обычно используют живые эмбрионы 7-13 суточного возраста. Яйца должны быть свежеснесенными (не более 10 суток), высокого качества, с белой скорлупой и чистыми. Мыть их нельзя, так как при этом закрываются поры, в результате чего нарушается дыхание эмбриона.

Для определения жизнеспособности эмбриона яйца просвечивают на овоскопе. Живой эмбрион подвижен, хорошо видны кровеносные сосуды, наполненные кровью, и пульсация главной аллантоисной вены. Погибшие эмбрионы неподвижны, их кровеносные сосуды запустевают или в них отмечается прерывистость, иногда видны пузырьки газа, поднимающиеся вверх.

При овоскопировании на скорлупе простым карандашом отмечают границу воздушной камеры, место расположения эмбриона и крупные кровеносные сосуды, которые служат ориентирами и позволяют выбрать метод заражения.

Заражают куриные эмбрионы вирусами (вируссодержащим материалом) в боксе с соблюдением стерильности и осторожности. Скорлупу яйца в области воздушного пространства и на стороне расположения эмбриона тщательно обрабатывают спиртом, обжигают, а затем смазывают раствором йода.

Выбор метода заражения зависит от тропности вируса – способности размножаться в определенной ткани, в результате чего происходит преимущественное поражение отдельных органов эмбриона. Например,

вирусы группы оспы хорошо размножаются на хорион-аллантоисной оболочке, вирус паротита – в амнионе, а вирусы гриппа, болезни Ньюкасла, чумы плотоядных – в амнионе и аллантоисной полости. Куриные эмбрионы широко используют для культивирования многих вирусов: оспы, осповакцины, простого герпеса, энцефалитов, парамиксовирусов, гриппа, бешенства, паротита, лихорадки долины Рифт, омской геморрагической лихорадки и др.

Для заражения куриных эмбрионов вирусами наиболее часто применяют следующие методы:

- 1) на хорион-аллантоисную оболочку;
- 2) в аллантоисную полость;
- 3) в амниотическую полость.

Заражение на хорион-аллантоисную оболочку обычно широко используют для культивирования дерматотропных, некоторых пантропных и нейротропных вирусов (оспы, ларинготрахеита, чумы крупного рогатого скота и плотоядных, болезни Ауески, саркомы Рауса и др.). С этой целью сбоку яйца на стороне расположения эмбриона концом пинцета, иглой или специальным пробойником прокалывают скорлупу и просверливают небольшое отверстие. То же самое делают и над центром воздушного пространства и осторожно надрывают подскорлупную оболочку. Вирусодержащий материал в дозе 0,1-0,2 мл наносят на хорион аллантоисную оболочку и с помощью резинового баллончика, приставленного к отверстию воздушного пространства, засасывают. Отверстия закрывают расплавленным парафином; куриные эмбрионы помещают в термостат в горизонтальном положении.

Гибель эмбрионов наступает через 24-96 ч и более после заражения в зависимости от биологических особенностей вводимого вируса.

Заражение в аллантоисную полость используют для культивирования вирусов гриппа, клещевого энцефалита, болезни Ньюкасла, энцефаломиелиита лошадей, болезни Ауески, чумы плотоядных и др. Существует 4 способа

введения вирусосодержащего материала в аллантоисную полость эмбриона. Во всех случаях на стороне расположения эмбриона делают отверстие на скорлупе и подскорлупной оболочке, через которое вводят иглу шприца. Глубина введения при первом способе составляет 3 мм, при втором – 5 под углом 45 °С, при третьем – 10-12 и при четвертом – 20-25 мм. Доза вводимого вирусосодержащего материала составляет 0,1 мл. Отверстия закрывают парафином; зараженные куриные эмбрионы в вертикальном положении помещают в термостат. Сроки гибели эмбриона характерны для данного возбудителя.

Заражение в амниотическую полость используют для культивирования вирусов гриппа и паротита, которые проникают и размножаются в различных клетках эмбриона, контактирующих с амниотической жидкостью. Для работы используют овоскоп. В центре воздушного пространства прокалывают скорлупу и подскорлупную оболочку, затем под контролем глаза иглу с тупым концом направляют в сторону эмбриона до тех пор, пока он не сделает резкий толчок назад. Отверстие закрывают парафином; зараженные эмбрионы в вертикальном положении помещают в термостат. Сроки гибели эмбрионов характерны для данного возбудителя.

## **28.2. Экспериментальное заражение куриных эмбрионов вакцинными штаммами вирусов болезни Ньюкасла и оспы птиц**

Болезнь Ньюкасла (азиатская чума, псевдочума) – высококонтагиозное заболевание кур и индеек; в меньшей степени подвержены другие виды домашних и диких птиц. Различают четыре формы клинического проявления: сверхострая, острая, подострая и легкая. Возбудитель – РНК-содержащий вирус из семейства *Paramyxoviridae*.

По степени патогенности для птиц различают везикулярные (высоковирулентные), мезогенные (умеренной вирулентности) и лентогенные (слабовирулентные) штаммы вируса болезни Ньюкасла.

Зараженная велогенными штаммами птица, не имеющая пассивных материнских антител, погибает. Мезогенные штаммы (подобные вакцинным штаммам) вызывают летальный исход у цыплят до 45-60 суточного возраста; среди более взрослой птицы смертность достигает 25-30 %. Лентагенные штаммы вызывают у цыплят слабую, или атипичную, форму болезни; даже при внутримозговом заражении цыпленка не гибнут.

Все штаммы вируса болезни Ньюкасла хорошо репродуцируются при 36-37 °С в куриных эмбрионах; сроки гибели обусловлены патогенностью вируса и методом заражения. Лентагенные штаммы не вызывают гибели эмбрионов, если в желтке присутствуют специфические антитела. Велогенные и мезогенные штаммы вызывают быструю гибель эмбрионов (через 30-48 ч), желточные антитела не оказывают вируснейтрализующего действия.

Для выделения возбудителя болезни Ньюкасла используют развивающиеся куриные эмбрионы 9-10 суточного возраста, которых заражают вирусосодержащим материалом в аллантоисную полость в дозе 0,1 мл. Вирусосодержащим материалом служит 10 % суспензия из тканей головного мозга, селезенки и легких павших птиц. Куриные эмбрионы погибают через 48-60 ч после заражения. Наличие вируса в аллантоисной жидкости определяют в реакции гемагглютинации.

Для экспериментального заражения куриных эмбрионов вакцинный вирус болезни Ньюкасла в дозе 0,1 мл на один куриный эмбрион вводят в аллантоисную полость с помощью одного из четырех способов. Зараженных куриных эмбрионов инкубируют в вертикальном положении при 37 °С до их гибели.

Оспа птиц – контагиозная болезнь кур и голубей, проявляющаяся в двух формах – оспенной и дифтеритической. Возбудитель – ДНК-содержащий вирус из рода *Avipoxvirus* семейства *Poxviridae*. Вирусы оспы кур и голубей хорошо размножаются на хорион-аллантоисной оболочке куриного эмбриона при 37 °С. Они различаются между собой по характеру

поражения оболочки и степени генерализации в теле зародыша.

Штаммы куриного вируса оспы поражают хорион-аллантоисную оболочку и обнаруживаются в тканях и органах зародыша в виде оспин серовато-белого цвета. Голубиный вирус оспы не вызывает генерализованного процесса в эмбрионе и размножается преимущественно в отслоенном участке хорион-аллантоисной оболочки.

Для выделения возбудителя оспы птиц используют развивающиеся куриные эмбрионы 10-13 суточного возраста, которые заражают вирусосодержащим материалом на хорион-аллантоисную оболочку в дозе 0,1 мл. Вирусосодержащим материалом служит 10 % суспензия, приготовленная из тканей сережек, бородавок, паренхиматозных органов и головного мозга павших птиц. Зараженные куриные эмбрионы погибают через 3-6 суток после инфицирования. Наличие вируса определяют с помощью микроскопии препаратов-мазков из оспин на хорион-аллантоисной оболочке эмбриона, обработанных по Морозову, и в реакции диффузной преципитации. Антигеном для реакции служит суспензия из пораженной хорион-аллантоисной оболочки.

Для экспериментального заражения вакцинный вирус оспы голубей (штамм Нью-Джерси) в дозе 0,1 мл на куриный эмбрион наносят на хорион-аллантоисную оболочку. Зараженные куриные эмбрионы инкубируют в горизонтальном положении при 37 °С до их гибели.

### **28.3. Вскрытие погибших куриных эмбрионов. Признаки размножения вируса и патологические изменения. Получение вирусосодержащего материала. Индикация вируса в капельной реакции гемагглютинации (РГА)**

После гибели зараженных куриных эмбрионов в сроки, определенные для каждого вируса, их вскрывают, собирают вирусосодержащий материал, который может быть использован для дальнейших вирусологических

исследований.

Для определения жизнедеятельности эмбрионы прежде всего осторожно просматривают над овоскопом. Погибшие эмбрионы не обладают подвижностью, их кровеносные сосуды загустевают, или в них выражена прерывистость. Убедившись, что эмбрионы погибли, их охлаждают в холодильнике при температуре от  $-4$  до  $-6$  °C в течение 2-3 ч для того, чтобы произошло сужение кровеносных сосудов и тем самым уменьшилась опасность кровотечения. Это гарантирует получение чистой, свободной от крови вирусосодержащей жидкости.

Вскрытие эмбриона и взятие вирусосодержащего материала выполняют в боксе с соблюдением стерильности и осторожности.

Перед вскрытием скорлупу над воздушным пространством дезинфицируют спиртом, обжигают и тщательно обрабатывают настойкой йода. Стерильными ножницами срезают скорлупу на 2-3 мм выше границы воздушного пространства. Яйцо слегка наклоняют в сторону и через прокол в хорион-аллантоисной оболочке пастеровской пипеткой отсасывают аллантоисную жидкость, избегая повреждения сосудов, чтобы предотвратить адсорбцию вируса на эритроцитах. Вирусосодержащую жидкость без консерванта сохраняют при температуре ниже  $-20$  °C. От одного эмбриона можно собрать 6-10 мл аллантоисной жидкости. Бактериальную загрязненность взятой жидкости проверяют посевом 0,1-0,2 мл на обычные МПА и МПБ.

Наличие гемагглютинирующего вируса в аллантоисной жидкости определяют с помощью ориентировочной реакции гемагглютинации. Для этого на хорошо промытые предметные стекла или кафельную плитку белого цвета наносят одну каплю 5 % взвеси эритроцитов кур и одну каплю вирусосодержащей жидкости. Стеклой палочкой или отломанным концом пастеровской пипетки жидкость перемешивают. При наличии гемагглютинирующего вируса через 2-5 мин в центре смеси появляются хлопья агглютинирующих эритроцитов, а края просветляются; при

отсутствии вируса смесь остается мутной.

Для взятия пораженной хорион-аллантаической оболочки ножницами подрезают ее на границе с воздушным пространством, удаляют этот ее участок. Затем извлекают все содержимое эмбриона в чашку Петри, а хорион-аллантаическую оболочку помещают в отдельную стерильную чашку, тщательно расправляют и макроскопически исследуют на темном фоне. Наиболее характерные изменения на хорион-аллантаической оболочке соответствуют данному вирусу: очень часто просматриваются округлые воспалительные непрозрачные очаги, белесоватые перламутровые бляшки с некротическим центром, серовато-белый цвет оспин, расширение сосудов и др. Материал обязательно проверяют на бактериальное загрязнение посевом кусочка оболочки на МПА и МПБ. Для гистологических исследований берут поперечные срезы хорион-аллантаической оболочки.

Для дальнейших вирусологических исследований готовят однородную массу, для чего хорион-аллантаическую оболочку растирают в стерильной ступке с песком, добавляя стерильный физиологический раствор до объема, чтобы получить 10-20 % суспензию. Суспензию центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15-20 мин; надосадочную жидкость используют как вирусосодержащий материал. Наличие гемагглютинирующего вируса определяют в ориентировочной реакции гемагглютинации.

## **29.1. Использование культур клеток и тканей в вирусологии.**

### **Питательные среды, солевые растворы и другие компоненты.**

#### **Посуда и ее подготовка**

Русский исследователь А. Е. Голубев впервые в 1874 г. дал теоретическое обоснование возможности культивирования тканей вне организма. Начиная с 1940 годов метод культивирования тканей получает весьма широкое применение во многих областях экспериментальной биологии, в том числе при решении ряда теоретических и практических

вопросов вирусологии. Клетки, культивируемые *in vitro*, очень быстро стали обычным объектом при изучении вирусов животных.

Культуры ткани и клеток представляют собой кусочки органов или тканей или их отдельные клетки, сохраняющие жизнеспособность и размножающиеся в питательной среде вне организма.

Культивирование вирусов в культурах ткани и клеток в вирусологии применяют в следующих целях:

- 1) для замены лабораторных и домашних животных при выделении и индикации вирусов;
- 2) для получения большого количества вируса, необходимого для производства биологических препаратов – вакцин и диагностикумов;
- 3) для изучения развития вируса в зараженных клетках.

Различают два типа культур: культуры растущих тканей и культуры переживающих тканей.

Наиболее распространенные способы выращивания культур клеток: первичные культуры клеток, культуры перевиваемых клеток и культуры диплоидных клеток. Первичные культуры клеток получают путем посева клеточной взвеси, приготовленной в результате ферментативного расщепления тканей. Перевиваемые клетки – это культура клеток, способная к размножению вне организма неопределенно длительное время. Наиболее часто применяют культуры клеток, выделяемые из нормальных и раковых тканей человека. Среди них широкую известность получила линия клеток *Hela*, полученная из опухоли шейки матки человека. Штаммом диплоидных клеток называется морфологически однородная популяция клеток, стабилизированная в процессе культивирования *in vitro*, имеющая ограниченный срок жизни.

Метод культивирования переживающих эксплантатов является одним из наиболее простых; его используют для выращивания вирусов. В отличие от культуры растущих тканей, где происходит рост клеток, тканевые эксплантаты способны лишь переживать, сохраняя присущую им жизнеспособность.

Культуры растущих (фиксированных) эксплантатов тканей – культивирование кусочков ткани, фиксированных в сгустке плазмы. В настоящее время в основном используют однослойные культуры клеток, растущие на стенке флаконов, пробирок, чашек Петри и матрасах.

Для роста и размножения клеток вне организма необходим комплекс физико-химических факторов: температура культивирования, концентрация водородных ионов (рН), определяемое содержание неорганических соединений, углеводов, аминокислот, белков, витаминов, кислорода и диоксида углерода.

По характеру входящих компонентов питательные среды подразделяют на две группы: 1) натуральные среды, содержащие естественные компоненты (сыворотку, амниотическую жидкость и др.); 2) синтетические и полусинтетические среды.

Натуральные среды состоят из смеси соответствующих солевых растворов (Хенкса и Эрла), сыворотки (животных и человека), тканевого экстракта (эмбрионов кур, коров, человека), гидролизата лактальбумина. Количество каждого ингредиента в различных прописях сред значительно варьирует.

Синтетические питательные среды можно подразделить на две основные группы: обеспечивающие рост и размножение клеток (ростовые), поддерживающие клетки в жизнеспособном состоянии в течение короткого срока (поддерживающие).

Поддерживающие синтетические и полусинтетические среды готовят, используя изотонические растворы (Хенкса и Эрла) с добавлением аминокислот, витаминов, ко-энзимов и нуклеотидов (среда Игла, среда 199 и др.). В таких средах клетки могут существовать непродолжительное время (2-7 суток). Для более длительного поддержания некоторых видов клеток в жизнеспособном состоянии и обеспечения условий для их роста и размножения к синтетическим средам следует добавлять сыворотку животных (коров, телят и др.). Наиболее широкое применение в вирусологических исследованиях нашли синтетические среды 199 и Игла с добавлением сыворотки животных.

Основу питательных сред для выращивания культур клеток составляют

солевые изотонические растворы. Все растворы готовят из химически чистых солей на деминерализованной или свежеприготовленной бидистиллированной воде (раствор версена, фенопрот, раствор нейтрального красного, кристаллвиолета). Наиболее часто употребляют растворы Хенкса и Эрла: одно из преимуществ раствора Хенкса – большая стабильность. Растворы стерилизуют фильтрацией через пластины СФ или ЕК-2 (или миллипоровые фильтры), а также автоклавированием при 70 кПа в течение 30 минут.

Для выращивания культур клеток используют сосуды различной формы и размера: бутылки, колбы, матрасы, пипетки, резиновые трубки и пробирки. Посуда для этих целей должна быть из нейтрального стекла, пробки – из очищенной резины. В качестве моющих средств применяют гексаметафосфин, тринатрий фосфат, двууглекислую соду, стиральные порошки «Новость» и «Лотос», соляную и серную кислоту, раствор двуххромовокислого калия в серной кислоте (хромпик).

Основное требование, которое предъявляют к стеклянной посуде для выращивания клеточных культур, – это хорошая ее обработка, так как методика культивирования клеток непосредственно на стекле требует абсолютно чистой поверхности. Чистоту вымытой посуды можно проверить по ее смачиваемости: вода должна ровно смачивать поверхность стекла, а не собираться в капли.

Чрезвычайно важная часть техники культивирования тканевых культур – исключение возможности загрязнения (контаминации) микроорганизмами. Предупреждение загрязнения микроорганизмами может быть достигнуто разными методами стерилизации.

## **29.2. Методика получения первично-трипсинизированных культур клеток из тканей куриного эмбриона и их культивирование**

Материалом для получения культур клеток служат эмбрионы, органы молодых здоровых взрослых животных, а также различные опухоли и клетки крови. Выбор ткани главным образом зависит от свойств предполагаемого вирусного агента в исследуемом материале.

Эмбриональные ткани, взятые в асептических условиях, можно использовать без предварительной обработки. Ткани же взрослых животных, как правило, подвергают специальной обработке, чтобы обеспечить стерильность материала.

Эмбриональные ткани лабораторных животных получают следующим образом. Беременную самку убивают, шерсть в области операционного поля обрабатывают раствором йода. По реберной дуге делают круговой разрез, кожу оттягивают вниз и обнажают стенку брюшной полости. Матку, содержащую эмбрион, отпрепарируют, помещают в чашку Петри, вскрывают, извлекают эмбрион.

Эмбрионы крупных млекопитающих берут обычно на мясокомбинате или бойне при вынужденном или случайном убое беременных животных. Отдельные органы эмбриона, предназначенные для получения культур клеток, извлекают после обработки поверхности 5 % раствором йода, например почки – через разрез поясничных позвонков, и помещают в стерильный раствор Хенкса или Эрла.

Наиболее широко в диагностических исследованиях используют культуры, полученные из почек телят и поросят; эти органы удобно брать на конвейере мясокомбината. Тестикулы животных можно брать как на мясокомбинате, так и непосредственно в хозяйствах в период массовых кастраций животных. Часто используют культуры, полученные из хирургического материала: лимфатические ткани, костный мозг, эпителий носовой полости.

Материал, предназначенный для получения культур, следует обрабатывать и культивировать немедленно после получения, так как выход жизнеспособных клеток после хранения резко снижается.

Для выращивания употребляют суспензию клеток, полученную путем обработки тканей протеолитическими ферментами (трипсином и др.). Путем переваривания трипсином межклеточного склеивающего белкового вещества (трипсинизация) достигается извлечение отдельных клеток или небольших их

агрегатов. В настоящее время наиболее широко применяют два метода трипсинизации: теплая многократная экстракция клеток и холодная трипсинизация.

Метод теплой трипсинизации чаще используют при извлечении клеток из эмбриональных тканей. Ткань, измельченную ножницами на кусочки величиной 2-3 мм, многократно промывают фосфатным буферным раствором и переносят в колбу для трипсинизации. Кусочки тканей два раза промывают подогретым до 32 °С 0,25 % раствором трипсина. Клетки, которые отщепляются в течение первых 10 мин трипсинизации, как правило, не используют. Затем добавляют свежую порцию трипсина в таком объеме, чтобы кусочки были покрыты слоем жидкости 10-15 мм, и оставляют на 10-15 мин при 30 °С. Далее трипсин сливают, заменяют свежей его порцией и перемешивают магнитной мешалкой, что обеспечивает равномерное воздействие на кусочки ткани. Через 10-15 мин перемешивание прекращают, надосадочную жидкость отсасывают сифоном в колбу с марлевым фильтром, помещенную в лед. В колбу с кусочками тканей добавляют свежую порцию трипсина, подогретого до 32 °С. Трипсинизацию повторяют 5-6 раз до полного диспергирования кусочков ткани на отдельные клетки и мелкие их агрегаты. Полученную суспензию клеток переносят в центрифужные стаканы, стоящие в измельченном льду, и центрифугируют 30 минут при 200 об/мин или 10 минут при 1000 об/мин. Затем надосадочную жидкость сливают, а осадок ре-суспендируют в питательной среде, подогревают до 37 °С и сливают в бутылку через 2-3 слоя марли.

Метод холодной трипсинизации проводят с 0,125 % раствором в течение ночи при перемешивании на магнитной мешалке при 4 °С. Преимущество длительной трипсинизации состоит в экономии рабочего времени и в лучшем соблюдении стерильности, однако при этом выход клеток уменьшается.

Клетки, выделенные из тканей, разбавляют до нужной концентрации. Для приготовления посевной концентрации клеток необходимо вначале определить их концентрацию в исходной суспензии. Подсчет клеток

производят в счетных камерах различных систем (Горяева и др.). Для подсчета отбирают пробу после тщательного перемешивания суспензии клеток. Техника зарядки камеры Горяева и подсчета клеток такая же, как и при гематологических исследованиях. Клетки подсчитывают в 125 больших квадратах. Общее число их умножают на 1000, затем на кратность разведения клеточной взвеси. В результате получается цифра, указывающая на число клеток в 1 мм<sup>3</sup>. Оптимальная концентрация клеток при посеве составляет в пределах 200-500 тыс. клеток/мл.

Жизнеспособность клеток в суспензии определяют с помощью 5 % раствора трипановой сини: живые клетки не окрашиваются, а мертвые – окрашиваются в синий цвет. Жизнедеятельность клеток первично-трипсинизированной суспензии колеблется в пределах 65-90 %. Жизнеспособность (% клеток в суспензии) определяют по формуле

$$\frac{(\text{Общее число клеток} - \text{Число мертвых клеток}) \times 100}{\text{Общее число клеток}}$$

Для культивирования в каждую пробирку вносят 0,5-1 мл клеточной суспензии, во флаконы вместимостью 100 мл – 20 мл, в литровые – 100 мл клеточной суспензии. Флаконы и пробирки плотно закрывают резиновыми пробками и кладут под углом 5° к горизонтальной плоскости. Клетки фиксируются на внутренней поверхности пробирки, через 3-7 суток образуется клеточный монослой, который может быть использован для размножения вирусов.

Метод получения культур клеток из тканей куриного эмбриона. Куриные эмбрионы 9-11 суточного возраста просматривают на овоскопе, отбирая подвижных с хорошо выраженными сосудами. На скорлупе простым карандашом отмечают воздушное пространство (пугу). Яйца помещают в металлический лоток, поверхность их протирают йодированным спиртом и обжигают спиртовым факелом. Ножницами срезают скорлупу над пугой,

пинцетом раскрывают скорлупную и хорион-аллантаисную оболочку, извлекают эмбрионы и переносят в чашку Петри, удаляют голову и внутренние органы. Ткань измельчают ножницами на мелкие кусочки до 1-2 мм. Полученную массу 3-5 раз промывают раствором Хенкса с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин по 300 ЕД/мл) для удаления слизи и кровяных элементов. Оставшуюся ткань дезагрегируют теплым 0,15 % раствором трипсина (35 °С) с помощью пипетирования или при постоянном перемешивании на магнитной мешалке. Один цикл трипсинизации продолжают до полного истощения ткани, т.е. полного распада на отдельные клетки.

Клеточную суспензию в трипсине центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость сливают, осадок клеток ресуспендируют в питательной среде, содержащей 0,5 % гидролизата лактальбумина в растворе Хенкса и 10 % сыворотки крови крупного рогатого скота. Затем суспензию клеток фильтруют через два слоя стерильной марли. Подсчитывают число клеток в 1 мл суспензии. После подсчета взвесь разводят питательной средой, чтобы конечная концентрация была равна примерно 500000-600 000 клеток на 1 мл среды. Средний выход клеток из тканей 10-суточного эмбриона составляет 35-40 млн. Сплошной монослой в культурах образуется через 2-3 суток культивирования при 37 °С.

### **29.3. Заражение первично-трипсинизированной культуры клеток вирусом. Определение цитопатогенного действия вируса**

Для выделения вирусов, их идентификации, накопления в качестве антигенов при изготовлении диагностикумов и противовирусных вакцин в современных вирусологических лабораториях и на биофабриках широко используют культуры клеток.

Для культивирования исключительно важны, во-первых, адаптация патогенных вирусов на новом, чужом хозяине, когда условия развития только

частично соответствуют естественным условиям, во-вторых, размножение вируса в этой новой системе. Чем незначительнее различия между обеими системами, тем легче проходит адаптация. Следует отметить, что некоторые виды вирусов специфичны только к определенным линиям клеток, а культивирование других не удастся ни в одной клеточной системе.

Таким образом, используемая культура клеток должна быть чувствительной к предполагаемому вирусу: чувствительность клеток выше, если они получены от молодых животных (лучше эмбрионов).

При диагностике вирусных заболеваний, а также при других вирусологических исследованиях часто возникает необходимость выделить вирус из материала, взятого от больного или павшего животного. Наиболее благоприятные сроки для взятия вирусосодержащего материала определяют по течению болезни и тропизму предполагаемого агента. Следует иметь в виду, что некоторые органы и ткани клинически здоровых животных могут содержать латентные формы вирусов без функциональных нарушений. Исследуемый материал можно хранить при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  в течение нескольких часов. Переносить его нужно в термосах с небольшим количеством льда. Если вирусосодержащий материал невозможно исследовать в короткие сроки, его можно хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ ; пробы часто оттаивать нельзя.

Кроме тканевых жидкостей (спинномозговая жидкость, лимфа, кровь), которые можно получать стерильно и сразу же проводить заражение культуры клеток, все методы подготовки материала направлены на то, чтобы извлечь вирус из клетки и перевести его в фосфатно-буферный раствор.

Кусочки органного вирусосодержащего материала ( $1-2\text{ см}^3$ ) разрушают замораживанием и оттаиванием, растирают со стерильным песком, разводя фосфатным буфером в соотношении 1:10 (10 % суспензия), и центрифугируют 10 минут при 2000 об/мин. В подготовленную органную суспензию вносят 500 ЕД пенициллина и 500 мг/мл стрептомицина. После выдерживания при  $4^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч подготовленная суспензия готова для

заражения культуры клеток.

В пробирки (не менее 4 штук) и пенициллиновые флаконы с первично-трипсинизированной культурой клеток (монослойная культура) после удаления питательной среды вносят по 0,1 мл приготовленной вирусной суспензии и равномерно распределяют по монослою. Затем оставляют на клетках в течение 1-2 ч при комнатной температуре, вносят 0,9 мл питательной среды (рН 6,9-7,2) и инкубируют при 37 °С. Одновременно необходимо поставить следующие контроли: на жизнеспособность клеток (монослойная культура клеток плюс питательная среда), стерильность (исследуемый материал, используемые среды, культуры клеток) и токсичность (часть исследуемого материала прогревают 30 минут при 60 °С и вносят в культуру клеток). При длительном культивировании зараженных культур замену среды производят так же, как и в случае незараженной культуры (через 4-7 суток). Простейший признак, который указывает на размножение вируса – это цитопатическое действие (ЦПД). Поскольку вирус в клетках размножается за счет обмена веществ хозяина, то это приводит к характерным изменениям клеток. Они могут округляться, а затем некротизироваться, в клеточном монослое образуются зоны просветления или края клеток разрыхляются так, что образуется синцитий (гигантские клетки).

Перед диагностикой вирусной инфекции исследователь должен быть точно проинформирован о внешнем проявлении общего ЦПД, о типичном ЦПД исследуемого вируса и о других его особенностях.

Зараженную культуру клеток ежедневно просматривают под малым увеличением микроскопа. Если за этот срок проявляется ЦПД, культуру клеток замораживают. После оттаивания объединяют содержимое всех пробирок и культуральную жидкость используют для идентификации дальнейшего пассажа вируса. Идентификацию вируса проводят любым серологическим методом, в том числе и с помощью реакции нейтрализации

на культуре клеток. Необходимо иметь в виду, что в некоторых случаях дегенерация клеток наступает вследствие токсического действия исследуемой суспензии. Если в течение срока наблюдения явления дегенерации клеток отсутствуют, то пробирки с культурой клеток замораживают и после оттаивания культуральной жидкости снова заражают свежую культуру клеток. При отсутствии ЦПД культуральную жидкость из этих пробирок используют для последующего пассажа.

Обычно делают не менее 3-4 таких «слепых» пассажей, так как не все вирусы, особенно полевые штаммы, сразу поражают культуры клеток, а адаптируются к ней только через несколько пассажей. Некоторые виды и штаммы вирусов вообще не адаптируются к культуре клеток. Вирус чумы свиней и латентные вирусы размножаются в культуре клеток без проявления ЦПД. Поэтому при неудачах выделения на культуре клеток для исключения вируса материал необходимо исследовать и другими вирусологическими методами.

### **30. Выделение бактериофагов. Методы определения их титра**

Бактериофаг – облигатный паразит бактерий, который существует в трех состояниях (профаг, вегетативный фаг, зрелый фаг) и проходит через фильтры, задерживающие бактерии. Вне бактерий он биологически инертен. Бактериофаг лизирует бактерии только в период их роста. Лизирующая активность его чрезвычайно высока: до разведения  $10^{-14}$ . Лизис можно наблюдать в бульонной культуре в виде просветления и на плотных питательных средах – пустоты вместо плотных колоний.

Фаги строго специфичны к определенным видам бактерий. По специфичности их подразделяют на три группы: полифаги – активны в отношении нескольких видов бактерий, монофаги – в отношении одного вида, типифаги – в отношении определенных типов бактерий внутри одного вида. Они могут быть адаптированы к другому виду бактерий.

Практическое применение в ветеринарии, как и в медицине, нашло фаготипирование, т.е. определение типов бактерий с помощью фагов, которое основано на специфичности фагов к определенным типам бактерий внутри вида.

Известны бактериофаги различных групп кишечных бактерий, стафилококков, стрептококков, коринебактерий, микобактерий и актиномицетов.

**Выделение и обнаружение бактериофагов.** Испытуемый материал (вода, фекалии, почва) в количестве 2-5 г вносят в 50 мл бульона, который затем встряхивают, термостатируют 12-20 ч при 37 °С и фильтруют через фильтр Зейтца. Бактериофаг переходит в фильтрат, в котором определяют его литическую активность и титр.

Для определения наличия литической активности бактериофага фильтратом засевают четыре пробирки с бульоном 12 часовой культуры микробов: в 1 пробирку добавляют 1 каплю, во 2 – 10 капель, в 3 – 2 мл фильтрата, 4 пробирка служит контролем. Если через 12-18 ч термостатирования бульон в первых трех пробирках прозрачный, а в контрольной – мутный, то бактериофаг очень активный. Если в первых трех пробирках помутнение незначительно или бульон прозрачный только в 3, то бактериофаг средней активности. Если бульон во всех трех пробирках (первые) и в контрольной мутный, то активность отсутствует. В этом случае платиновой петлей берут культуру микробов из пробирок и тщательно растирают шпателем на поверхности агара. Через 18-20 ч термостатирования бактериофаг обнаруживают по наличию «пустых мест, окон» в росте колоний, а сами колонии имеют неровные, «изъеденные» края.

Обнаружение бактериофага еще не указывает на его литическую силу, или активность, которую можно характеризовать минимальным числом бактериофага, вызывающим лизис бактериальных культур, т.е. его титром.

За титр бактериофага принимают его максимальное разведение, при котором бульон в течение 4, 12, 24 ч после внесения в него культуры соответствующих микробов остается прозрачным.

#### **Определение титра бактериофага методом серийных разведений.**

Готовят десятикратные разведения бактериофага на бульоне, начиная с 1:10 или  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ , ...,  $10^{-9}$ . Для этого в 9 стерильных пробирок разливают по 1,8 мл стерильного бульона. В пробирку № 1 вносят 0,2 мл фильтрата бактериальной культуры, содержащего бактериофаг, перемешивают пипеткой и переносят 0,2 мл в пробирку № 2, из нее в № 3 и т. д. Из пробирки № 9 0,2 мл содержимого переносят в дезраствор. В контрольную пробирку № 10 с 2 мл стерильного бульона бактериофаг не вносят. Затем во все пробирки, включая контрольную, вносят молодую культуру (12-20 часового роста) соответствующих бактерий из расчета создания концентрации до 25-40 млн. микробных тел в 1 мл (1 каплю). Через 6-18 ч после пребывания пробирок в термостате при  $37^{\circ}\text{C}$  в первых пробирках с низким разведением бактериофага можно наблюдать лизис бактерий. Разведение последней пробирки, в которой отсутствует рост микробов, т.е. бульон остается прозрачным, принимают за титр бактериофага. Таким образом, если в пробирке № 8 происходит полный лизис (пробирка прозрачная), а в № 9 – помутнение, титр фага будет  $10^{-8}$  (1:100 000 000).

**Определение титра бактериофага методом подсчета стерильных пятен.** Метод основан на учете стерильных пятен, «окон» на поверхности агара. Каждое пятно расценивается как воздействие одной частицы фага.

К 10 мл бульона, содержащего 250-300 млн. микробных тел в 1 мл, добавляют 0,0002 мл фильтрата (бактериофага). Взвесь в объеме 0,1 мл растирают на поверхности агара и после термостатирования в течение 18 ч при  $37^{\circ}\text{C}$  подсчитывают число пятен. Например, оказалось 51 пятно. Дальнейший расчет: в 10 мл бульона внесли 0,0002 мл бактериофага; в 0,1 мл будет 0,00000002. Значит, 51 частица фага приходится на 0,00000002 мл фильтрата, т.е. в 1 мл содержится 2550 млн. частиц фага.

### **31. Титр вируса. Единицы количества вирусов. Метод титрования вирусов по инфекционному действию. Метод расчета титра вируса по Риду и Менчу**

Титр вируса – это количество вируса в единице объема вирусосодержащего материала. Выражают титр через количество так называемых «эффективных доз вируса». Одна эффективная доза (ЭД) – это минимальная доза вируса, дающего регистрируемый эффект в чувствительной системе. Наиболее статистически достоверной является эффективная доза (ЭД<sub>50</sub>), оказывающая действие на 50 % экспериментальных объектов [лабораторные животные, куриные эмбрионы (КЭ), пробирки с культурами клеток].

Обозначение эффективных доз вируса обусловлено видом вируса, биологической системой, на которой его титруют, формой проявления его инфекционного действия (ЛД<sub>50</sub>, ИД<sub>50</sub>, ЭЛД<sub>50</sub>, ЭИД<sub>50</sub>, ТЦД<sub>50</sub>):

1 ЛД<sub>50</sub> – доза вируса, вызывающая гибель 50 % животных;

1 ЭЛД<sub>50</sub> – доза вируса, вызывающая гибель 50 % зараженных КЭ;

1 ИД<sub>50</sub> – доза вируса, вызывающая клиническую картину поражения у 50 % зараженных лабораторных животных;

1 ЭИД<sub>50</sub> – доза вируса, обуславливающая регистрируемый патологический процесс у 50 % зараженных куриных эмбрионов (КЭ);

1 ТЦД<sub>50</sub> – доза вируса, дающая цитопатический эффект у 50 % зараженных культур клеток (КК).

Условия титрования вируса по инфекционному действию включают приготовление его 10 кратных разведений и заражение каждым разведением не менее четырех живых тест-объектов (животные, куриные эмбрионы, культуры клеток).

Экспериментально установлено, что инфекционное действие вируса при его 10 кратном разведении (обычно в растворе Хенкса) уменьшается

пропорционально десятичному логарифму разведения: если вирусодержащий материал развести в 100 раз, то инфекционное действие вируса уменьшается в два раза, если развести в 1000 раз – в три раза и т. д.; интервал составляет 1.

Вирусодержащую взвесь разводят раствором Хенкса, или физиологическим раствором, или различными жидкими средами в зависимости от вида вируса (рН растворов около 7,0).

Для получения последовательных 10 кратных разведений в пронумерованные пробирки с пробками наливают по 9 мл стерильного раствора, затем в первую пробирку вносят пипеткой ровно 1 мл исследуемой вирусной суспензии, не касаясь поверхности раствора, и убирают пипетку в дезинфицирующий раствор. Новой стерильной пипеткой перемешивают смесь в первой пробирке, набирают 1,0 мл смеси и вносят во вторую пробирку и т. д. Из последней пробирки 1,0 мл смеси удаляют в дезинфицирующий раствор.

Вирусом каждого разведения заражают группы с одинаковым числом чувствительных к данному вирусу живых тест-объектов (животных, куриных эмбрионов, культур клеток) с учетом тропизма вируса.

Статистические методы обработки результатов титрования позволяют учесть все колебания чувствительности вируса к используемым живым системам и доказать достоверность дозы вируса, способной вызвать строго определенный инфекционный эффект.

**Метод Рида и Менча.** Наиболее часто применяют статистический метод Рида и Менча, который основан на построении кумулятивных рядов на основе полученных данных.

Для примера рассмотрим результаты титрования вируса на белых мышах, расчет кумулятивных данных и процента гибели мышей (доза заражения 0,2 мл) (таблица 8). При расчете кумулятивных данных (столбцы 5, 6) число мышей, павших от более высокого разведения (столбец 3), следует прибавить к числу павших от более низкого разведения.

При расчете кумулятивных данных (столбец 4) число мышей, оставшихся в живых от более низкого разведения, прибавляют к числу животных, не погибших от более высокого разведения. Летальность в процентах вычисляют для каждого разведения вируса по кумулятивным данным:

$$\text{Летальность} = \frac{100 \cdot \times \cdot \text{число} \cdot \text{павших}}{(\text{павшие} + \text{выжившие})}$$

Таблица 8 – Результаты заражения белых мышей.

Разведение вируса	Исходные данные			Кумулятивные данные		Соотношение павших к зараженным	Летальность, %
	Число зараженных мышей	выжило	пало	выжило	пало		
1	2	3	4	5	6	7	8
10 <sup>-1</sup>	6	0	6	0	28	28:28	100
10 <sup>-2</sup>	6	0	6	0	22	22:22	100
10 <sup>-3</sup>	6	0	6	0	16	16:16	100
10 <sup>-4</sup>	6	2	4	2	10	10:12	83,3
10 <sup>-5</sup>	6	2	4	4	6	6:10	60
10 <sup>-6</sup>	6	4	2	8	2	2:10	20

Примечание: стрелки указывают направление подсчета.

Средняя эффективная доза вирусосодержащего материала, вызывающая гибель 50 % животных, находится между разведениями 10<sup>-5</sup> и 10<sup>-6</sup> (графа 1), обуславливающими соответственно 60 и 20 % летальности (графа 8). Определяют логарифм искомого разведения (ЛД<sub>50</sub>), т. е. вызывающего 50 % гибели животных:

$$LgЛД_{50} = LgB + \frac{v - 50}{v - a} Lgd$$

где В – разведение, дающее эффект более чем в 50 % случаев; в – процент, соответствующий разведению В; а – процент, соответствующий разведению, дающему эффект менее чем в 50 %; d – коэффициент разведения (так как разведение в данном примере 1:10, то коэффициент равен 10).

Подставляем найденные значения

$$LgЛД_{50} = Lg10^{-5} + \frac{60-50}{60-20} \cdot (-1) = -5,25$$

Титр вируса равен  $10^{-5,25}$  ЛД<sub>50</sub> для объема 0,2 мл исходной вирусосодержащей взвеси, а для 1 мл этой взвеси искомый титр  $T = 5 \cdot 10^5$  ЛД<sub>50</sub>/мл.

## **32. Титрование вирусов по гемагглютинирующему действию.**

### **Постановка развернутой реакции гемагглютинации (РГА)**

В основе реакции гемагглютинации (РГА) лежит способность некоторых вирусов за счет белка гемагглютинина агглютинировать (склеивать) эритроциты различных видов животных и человека.

Роль мостиков заключается в адсорбции вирусной частицы на двух эритроцитах с помощью соответствующих рецепторов муколипопротеиновой природы на поверхности эритроцита.

Гемагглютинация обратима, т.е. вирусная нейраминидаза может разрушить рецепторы эритроцитов, после чего вирус отделяется от них. На гемагглютинацию могут влиять ингибиторы жидкостей организмов (феномен прозоны, когда при высоких концентрациях вируса РГА отрицательна, а при низких – положительна).

Условия постановки РГА: 1) освобождение вирусосодержащего материала от ингибиторов (прогревание; обработка хлороформом, ацетоном; центрифугирование и др.); 2) определенный диапазон температур (для большинства вирусов от 4 до 22-37 °С); 3) нейтральный рН; 4) 0,85 % раствор поваренной соли.

Компоненты РГА: 1) взвесь эритроцитов (0,5-1 %); 2) вирусосодержащий материал; 3) изотонический раствор NaCl.

Для РГА используют эритроциты кур, гусей, морских свинок, белых крыс, барана и человека (0-группы) в 0,5-1 % концентрации.

Приготовление эритроцитов. Кровь берут из яремной вены барана, из

сердца морских свинок, из подкрыльцевой вены петуха. Дефибринируют встряхиванием в колбочке со стеклянными бусами или добавляют антикоагулянты (цитрат натрия; гепарин; раствор Альсевера, в котором эритроциты могут храниться до 2 недель при 4 °С). Эритроциты за 2-4 ч до использования отмывают до 5 раз изотоническим раствором хлорида натрия, после каждого отмывания осаждают центрифугированием в течение 15 минут при частоте вращения 1500 об/мин.

Из осадка эритроцитов готовят 0,5-1 % суспензию (1 часть осадка смешивают с 99 частями изотонического раствора, а для приготовления 0,5 % суспензии – с 199 частями).

Титрование вируса по гемагглютинирующей активности осуществляют двумя способами: 1) капельным на стекле; 2) в лунках плексигласовых пластин или в пробирках.

Капельный метод предназначен только для обнаружения вируса: на предметное стекло наносят каплю взвеси эритроцитов и каплю вирусосодержащего материала, перемешивают пипеткой. Если вирус гемагглютинирующий и выдержаны все ранее приведенные условия опыта, то через 3-5 мин эритроциты агглютинируют в виде хлопьев.

В лунках плексигласовых пластин или в пробирках также титруют вирус; для этого находят то наибольшее разведение вируса, т.е. наименьшую его дозу, которая способна вызвать гемагглютинацию на два плюса (++)). Количество вируса в объеме данного разведения (обычно 0,5 или 1 мл) принимают за 1 гемагглютинирующую единицу (1 ГАЕ). Титр исследуемой неразведенной суспензии вируса равен числу ГАЕ, соответствующему кратности разведения суспензии. Таким образом, если гемагглютинация на два плюса (++) произошла в лунке с разведением 1:64 в объеме 0,5 мл, то титр вируса равен 64 ГАЕ/0,5 мл.

Для титрования вируса готовят ряд последовательных двукратных разведений исследуемого вируса: в ряд лунок вносят по 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Затем в первую лунку вносят 0,5

мл суспензии вируса, перемешивают и переносят последовательно по 0,5 мл из первой лунки во вторую, из второй в третью и т. д. Из последней лунки 0,5 мл смеси удаляют в дезраствор. Таким образом, получают двукратно возрастающий ряд разведений вируса (1:2, 1:4, 1:8 и т. д.). Далее во все лунки вносят по 0,5 мл 1 % суспензии эритроцитов, перемешивают, выдерживают 30-60 минут при комнатной температуре. Для контроля в отдельную лунку наливают 0,5 мл взвеси эритроцитов и 0,5 мл изотонического раствора.

Если спонтанная агглютинация эритроцитов в контрольной лунке не происходит, то они оседают на дно лунки в виде кнопки.

В опытном ряду последовательных разведений вируса агглютинированные эритроциты оседают на дно в виде зонтика с неровными краями. Полноту и степень агглютинации обозначают плюсами: +++ – сплошной зонтик; ++ – небольшой зонтик и в центре немного неагглютинированных эритроцитов; + – осадок в виде кнопки и немного агглютината вокруг осадка; – все эритроциты осели в виде кнопки с ровными краями. Агглютинатов нет.

Например, на схеме титрования в РГА вируса болезни видно, что гемагглютинация эритроцитов на два креста (++) произошла в лунке с разведением вируса 1:64 в объеме 0,5 мл (таблица 9). Эта доза вируса соответствует одной гемагглютинирующей единице (1 ГАЕ), т. е. в таком же объеме (0,5 мл) неразведенной вирусосодержащей взвеси будет находиться 64 ГАЕ. Следовательно, титр вируса болезни Ньюкасла равен 64 ГАЕ/0,5 мл.

Значение РГА в вирусологии. Адсорбцию – элюция гемагглютинирующих вирусов на эритроцитах – используют для их концентрации и очистки. При адсорбции вирусов на эритроцитах происходит их выделение из вирусосодержащей тканевой взвеси, а затем при элюции – отделение их от эритроцитов, т.е. таким образом, получается более концентрированная суспензия вируса.

Таблица 9 – Схема титрования в РГА вируса болезни Ньюкасла

Компонент	Номер лунки									Контроль эритроцитов
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
	Разведение вируса									
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	
Изотонический раствор, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Суспензия вируса, мл	0,5 Последовательный перенос по 0,5 мл									0,5мл удаляют в дезраствор
1 % суспензия эритроцитов, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Контакт 30-40 минут при комнатной температуре									
Результаты	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-

Способность каждого из гемагглютинирующих вирусов агглютинировать эритроциты определенных видов животных, при определенной температуре и рН среды используют в дифференциальной диагностике болезней. Так, вирус болезни Ньюкасла агглютинирует куриные эритроциты, но не эритроциты кошки и лошади. По РГА можно быстро обнаружить гемагглютинирующие вирусы и их титр в исследуемом материале, учитывая при этом, что инфекционный и гемагглютинирующий титры вирусов могут не совпадать.

### 33. Электронная микроскопия в диагностике вирусных болезней

**Устройство электронного микроскопа.** Создание электронного микроскопа связано с открытием электронов, их волновой природы и способности отклоняться от своего первоначального пути при прохождении через магнитные и электростатические поля. Таким образом, электрические и магнитные поля могут фокусировать пучок движущихся электронов и действовать на них, как действуют обычные стеклянные линзы в световом микроскопе.

В 1931 г. немецкие ученые Кноль и Руска создали первый в мире

просвечивающий электронный микроскоп. Источником электронов в электронном микроскопе служит нить накаливания — катод. Электроны, испускаемые катодом, ускоряются в электрическом поле с разностью потенциалов между катодом и анодом от нескольких десятков до сотен тысяч вольт в глубоком вакууме (до  $10^{-6}$  мм рт. ст.). Магнитное поле конденсорной линзы сужает поток электронов в пучок, который проходит через исследуемый объект. При этом траектория движения электронов отклоняется под различными углами. Измененный пучок электронов попадает в поле линзы объектива, в котором формируется первичное промежуточное увеличенное изображение объекта. Это промежуточное изображение объекта увеличивается еще раз с помощью проекционной линзы и создает конечное изображение объекта. Конечное изображение возникает на флуоресцирующем экране и может быть экспонировано на фотопластинку или фотопленку. В современных электронных микроскопах первого класса максимальное увеличение достигает 2 000 000, а гарантируемое разрешаемое расстояние  $\pm 0,14$  нм.

По характеру исследования объектов различают микроскопы просвечивающего типа, сканирующие, эмиссионные, теневые. Наиболее распространены электромагнитные микроскопы просвечивающего типа.

**Приготовление препаратов для электронной микроскопии.** При работе с электронным микроскопом важное значение имеет каждый этап приготовления препаратов. Для просвечивающего электронного микроскопа исследуемые объекты должны быть в виде очень тонких срезов (до 40-60 нм) или вирусных суспензий, которые помещают на специальные медные сетки, или бленды. Для удержания суспензий над отверстиями сетки ее покрывают тонкой пленкой – подложкой, изготовленной из коллодия, и укрепляют напылением углерода.

Различные структуры биологических объектов и пленка-подложка почти в одинаковой степени рассеивают электроны, и изображение объекта не будет выявлено. Поэтому необходимо предварительно создать различную

электронную плотность между фоном и препаратом или между структурами биологических объектов. В качестве контрастирующих веществ наиболее широкое распространение получили 1-2 % водные растворы фосфорновольфрамовой, фосфорно-молибденовой, осмиевой кислоты, растворы уранилацетата и уксуснокислого свинца. Методы негативного и позитивного контрастирования широко применяют при исследовании биологических объектов в виде суспензий.

При негативном контрастировании контрастирующее вещество высокой электронной плотности окружает объект более низкой плотности и он становится видимым на более плотном окружающем его фоне. Время контрастирования препарата составляет секунды (в среднем 15-40 с). Для получения позитивного контрастирования время реагирования контрастирующего вещества с объектом измеряется в минутах и часах. Соединяясь с определенным веществом объекта, атомы и молекулы тяжелых металлов повышают контрастность соответствующих структур, обеспечивая позитивное контрастирование объекта. При позитивном контрастировании избыток контрастирующего вещества фона объекта удаляется промыванием дистиллированной водой, и объект выглядит более плотным на более светлом окружающем фоне.

При изучении молекул белков нуклеиновых кислот, а иногда и вирусов также применяют методы контрастирования оттением, путем испарения металла в вакууме. Атомы металла разлетаются от места распыления под некоторым углом к исследуемому объекту и осаждаются на его поверхности слоем различной толщины. Вследствие этого участки объекта имеют различную электронную плотность и возникает изображение объекта.

Другой метод – углеродных реплик с предварительным оттением. Сущность реплик заключается в том, что рельеф поверхности объекта воспроизводится с помощью тонкой пленки, которая затем исследуется в электронном микроскопе. Существует несколько методов изготовления реплик.

**Электронно-микроскопическая диагностика и морфология вирусов.** Изучение морфологии вирусов – важный этап при определении их таксономической принадлежности. Материалом для электронно-микроскопических исследований вирусов могут быть смывы из глаз, со слизистых оболочек носовой и ротовой полостей, содержимое кишечника, срез пораженного участка эпидермиса кожи или оспенные корочки, кусочки органов и тканей больных и павших животных. При работе с вирусами в лаборатории исследуют вирусосодержащую культуральную жидкость, аллантоисную жидкость куриного эмбриона, кусочки органов и тканей зараженных животных. При подготовке препаратов для таких исследований большое значение имеют концентрация вируса в материале и степень его контаминации различными балластными веществами. В зависимости от этих факторов и выбирают методику подготовки исходного материала. В большинстве случаев необходима предварительная очистка и концентрация вирусов. Кусочки органов, тканей и фекальный материал гомогенизируют, а затем концентрируют ультрацентрифугированием или другими методами.

Для выделения вируса из зараженных клеток культуры тканей их предварительно разрушают в стеклянном гомогенизаторе ультразвуком или замораживанием-оттаиванием, затем освещают низкоскоростным центрифугированием и концентрируют. При исследовании кусочков пораженной кожи или корочкового материала при болезнях, вызываемых вирусами покс-группы, используют метод давленных препаратов или метод отпечатков. Материал смывов предварительно гомогенизируют в стеклянном гомогенизаторе, затем грубо фильтруют и концентрируют ультрацентрифугированием или ультрафильтрацией. Без предварительной очистки и концентрации препараты можно готовить из вирусосодержащей культуральной жидкости культуры тканей и аллантоисной жидкости зараженного куриного эмбриона, если титр вируса в них не меньше  $10^5$  ЛД<sub>50</sub> в одном миллилитре.

**Подготовка препаратов для электронной микроскопии.** На каплю

вирусодержащей жидкости помешают сеточки пленкой вниз. Через 1-2 мин адсорбции вируса на пленку избыток жидкости удаляют фильтровальной бумагой и контрастируют 1-2 % водным раствором фосфорно-вольфрамовой кислоты или 1-2 % раствором уранилацетата, помещая сетку пленкой вниз на каплю контрастирующего вещества. Через 15-40 с избыток контрастирующего вещества удаляют фильтровальной бумагой, подсушивают под лампой или в термостате и просматривают в электронном микроскопе. Иногда после адсорбции вируса на пленку или контрастирования сеточку промывают несколькими каплями дистиллированной воды.

**Иммунная электронная микроскопия.** Это специфический метод для выявления (идентификации) и титрования вирусов. Он позволяет выявить вирус в образцах, в которых его нельзя обнаружить при простой электронной микроскопии. При взаимодействии вируса со специфической антисывороткой образуется комплекс в виде агрегатов вируса и образование вокруг вирусной частицы ореола из окружающих антител. Образование агрегатов вирусных частиц позволяет концентрировать вирус при более низких оборотах центрифуги, чем при концентрации нативного вируса.

Препараты готовят из предварительно очищенной суспензии вируса, смешивая ее с различными разведениями специфической антисыворотки. Через 18 ч контакта смесь концентрируют центрифугированием при 17000-31000 об/мин в течение 1-1,5 ч. Осадок ресуспендируют в дистиллированной воде: контрастируют и помещают на предметные сетки с нитроцеллюлозной подложкой. Сеточки подсушивают и просматривают под электронным микроскопом при увеличении в 30000-50000.

Электронно-микроскопическая экспресс-диагностика болезней животных (на примере вируса оспы) методически осуществляется следующим образом. Используют биопсийный материал прижизненно или материал от убитых или недавно павших от оспы животных. Можно брать срез верхушки оспины пораженного эпидермиса кожи животных. Препарат

готовят методом давленных препаратов для адсорбции на сеточки вирионов из взятых для исследования материалов и методом отпечатков. Исследования проводят на электронном микроскопе с разрешающей способностью не более 0,5 нм. Диагноз считается положительным при наличии в препаратах одиночных или расположенных группами оспенных вирионов характерной кирпичеобразной формы с закругленными краями, размером 250-300x150-200 нм.

При отсутствии в препаратах вирионов ставят биопробу на восприимчивых животных, используя оставшийся материал; исследования проводят в установленном порядке.

#### **34. Использование в вирусологии полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

Благодаря высокой чувствительности метод ПЦР требует специально оборудованных помещений и тщательного соблюдения техники безопасности во избежание контаминации. Попадание в реакционную пробирку следовых количеств положительной ДНК приводит к амплификации в процессе ПЦР специфического фрагмента ДНК и, как следствие, к получению ложноположительных результатов.

Ложноположительный результат может быть вызван наличием ингибиторов реакции, недостаточной чувствительностью реакции, ошибками при выделении ДНК и др. Поэтому в каждой серии анализов должен присутствовать положительный контроль-образец с заведомым присутствием участка ДНК для данных праймеров.

Лаборатория, где проводится ПЦР, требует территориального разделения на три зоны для выполнения отдельных процедур: 1) первая зона предназначена для приготовления ПЦР-реактивов; 2) во второй зоне проводят выделение ДНК из клинических образцов и постановку ПЦР; 3) третья зона предназначена для детекции продуктов амплификации. Работа в

лаборатории должна быть организована в одном направлении: от первой зоны ко второй и далее к третьей.

При исследовании материала, зараженного или подозрительного на зараженность возбудителями инфекционных заболеваний I-IV групп, работа должна проводиться с соблюдением Санитарных правил СП-1.2.011-94 (безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности).

Забор клинических образцов осуществляют только в одноразовые пластиковые пробирки, работают в одноразовых перчатках, используют одноразовые наконечники для пипеток.

Рабочие поверхности, оборудование и материалы следует облучать ультрафиолетом в течение 1 ч до и после окончания работы.

**Метод полимеразной цепной реакции.** Принцип метода заключается в том, что по данным банка генов выявляют специфический для данного вируса ген – участок молекулы ДНК, несущий информацию для синтеза одного белка. Этот ген затем идентифицируют в исследуемом материале с помощью ПЦР. Полимеразная цепная реакция позволяет амплифицировать (образовывать дополнительные копии гена) в пробирке заданный участок ДНК-вируса. Амплифицируемый участок называют «амплификат», границы которого определяются двумя олигонуклеотидными праймерами, комплементарным начальным участком противонаправленных нитей двойной спирали ДНК. ПЦР является специфичной и высокочувствительной реакцией, что обусловлено последовательностью нуклеотидов избранного гена. В зависимости от цели исследования можно выявить вид или род микроорганизма.

Суть ПЦР заключается в том, что молекулу ДНК подвергают температурному плавлению, т.е. нагреванию до 90-94 °С, что ведет к денатурации – разрушению водородных связей между азотистыми основаниями двойной спирали, а затем охлаждают (отжиг) до 52 °С в присутствии праймера, фермента ДНК-полимеразы и всех четырех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов. Последующее повышение температуры до

70-72 °С приводит к синтезу новой молекулы ДНК, комплементарной матричной. Эту процедуру (плавления, отжига и синтеза ДНК) повторяют многократно, в результате чего количество выбранного фрагмента ДНК увеличивается.

Продолжительность реакции обусловлена числом циклов, необходимых для синтеза ДНК-амплификатора в количестве, достаточном для дальнейшего исследования или индикации. Индикацию проводят с помощью электрофореза или меченого ДНК-зонда.

Основные компоненты:

1) ДНК-полимераза 1, термостабильная, выдерживающая многократный нагрев до 96 °С;

2) праймер – олигонуклеотид из 15-20 нуклеотидов. Его получают путем химического синтеза на автоматическом синтезаторе «Виктория», пользуясь данными о первичной структуре (нуклеотидной последовательности) ДНК;

3) нуклеотиды – трифосфаты (d NTP), предшественники синтеза ДНК;

4) приборы (амплификатор и др.), посуда и реактивы для электрофореза в агаровом геле, проявления полос нуклеиновых кислот при ультрафиолетовом освещении, автоматические пипетки и др. В настоящее время выпускают специальные наборы для ПЦР, предназначенные для диагностики инфекционных болезней животных. Обычно один набор компонентов для анализа содержит 100 образцов.

Постановка полимеразной цепной реакции включает несколько этапов.

1. Получение ДНК-образца (лизатов, исследуемого материала). Для этого исследуемый материал суспендируют в буфере или дистиллированной воде, добавляют 1 молярный раствор NaOH и выдерживают при 37 °С 6-7 минут. Смесь нейтрализуют добавлением трис (оксиметил) аминаметана (рН 8,0). Лизат центрифугируют при 5000 об/мин в течение 10 мин для осаждения крупных частиц. Надосадочную жидкость, содержащую ДНК и РНК, используют для постановки ПЦР.

2. Проведение полимеразной цепной реакции – амплификация заданного фрагмента ДНК (гена). Для этого используют буферный раствор [буфер для ПЦР (10×) – 500 mM KCl, 100 mM трис – HCl, 14,15 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % желатина или бычьего сывороточного альбумина, pH 8], фермент ДНК-полимеразу, праймер-олигонуклеотид – затравку, трифосфаты – предшественники синтеза ДНК, исследуемый образец ДНК или биологическую жидкость (кровь, моча, слюна, мокрота и др.).

В пробирку емкостью 1,5 мл (эппендорф) собирают следующую смесь: 125 мкл бидистиллированной стерильной воды, 15 мкл буфера для ПЦР, 5 мкл раствора трифосфатов, 3 мкл раствора праймера, 3 мкл раствора ДНК-полимеразы термостойкой.

Смесь разливают в пять пробирок (вместимостью 0,5 мл) по 30 мкл. В каждую из них вносят по 0,5-1,0 мкл надосадочной жидкости из лизата, перемешивают; сверху наслаивают по 25 мкл стерильного вазелинового масла. Включают амплификатор и устанавливают режим работы. Например, плавление: температура 92 °C в течение 60 с; отжиг ДНК: 55 °C в течение 60 с; синтез ДНК: 70 °C в течение 75 с.

В стадии «плавления» пробирки устанавливают в амплификатор; проводят 30 циклов амплификации, что занимает 3 ч, и за этот срок из одной молекулы ДНК образуется до 1 млн молекул-копий. Реакцию останавливают на стадии «синтеза» и выдерживают 3-5 минут для окончательного досинтезирования фрагментов ДНК.

3. Индикация амплификата. С этой целью пробу подвергают электрофорезу в агарозном геле для разделения молекул ДНК. На пластинку наносят пробы, подлежащие анализу, и соответствующие свидетели. После разделения ДНК на электрофореограмме резко выделяется амплифицированная молекула. Для электрофореза готовят 1,7 % раствор агарозы с этидиум бромидом (краска); раствор заливают в аппарат для электрофореза, устанавливают шаблон для образования лунок. Через 25-30 минут агароза полимеризуется, шаблон осторожно вынимают, при этом в

агарозе образуются лунки. В аппарат заливают буфер для электрофореза и устанавливают электроды.

Из полученного при полимеразной цепной реакции амплификата отбирают 10 мкл смеси и смешивают с 5 мкл красителя – бромфенолового синего. Смесь вносят в лунки и проводят электрофорез в режиме 5 В/см. Через 40-45 минут аппарат отключают, агарозную пластинку вынимают и 10 мин окрашивают в растворе этидиум бромидом.

Затем агарозу помещают на трансиллюминатор и полученные картины полос фотографируют. Полосы, выявляемые при ультрафиолетовом освещении, – это фрагменты ДНК, синтезированные в процессе амплификации со специфическим для каждого возбудителя инфекций праймером. Предложенный метод позволяет с высокой точностью диагностировать инфекционные болезни животных. Он считается самым лучшим методом диагностики вирусов и бактерий. Разработаны наборы ПЦР для диагностики КЧС, диареи, инфекционного ринотрахеита, африканской чумы лошадей, болезни Ньюкасла, ящура, инфекционного бронхита кур и других инфекционных болезней.

### **35. Использование в вирусологии ДНК-зондов**

Метод ДНК-зондов основан на уникальном свойстве генетического материала организма – молекулы ДНК, состоящей из мононуклеотидов, – образовывать двойную спираль путем комплементарного соединения азотистых оснований. Молекула ДНК образует двойную спираль, при которой азотистые основания первой цепи строго комплементарно соединяются водородными связями с азотистыми основаниями второй цепи, где аденин соединяется с тиминном, гуанин – с цитозинном.

Принцип метода состоит в том, что структуру двойной спирали ДНК (или РНК) можно разрушить нагреванием; при этом происходит разделение цепей. Этот процесс называется денатурацией, или плавлением ДНК.

Температуру, при которой происходит разделение цепей ДНК, называют точкой плавления, она составляет 85-95 °С. Этот процесс обратимый, т. е. при снижении температуры происходит восстановление связей – образование двойной спирали. Это явление называют ренатурацией. Если при ренатурации взяты молекулы из разных источников, то говорят о гибридизации. Способность к гибридизации двух препаратов нуклеиновых кислот служит строгим тестом на комплементарность их последовательностей.

Гибридизацию можно осуществлять в растворе или на фильтре (капроновом или нитроцеллюлозном). Удобным для работы является метод гибридизации с использованием фильтров. При этом один из препаратов ДНК иммобилизуют на нитроцеллюлозных фильтрах, на которых молекула ДНК адсорбируется. Затем погружают их в раствор, содержащий второй препарат денатурированной ДНК (ДНК-зонд). Связывание ДНК-зонда происходит только в том случае, если молекула имеет последовательность нуклеотидов, комплементарную первоначально адсорбированной на фильтре молекуле ДНК.

Эффективность гибридизации определяют по количеству метки, оставшейся на фильтре. Метод обладает высокой чувствительностью. При этом необходимо иметь меченные радиоактивным изотопом РНК- или ДНК-зонды, идентификация которых с исследуемой молекулой регистрируется с помощью радиоавтографии.

В качестве ДНК-зонда используют меченые копии ДНК с известной последовательностью нуклеотидов.

**Метод блоттинга по Саузерну.** Для идентификации гена молекулу ДНК генома расщепляют с помощью ферментов рестриктаз на куски примерно по 15-20 тыс. пар нуклеотидов. Расщепленный таким образом геном подвергается электрофоретическому фракционированию в агаровом геле. После этого фракции ДНК денатурируют нагреванием и переносят из агарозного геля на нитроцеллюлозный фильтр, где иммобилизируют.

Процесс переноса ДНК напоминает промокание (по-английски – блоттинг) и называется методом блоттинга по Саузерну.

Сущность блоттинга заключается в том, что агарозный гель помещают на фильтровальную бумагу, пропитанную в концентрированном солевом растворе, затем на гель накладывают нитроцеллюлозный фильтр и сверху помещают сухую фильтровальную бумагу. Солевой раствор впитывается в сухую бумагу; чтобы это произошло, он должен пройти сквозь агарозный гель и затем через нитроцеллюлозный фильтр. При этом ДНК переносится вместе с раствором, но задерживается нитроцеллюлозой. Имобилизованную таким образом ДНК можно гибридизировать на месте с радиоактивным зондом. Со специфическим зондом будут гибридизоваться только комплементарные ему фрагменты. Так как зонд радиоактивный, то гибридизацию можно обнаружить с помощью автордиографии. Каждая комплементарная последовательность проявляется в виде радиоактивной полосы, местоположение которой определяется размером фрагмента ДНК.

Метод блоттинга как высокочувствительный и точный широко применяют в криминалистике, медицине и ветеринарии.

В последние годы разрабатывается новый метод анализа ДНК, так называемая *генная дактилоскопия*. Он включает следующие этапы: выделение ДНК, фрагментация ее с помощью ферментов – рестриктаз, фракционирование с помощью электрофореза в геле. Фрагменты, содержащие гипервариабельные участки, выявляют с помощью специального зонда – «пробы Джеффриса», с которой они связываются путем гибридизации. Участки гибридизации выявляют путем автордиографии.

В настоящее время метод молекулярной гибридизации разработан для диагностики инфекционных болезней сельскохозяйственных животных, например, для обнаружения вирусов ящура, чумы свиней, чумы птиц, энтеровирусов и т. д.

### РАЗДЕЛ 3.

## МЕТОДЫ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Серологическая диагностика основана на проведении различных серологических реакций. Свое название они получили от латинского слова *serum*, что означает сыворотка крови, являющаяся обязательным компонентом всех серологических реакций. В основу практического применения этих реакций положен принцип тесной физико-химической связи между родственными антигеном и антителом. На основании этого принципа по одному известному компоненту можно сделать заключение о природе другого, т.е. природе неизвестного. Таким образом, во всех серологических реакциях участвуют два основных компонента - антиген и антитело, реакция между которыми осуществляется в электролитической среде. В качестве последней используют 0,85 % раствор поваренной соли (физиологический раствор).

Антигены – естественные или синтетические высокомолекулярные генетически чужеродные вещества, распознаваемые клетками организма и вызывающие иммунный ответ в виде образования антител (иммуноглобулинов Ig), появления сенсibilизированных лимфоцитов или в развитии толерантности к данному антигену.

Реакции антиген-антитело, происходящие *in vivo* – это важнейший защитный механизм устранения множества антигенов, с которыми организм сталкивается в любой момент.

К антигенам, имеющим значение в ветеринарии, относят живые и убитые микроорганизмы, их структурные образования (корпускулярные антигены), продукты их жизнедеятельности - токсины, ферменты, продукты метаболизма (растворимые антигены).

Антигены для продления своего действия должны быть:

- генетически чужеродными;

- высокомолекулярными соединениями – это прежде всего белки (полноценные антигены), но и полисахариды, липополисахариды и др. (неполноценные антигены – гаптены);
- парентеральное введение (попадание) в организм, т.е. минуя желудочно-кишечный тракт.

Полноценные антигены способны в организме животного вызывать образование антител (Ig), а также вступать с ними в реакцию *in vitro*.

В дальнейшем гаптены способны реагировать с образовавшимися антителами *in vitro* без белка.

Антитела – защитные белки, относящиеся в основном к фракции гамма-глобулинов, способные распознавать антиген и реагировать с ним, лишая его вредного воздействия на организм животного. Антитела вырабатываются зрелыми плазматическими клетками (В-лимфоцитами) и поступают из лимфоидной системы в кровь.

Серологические реакции используют для:

1. Серодиагностики – выявления в сыворотке крови больного животного антител к тому или иному антигену, микроорганизму.
2. Сероидентификации – определения вида микроорганизма или неизвестного антигена по известному антителу.

В зависимости от физико-химического состава антигена, функциональных групп антител, участвующих в серологических реакциях, и условий, в которых взаимодействуют антигены и антитела, различают реакции: преципитации, агглютинации, лизиса, связывания комплемента, нейтрализации, опсоно-фагоцитарная и др.

### **Феномены взаимодействия антиген – антитело**

Знание механизмов взаимодействия антигенов с антителами раскрывает сущность многообразных иммунологических процессов и реакций, возникающих в организме под влиянием патогенных и непатогенных агентов. Механизм реакции антигена с антителом объясним на

основе современных представлений о наличии у антигенов нескольких детерминантных групп и двух активных центров в молекуле антитела. детерминантные группы антигена несут электрический заряд. В процессе индукции синтеза антител, они, так или иначе, определяют специфичность формирующихся антител. Концевые части полипептидных цепей имеют заряд, противоположный заряду детерминантной группы антигена. Полярные группы антигена и антитела, обладающие противоположными зарядами, соединяются между собой. Прочность образовавшегося комплекса зависит от количества реагирующих групп и полноты совпадения структуры полярных групп антигена и антитела. Чем больше реагирующих групп и чем полнее совпадение структуры полярных групп, тем прочнее соединение, и наоборот.

При оптимальном соотношении антигена с антителом происходит полное взаимное насыщение всех валентностей и образуются прочные комплексы, выпадающие в осадок. При избытке антител часть активных центров остается свободной и образование комплекса задерживается. В случае избытка антигена возникают рыхлые комплексы и замедляется выпадение осадка. При максимальном избытке антигена, когда связаны все активные центры антитела, образование комплексов прекращается, и осадок не выпадает. Специфичность антител, обуславливающая механизм их взаимодействия с антигеном, связана с конфигурацией активных центров, которые должны строго соответствовать детерминантным группам антигена.

Реакция между антителом и антигеном протекает в две стадии, первая – специфическая (непосредственное соединение активного центра антитела с антигенной детерминантой), вторая – неспецифическая, когда отличающийся плохой растворимостью иммунный комплекс антиген-антитело выпадает в осадок. Неспецифическая стадия, как правило, возможна в присутствии растворов электролитов и визуально проявляется по разному в зависимости от физического состояния антигена. Если антигены корпускулярные, имеет место феномен агглютинации – склеивания различных химических частиц, сенсibilизированных антигенами, и клеток, в том числе микроорганизмов.

Образующиеся конгломераты выпадают в осадок, при этом микробные клетки морфологически заметно не меняются: теряя подвижность, они остаются живыми. Антитела, участвующие в реакции агглютинации, называют агглютинидами, антигены – агглютиногенами, а образующийся агрегированный комплекс – агглютинатом. Поскольку антигенная структура микробов разнообразна, в их агглютинации принимают участие антитела разной специфичности. Тождественность детерминантных участков антигенов микробов разных видов обеспечивает групповые реакции агглютинации с гетерологичными иммунными сыворотками.

Когда в реакции с антителами участвуют растворимые (молекулярные) антигены – белки или их комплексы с углеводами и липидами разного происхождения, бактериальные экстракты, лизаты и фильтраты бульонных культур, наблюдается феномен преципитации – осаждение антигена. Образующийся осадок носит название преципитата, антитела – преципитинов, а антигены – преципитиногенов.

Реакция, происходящая между антителами и антигеном и начинающаяся быстрым соединением детерминантной группы антигена со специфическим активным центром антитела (I стадия), осложняется далее образованием длинных цепей из чередующихся молекул антигена и антител, а также разветвлением этих цепей (II стадия). Во II стадии реакции происходит образование решетки антиген – антитело.

Необходимое условие для образования решетки – наличие более трех антигенных детерминант на каждую молекулу антитела. Существует несколько вариантов соединения молекул антител с молекулами антигена. Молекулы антигена представляют собой узлы решетки, а молекулы антител – связующие звенья. В зоне избытка антител часть антигенсвязывающих участков свободна и формирование комплекса приостанавливается. Область оптимальных соотношений (зона эквивалентности) концентраций антигена и антител – это когда в надосадочной жидкости после образования осадка не обнаруживают свободные антигены и свободные антитела. В зоне избытка

антигена комплекс антиген-антитело растворяется, так как свободные и связанные в решетку молекулы антигена конкурируют между собой за двухвалентные молекулы антител, в результате чего решетка распадается на ряд растворимых комплексов.

Окончательное формирование системы антиген-антитело протекает намного медленнее, чем I стадия реакции. Это не специфический процесс, в который могут включаться различные посторонние белки, захватываемые решетчатой структурой антиген-антитело и неспособные диффундировать сквозь узкие петли этой решетки в надосадочную жидкость. Скорость образования решетки зависит от температуры, ионной силы раствора и других условий. Оптимальные условия для реакции антиген-антитело *in vitro* следующие: температура 0-37 °С; ионная сила 0,005-0,1 и рН 6,4-8,6.

Механизм реакций преципитации и агглютинации, при которых иммунный комплекс выпадает в осадок, вполне объясняет теория решетки. В ходе реакции преципитации решетка формируется непосредственно в растворе, а при агглютинации бактериальных клеток решетка антиген – антитело образуется на самих клетках. О характере соединения антигена с антителом судят, применяя различные методы. Метод изучения активного центра (метка по сродству), основанный на реакции гаптена со специфическими антидетерминантами, выявляет пептидные цепи, участвующие в построении активного центра антител. Методом рентгеноструктурного анализа была раскрыта структура активного центра антител, формирующаяся из гипервариабельных участков вариабельных доменов. При этом не было получено прямых данных, указывающих на изменение формы активного центра после присоединения к нему антигена. Электронная микроскопия – один из важнейших методов не только изучения общей конформации молекул иммуноглобулинов, но и исследований комплексов антител с антигенами. Этим методом было выяснено, что комплексы антиген – антитело имеют кольцеобразную, перекрывающуюся или решетчатую структуру.

Антитела класса IgG образуют с антигеном, как правило, кольцеобразные комплексы. Электронные микрофотографии иммунных комплексов, образованных при помощи антиген – антитело, интерпретировать сложно. Однако в некоторых случаях удастся различить циклические комплексы, похожие на веревочную лестницу, и пропеллерообразные структуры.

**Реакции взаимодействия антиген – антитело.** Реакции между антигенами и антителами *in vitro*, имеющие диагностическое значение, называли серологическими (от лат. *serum* – сыворотка), так как источником антител служила сыворотка крови. При появлении методов иммунохимического анализа серологические реакции стали одной из широкого набора реакций, выявляющих механизмы взаимодействия между антигенами и антителами. Если на разных этапах развития иммунологии в качестве антител для постановки серологических реакций использовали только сыворотку крови, теперь благодаря разнообразным методам выделяют из нее высокоочищенные иммуноглобулины. Для индикации и количественной оценки того или иного вещества антигенной природы предложены способы получения высокоспецифичных (моноспецифичных) антител и высокочувствительные методы регистрации концентрации отдельных компонентов реакции антиген-антитело. Это стало возможным в связи с разработкой способов конъюгирования антигенов и антител с флуоресцирующими красителями и ферментами, введения компонентов реакции антиген – антитело на различных типах носителей. Достижения современной иммунохимии позволили проводить реакции антиген – антитело на уровне, который вряд ли можно назвать серологическим, хотя источником антител продолжает оставаться сыворотка крови. Понятие «серологическая реакция» окончательно отпадает, когда речь заходит о взаимодействии антигена с моноклональными антителами, получаемыми благодаря разработке гибридомной техники, и когда реакция антиген – антитело протекает при аллергии.

Антитела в зависимости от свойств антигена и условий взаимодействия с ним обладают нейтрализующим, иммобилизирующим, коагулирующим (осаждающим) и лизирующим (растворяющим) действиями. Нейтрализующее действие проявляется в реакциях нейтрализации токсина антитоксином, иммобилизирующее – в иммобилизации некоторых микроорганизмов, коагулирующее – в реакциях агглютинации и преципитации, лизирующее – в реакциях лизиса и связывания комплемента. Каждая из разновидностей серологических реакций имеет свои варианты, а их постановка — различные модификации, поэтому методические подходы к проведению реакций между антигеном и антителом довольно разнообразны.

Реакция нейтрализации (РН). В ходе реакции нейтрализации специфические антитела нейтрализуют вредное действие антигена, которое проявляется при попадании последнего в организм. Если антигеном служит микробный экзотоксин (дифтерийный, столбнячный, ботулинический и др.), то специфические антитела нейтрализуют его. В организме происходит нейтрализация только свободного, не связавшегося с клетками токсина. Обезвреживание токсина в ходе физико-химической реакции нейтрализации происходит за счет связывания его свободных аминогрупп, что приводит к потере токсичности. Если антигеном служит вирусный материал, нейтрализующие антитела полностью подавляют специфическую активность вируса, выявляемую в различных клеточных культурах, куриных эмбрионах и на подопытных животных. Вирус перестает размножаться, теряет свою инфекционность.

Реакция агглютинации (РА). Различают прямую, непрямую, или пассивную агглютинации. В прямой агглютинации в качестве антигена выступает сама микробная клетка или структурные компоненты ее поверхностной оболочки. Предел чувствительности реакции агглютинации микробов составляет 0,01 мкг азота белка антител в 1 мл.

Агглютинация обусловлена в большей степени особенностями строения клеточной оболочки и ее функциями, нежели свойствами

агглютининов. Фрагменты антител могут блокировать антигенные детерминанты не приводя непосредственно к склеиванию. Агглютинации способствует расположение антигенных рецепторов клеточной поверхности в виде скоплений. Если мнововалентные агглютинины взаимодействуют одновременно с несколькими антигенными рецепторами, константа  $K_a$  повышается по сравнению с  $K_a$  для случаев соединения антитела с антигеном единичной связью.

При пассивной агглютинации растворимые антигены (белки, полисахариды и их комплексы микробного происхождения) соединяются с нерастворимым носителем, выполняющим исключительно индикаторную функцию. Носителями могут быть эритроциты, частицы латекса, полиакриламида бентонита и др. Связывание антигена с носителем происходит в результате адсорбции или химического взаимодействия. Микробные полисахариды, например, адсорбируются на нативных эритроцитах без какой-либо их предварительной обработки. Различные белки (в том числе микробные фрагменты) возможно присоединить к эритроцитам, только обработав их различными химическими веществами, обладающими дубильным действием, – танином, хромахлоридом формальдегидом или бисдиазотированным бензидином. Такая обработка предотвращает разрушение эритроцитов, которое может произойти при непосредственном их контакте с антигеном. При условии, если антиген, связанный с носителем, соответствует антителу, происходит агглютинация.

Реакция преципитации (РП). Реакция антиген-антитело представлена преципитацией. Основана на осаждении антигена из раствора специфическими антителами. Комплекс антиген-антитело выпадает в осадок только при определенных соотношениях концентраций реагирующих молекул. Область этих соотношений, при которых в надосадочной жидкости после образований преципитата не обнаруживаются ни свободные антигены, ни свободные антитела, называется зоной эквивалентности. Вне этой зоны, при избытке антител или антигена, феномен преципитации не происходит,

так как образуется растворимый комплекс антиген-антитело. Реакция преципитации менее чувствительна, чем реакция агглютинации.

Существуют модификации реакции преципитации. Самый простой способ постановки – кольцепреципитация, которую выполняют в пробирках путем наслоения на иммунную сыворотку различных разведений прозрачного раствора антигена. На границе двух реагирующих систем через определенное время появляется опалесцирующее серо-белое кольцо преципитации. Именно таким образом, при изучении стерильных фильтратов бульонных культур возбудителей холеры, брюшного тифа, чумы, сибирской язвы и соответствующих антисывороток в конце XIX века (1897) были обнаружены преципитины.

Реакция преципитации может быть поставлена в агаровом геле (иммунодиффузия по Ухтерлони). Принцип этого метода заключается в следующем. Растворимые антигены и антитела вносят в лунки, вырезанные в геле на определенном расстоянии. Компоненты реакции диффундируют в слое агара навстречу друг другу, образуя в зоне контакта преципитат в виде мутной видимой линии преципитации.

Для более детальных иммунологических исследований применяют метод иммуноэлектрофореза, предложенный П. Грабаром и К. А. Уильямсом (1953). Вначале осуществляют электрофоретическое разделение антигена, представляющего собой зачастую смесь белковых или других молекул в забуференном агаровом геле. После разделения в канавку, которая идет в направлении миграции антигенных веществ, вносят преципитирующую сыворотку. Антиген и антисыворотка диффундируют в геле навстречу друг другу, и в месте их взаимодействия возникают дугообразные линии преципитации. По числу, положению и форме этих линий дают заключение о составе исходной смеси антигенов.

Реакция лизиса (РЛ). Лизирующее (растворяющее) действие антител наглядно проявляется в реакциях лизиса и связывания комплемента. В основе реакций лизиса лежит взаимодействие корпускулярных антигенов со

специфическими антителами. Иммуноглобулины при содействии комплемента разрушают эритроциты, из которых выходит гемоглобин, и реагирующая смесь из мутной взвеси эритроцитов преобразуется в прозрачную красную жидкость, так называемую лаковую кровь. Реакция названа реакцией гемолиза. Когда иммуноглобулины также при содействии комплемента разрушают оболочку бактериальной клетки, наблюдается лизис бактерий – бактериолизис.

Реакция связывания комплемента (РСК). Механизм действия наиболее сложный в сравнении с другими серологическими реакциями. В РСК участвуют две системы антиген-антитело. Для визуальной регистрации связывания комплемента основной системой антиген-антитело, в реакцию дополнительно вводят вторую, или индикаторную систему, состоящую из взвеси эритроцитов и соответствующей антисыворотки (гемолитической сыворотки). Если основной комплекс антиген-антитело фиксировал в себе комплемент (в случае соответствия антигена антителу), то гемолиз отсутствует (положительная реакция). Если в основной системе антиген и антитело не соответствуют друг другу, то комплемент фиксируется на втором индикаторном комплексе, вызывая гемолиз эритроцитов (реакция отрицательная). По чувствительности РСК примерно соответствует реакции пассивной гемагглютинации.

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ). В основу иммунофлуоресцентного метода положено взаимодействие антигена с антителом, при котором один из компонентов реакции (чаще антитело) обладает способностью к вторичной флуоресценции, благодаря предварительному соединению с флуоресцентным красителем. Образовавшиеся таким образом иммунные комплексы становятся хорошо видимыми, ярко светящимися структурами на темном фоне под флуоресцентным микроскопом. В качестве флуоресцентных красителей используют флуоресцеин, изотиоцианат, родамин, В-изотиоцианат, лиссамин-родамин и другие, имеющие реакционно-способные группы

(сульфохлорид, изотиоцианат и др.), которые соединяются со свободными аминокруппами молекул антител, не теряя при обработке флуорохромами специфического связывания с соответствующим антигеном.

Прямой и непрямой флуоресцентные методы. Прямой метод основан на непосредственном специфическом соединении антигена с мечеными антителами. Непрямой метод на поэтапном выявлении комплексов антиген-антитело с помощью флуоресцентных красителей. Первый этап заключается в образовании иммунных комплексов определенного антигена (например, бактериальной клетки) со специфическими антителами ( $\gamma$ -глобулинами) иммунной сыворотки. Второй этап – в выявлении этого комплекса путем обработки его меченым анти- $\gamma$ -глобулином.

Обнаружение иммуноглобулинов иммунофлуоресцентным методом возможно, если антиген, использованный *in vitro* для образования антител, представляет собой растворимый белок. В этом случае он может быть конъюгирован с флуорохромом и в таком виде использоваться для обнаружения гомологичных антител.

Иммуноферментный анализ (ИФА). В основу метода положена конъюгация антитела или гаптена с ферментом, которая не приводит к утрате антителом или гаптенем специфичности, а ферментом – каталитической активности. Однако в составе комплекса антиген-антитело конъюгаты гаптен-фермент или антитело-фермент теряют свою каталитическую активность.

Соединение молекул антигена с ферментом осуществляется с помощью глутаральдегида – бифункционального реагента, взаимодействующего с е-аминокруппами белковых молекул. В качестве фермента успешно применяют, в зависимости от модификации метода, либо пероксидазу,  $\beta$ -галактозидазу, щелочную и кислую фосфатазы (реже ацетилхолин, глюкоамилазу), либо лизоцим, глюкозо-6-фосфат-дегидрогеназу и малатдегидрогеназу. Используемый для маркировки антител фермент не должен присутствовать в исследуемых клетках, содержащих антиген.

Иммуноферментные методы первоначально были разработаны для гистохимических исследований. Принцип иммуногистохимического анализа с использованием ферментов заключается в следующем. Антитела, маркированные ферментом, соединяются со специфическим антигеном, фиксированным на твердом носителе (полистироловая пластина или другие непористые полимеры), образуя невидимый комплекс. Выявление иммунных комплексов, содержащих фермент, проводится с помощью цветной реакции, происходящей при добавлении фермент - специфического субстрата. Окрашенный комплекс антиген-антитело выявляется в световой или электронной микроскопии.

В дальнейшем методы иммуноферментного анализа стали применять для количественного определения антигенов и антител в биологических жидкостях. Были созданы гетерогенные (твердофазные) и гомогенные методы, принципиально отличающиеся способом разделения компонентов иммунохимической реакции. Гомогенный метод характеризуется протеканием реакции антиген-антитело в гомогенном растворе, и этап физического разделения реагентов и продуцентов реакции не обязателен. Твердофазные методы основаны на применении антител (или антигенов), иммобилизованных на нерастворимых носителях, гомогенные методы – на эффекте модуляции антителами активности фермента, связанного с антигеном. В основу гомогенных методов положен принцип конкурентного взаимодействия меченого и немеченого гаптена с активными центрами антител. Чем больше свободного гаптена введено в реакцию до прибавления меченого гаптена, тем меньшее количество последнего будет связано с антителами. Соответственно и ферментативная активность в растворе изменится незначительно. Наоборот, чем меньше свободного гаптена ввести в реакцию, тем большее количество ковалентного соединенного с ферментом гаптена уйдет в иммунный комплекс, а ферментативная активность в растворе существенно понизится.

Определение неизвестной концентрации гаптена в образце

осуществляют по заранее выведенной калибровочной кривой, для построения которой устанавливают зависимость активности фермента в данной системе от стандартных концентраций свободного гаптена.

В твердофазном иммуноферментном анализе, наряду с конкурентными методами, распространены подходы, основанные на последовательном взаимодействии фиксированных на носителе иммуноглобулинов с антигеном (или наоборот), а затем с иммуноферментным конъюгатом, представляющим собой меченные ферментом антитела против иммуноглобулинов.

Радиоиммунологический анализ (РИА). В радиоиммунологическом анализе специфичность реакции антиген-антитело сочетается с высокой чувствительностью, обеспечиваемой применением радиоактивной метки, благодаря которой можно определить количество азота антител до  $10^{-8}$  мг/мл. Для проведения анализа необходимо иметь антисыворотки и гомологичные антигены, маркированные каким-либо изотопом йода ( $^{125}\text{J}$ ,  $^{131}\text{J}$ ), равно как и гаптены, маркированные  $^{14}\text{C}$  или  $^3\text{H}$ . Чувствительность метода существенно возрастает при использовании высокоаффинных антител с низкой перекрестной реактивностью и антигенов с высокой удельной радиоактивностью. В основу радиоиммунологического анализа положен принцип конкурентного взаимодействия определяемого немеченого антигена и известного количества меченого антигена с активными центрами антител. При этом происходит вытеснение меченого антигена или гаптена из его комплекса с антителом, вследствие последующего добавления больших концентраций немеченого антигена или гаптена той же специфичности. Реакция (при высоком разведении ингредиентов) подчиняется закону действующих масс: происходящее вытеснение пропорционально введенному количеству немеченого антигена или гаптена. Конкуренцию между определяемым и меченым антигенами можно оценить количественно, с помощью радиометрии, предварительно отделив образовавшиеся иммунные комплексы от несвязавшегося меченого антигена. Концентрацию определяемого антигена рассчитывают, исходя из сравнения соотношений

свободного и связанного меченых реагентов с соответствующим стандартом.

### **36. Реакция преципитации: кольцепреципитации, диск-преципитации, диффузионной преципитации**

Сущность реакции состоит в осаждении (преципитации) антигена, находящегося в высокодисперсном состоянии, под воздействием специфических антител в растворе электролита. Растворенный антиген, участвующий в реакции, называется преципитиногеном.

Антитела, реагирующие с растворенным антигеном, обеспечивающие выпадение мелкодисперсионного осадка комплекса антиген-антитело в среде электролита, называются преципитинами.

Реакция является высокочувствительным тестом. Посредством ее можно выявить специфический антиген в разведении 1:100 тыс. и даже 1:300 тыс., т.е. в столь малых количествах, в которых он не обнаруживается химическим путем.

Реакция преципитации применяется для диагностики инфекционных болезней, вызываемых как бактериями, так и вирусами.

В ветеринарии реакции преципитации широко используют для исследования кожевенного и мехового сырья, шерсти, мяса, загнившего патологического материала на сибирскую язву. Это особенно важно, когда не представляется возможным выделение самого возбудителя.

Бактериальные антигены, используемые для реакции преципитации, чаще всего являются гаптенами. Они обладают устойчивостью к высокой температуре. Так, сибиреязвенный, чумной, туляремийный и другие антигены не разрушаются при кипячении в течение 45 минут, они сохраняются в гниющих субстратах.

Реакция преципитации применяется также в судебной медицине и ветеринарии для определения видовой принадлежности белка крови и в санитарной практике – для выявления фальсификации продуктов. В

санитарной практике применяется для выявления фальсификации мясных, рыбных, мучных продуктов. Посредством этой реакции можно определить, из какого мяса (свиного, говяжьего, конины и др.) приготовлен тот или иной продукт.

Для ее проведения разработаны методы: кольцепреципитации, диффузной преципитации, диск-преципитации.

### **Реакция кольцепреципитации**

Этот метод был разработан Асколи (1910) в основном для исследования кожевенного сырья на сибирскую язву. Эта реакция получила и другое название - асколизация кожевенного сырья.

Для ее проведения необходимы следующие компоненты:

1. Экстракт из исследуемого сырья. Исследуемые пробы кожи, нанизанные на проволоку, стерилизуют в автоклаве при 1,5 атм 30 минут. Пробы охлаждают, измельчают, помещают в баночки и заливают карбонизированным физиологическим раствором (на 1 г сырья 10 мл экстрагента). Продолжительность экстрагирования от 16 до 20 ч (холодный способ).

Пробы от свиных шкур и мяса экстрагируют горячим способом в водяной бане в течение 30 минут.

Полученные пробы фильтруют через асбестовую вату. Экстракт из исследуемого сырья должен быть прозрачным.

В экстракте, полученном из кожсырья больных животных, содержится сибирезвевный антиген.

2. Сибирезвевная преципитирующая сыворотка, которую получают путем гипериммунизации лошадей на биофабриках. Для этого лошадям-продуцентам внутривенно вводят многократно (16-17 раз) возбудитель сибирской язвы (антиген) с интервалом в три дня в нарастающих дозах с 5 до 70 мл. Предварительно до гипериммунизации лошадей вакцинируют для создания грунд-иммунитета.

Через 9-10 дней после последнего введения антигена у лошадей берут

кровь в количестве 5-6 литров и из нее получают преципитирующую сыворотку, которая содержит сибирезвенные антитела. Полученную специфическую сыворотку консервируют 0,5 % раствором фенола и отстаивают в течение двух месяцев, фильтруют через стерилизующие пластины и расфасовывают в стерильные 50-100 мл флаконы.

Для контроля используют следующие компоненты:

1. Специфический сибирезвенный антиген биофабричного изготовления, который представляет собой обезвреженный экстракт, полученный из возбудителя сибирской язвы.

2. Нормальную сыворотку, полученную от здоровых животных, фабричного изготовления.

### **Методы постановки реакции преципитации**

#### *1. Метод наслаивания*

В небольшие (уленгутевские) пробирки наливают около 0,3 мл преципитирующей сыворотки, затем осторожно по стенке пробирки наслаивают в таком же объеме исследуемый экстракт (антиген) так, чтобы была видна граница между двумя компонентами.

#### *2. Метод подслаивания*

В небольшие (уленгутевские) пробирки наливают около 0,3 мл исследуемого экстракта (антигена), затем под него подслаивают 0,3 мл преципитирующей сыворотки.

Положительная РП характеризуется появлением в первые 1-2 минуты на границе двух компонентов серо-белого кольца-преципитата, хорошо видимого на черном фоне в проходящем свете (рисунок 1).

#### *Проведение контролей:*

1. Преципитирующая сыворотка + физраствор – отрицательная реакция.
2. Нормальная сыворотка + исследуемый антиген – отрицательная реакция.
3. Преципитирующая сыворотка + специфический антиген – положительная реакция.

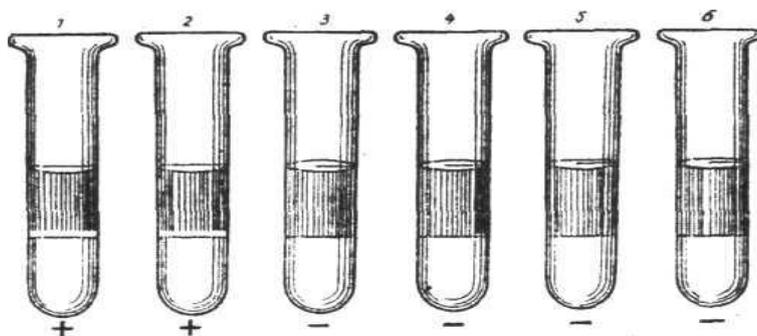


Рисунок 1 – Реакция преципитации:

1 - преципитирующая сыворотка + исследуемый антиген; 2 - преципитирующая сыворотка + известный специфический антиген; 3 - преципитирующая сыворотка + контрольный экстракт без антигена; 4 - преципитирующая сыворотка + изотонический раствор; 5 - нормальная сыворотка + исследуемый антиген; 6 - нормальная сыворотка + контрольный экстракт без антигена.

### Реакция диск-преципитации

Эта реакция используется при диагностике сибирской язвы и дифференциации ее возбудителя от подобных ему сапрофитных микробов рода *Бацилус*. Она основана на взаимодействии антигена – нативных продуктов метаболизма, растущего в жидкой питательной среде возбудителя сибирской язвы – с антителами преципитирующей сибирезывенной сыворотки в слое агарового геля. При этом происходит образование диска преципитации в слое агарового геля, расположенного между антигеном и сывороткой.

Для постановки реакции диск-преципитации необходимы следующие компоненты:

- 1) преципитирующая сибирезывенная сыворотка;
- 2) очищенный 1 % агаровый гель;
- 3) жидкая питательная среда для возбудителя сибирской язвы.

Техника проведения реакции диск-преципитации сводится к следующему. Преципитирующую сибирезывенную сыворотку разливают по 0,5-1 мл в стерильные бактериологические пробирки. На поверхность сыворотки наслаивают расплавленный и охлажденный до 45 °С 1 % агаровый

гель столбиком высотой 5-7 мм. На поверхность застывшего агара вносят 1-1,5 мл жидкой питательной среды. При исследовании патологического материала и мяса вынужденно убитых животных посев производят в мясопептонный бульон.

Посевы выдерживают в термостате при 37 °С в течение 16-20 ч.

Учет результатов проводят визуально на темном фоне.

Возбудитель сибирской язвы образует в средней части столбика агарового геля тонкую с четкими границами белую линию (диск) преципитации.

Почвенные сибирезвенные сапрофитные бациллы, за исключением нескольких штаммов *Bac. anthracoides*, дают отрицательный результат (диск преципитации отсутствует).

В качестве контроля при постановке реакции могут быть использованы посевы из противосибирезвенной вакцины СТИ.

### **Реакция диффузионной преципитации (РДП)**

Эта реакция нашла широкое применение при диагностике вирусных болезней, а также для определения титра преципитирующей сыворотки, для установления токсигенности некоторых видов микроорганизмов и др.

Техника проведения этой реакции сводится к следующему.

В стерильные чашки Петри разливают по 20-25 мл осветленного 1-1,5 % агара. После застывания агара в его слое делают лунки диаметром 5-6 мм в центре и на периферии на расстоянии 4-5 мм друг от друга. В каждую лунку вносят по одной капле агара для формирования дна лунки. Розлив компонентов реакции в лунки проводится различно в зависимости от поставленных целей.

Через 48 часов (24 часа инкубирования в термостате, 24 часа при комнатной температуре) проводится учет результатов реакции. За это время реагенты диффундируют в агар навстречу друг другу. При положительной реакции в месте встречи образуются полосы (дуги) – линии преципитации серо-белого цвета.

Эта реакция может быть осуществлена и микрометодом. В этом случае на предметных стеклах приготавливают слой агара, в котором делают лунки. В остальном эта реакция сходна с макрометодом.

### **37. Реакция агглютинации: пробирочный метод.**

#### **Другие модификации постановки**

*Агглютинацией* называется склеивание микробных или других клеток при воздействии на них специфических антител в присутствии электролитов. Двухфазный характер этого взаимодействия ничем не отличается от механизма других двухкомпонентных реакций иммунитета: первая фаза – соединение бактерий с антителом; вторая – соединение бактерий под влиянием солевого раствора. Антиген, вступающий в реакцию, носит название агглютиногена, антитела сыворотки – агглютинины, а комплекс антигена + антитело, выпадающий при положительной реакции – агглютинат.

Реакция агглютинации используется для серологической диагностики многих инфекционных болезней, в том числе бруцеллеза, сальмонеллез, колибактериозов, сапа, листериоза, кампилобактериоза и др.

Она проводится с двумя целями для:

- а) обнаружения специфических антител в исследуемых сыворотках;
- б) установления вида (серогруппы, сероварианта) выделенного микроорганизма (антигена) из патологического материала с использованием известных сывороток, содержащих специфические антитела.

Агглютинация происходит при температуре 37 °С в слабощелочной солевой среде.

Различают следующие виды по характеру агглютинации:

1. Соматическую, когда происходит склеивание и оседание неподвижных, не имеющих жгутиков, микробов. Эта форма О-агглютинации протекает медленно, в течение 18-24 ч и дает плотный мелкозернистый осадок, который при встряхивании разбивается на мелкие зерна.

2. Жгутиковую, когда происходит склеивание и оседание неподвижных, имеющих жгутики, микробов. Эта форма Н-агглютинации происходит значительно быстрее, уже через 2-4 ч, и дает рыхлый осадок, который при встряхивании легко разбивается на крупные хлопья.

Существует много вариантов постановки реакции агглютинации. Наиболее распространенными методами являются: развернутая реакция агглютинации, которая проводится в пробирках с различными разведениями сыворотки; на предметных стеклах (капельная, пластинчатая; кровяно-капельная гемагглютинация; кольцевая проба (реакция) с молоком, Роз-бенгалева проба (РБП) и др.).

Компонентами для постановки реакции агглютинации с исследуемыми сыворотками являются:

1. Исследуемая сыворотка крови.

Кровь у животных берут из яремной вены (у свиней из ушной или хвостовой, у лисиц и песцов - из бедренной вены, у норок - путем отсечения подушечки среднего пальца задней лапы или кончика хвоста) в стерильные пробирки по 5-7 мл (от пушных зверей по 1-2 мл). Пробирки нумеруют и составляют опись проб.

Сыворотки крови получают методом отстоя. Для свертывания крови и отстаивания сыворотки пробирки с кровью выдерживают 30-60 минут при 20-30 °С, сгусток крови от стенок отделяют стальной спицей, а затем пробы выдерживают при +4-10 °С. Через 20-24 ч отстоявшуюся сыворотку сливают в сухие стерильные пробирки и направляют на исследование в лабораторию в свежем или консервированном виде.

Сыворотки консервируют:

- добавлением 0,05 мл (1 капля) 5 % раствора карболовой кислоты на каждый миллилитр сыворотки при постоянном перемешивании;
- сухой борной кислотой (2-4 % к объему сыворотки) до получения насыщенного раствора и образования на дне пробирки небольшого осадка кристаллов.

Неконсервированные сыворотки пригодны для исследования в течение 6 дней со дня взятия крови с сохранением их при +4-8 °С. Сыворотки, консервированные карболовой или борной кислотой, пригодны для исследования в течение 30 дней. Мутные, проросшие, гемолизированные сыворотки исследованию не подлежат.

В зависимости от вида диагностируемой болезни для проведения реакции агглютинации, исследуемые сыворотки разводят физиологическим раствором согласно наставлению.

2. Известный антиген представляет из себя взвесь убитых, реже живых бактерий, в физиологическом растворе в определенной концентрации. Антигены изготавливают и стандартизируют на биопредприятиях.

3. Физиологический раствор, который представляет собой 0,85 % раствор поваренной соли.

Для контроля РА используют компоненты:

1. Позитивная (положительная) сыворотка, изготовленная биопредприятием или полученная от больного животного.
2. Негативная (отрицательная) - сыворотка крови здоровых животных, изготовленная биопредприятием или полученная в лаборатории.

Компонентами для постановки реакции агглютинации при определении вида микроба, с использованием известных специфических сывороток, являются:

1. Диагностические агглютинирующие сыворотки, которые получают путем гипериммунизации кроликов, реже – других животных. Им вводят подкожно 5-7 раз, а затем внутривенно в возрастающих количествах взвесь убитых, а последние три инъекции – живых микробов.

Интервалы между инъекциями колеблются от двух до пяти-семи дней. Через неделю после окончания иммунизации производят пробное взятие крови и ставят реакцию агглютинации для определения титра сыворотки. Если титр сыворотки недостаточно велик, иммунизацию продолжают. При наличии высокого титра производят массивное взятие крови или полное

обескровливание животного с целью получения сыворотки.

Диагностические наборы для проведения реакции агглютинации выпускаются биопредприятиями.

2. Исследуемый антиген, в качестве последнего используют взвесь микробов. Для этого суточную или 20 часовую изучаемую культуру на скошенном МПА смывают 5 мл 0,85 % раствора хлористого натрия и переносят в чистую пробирку.

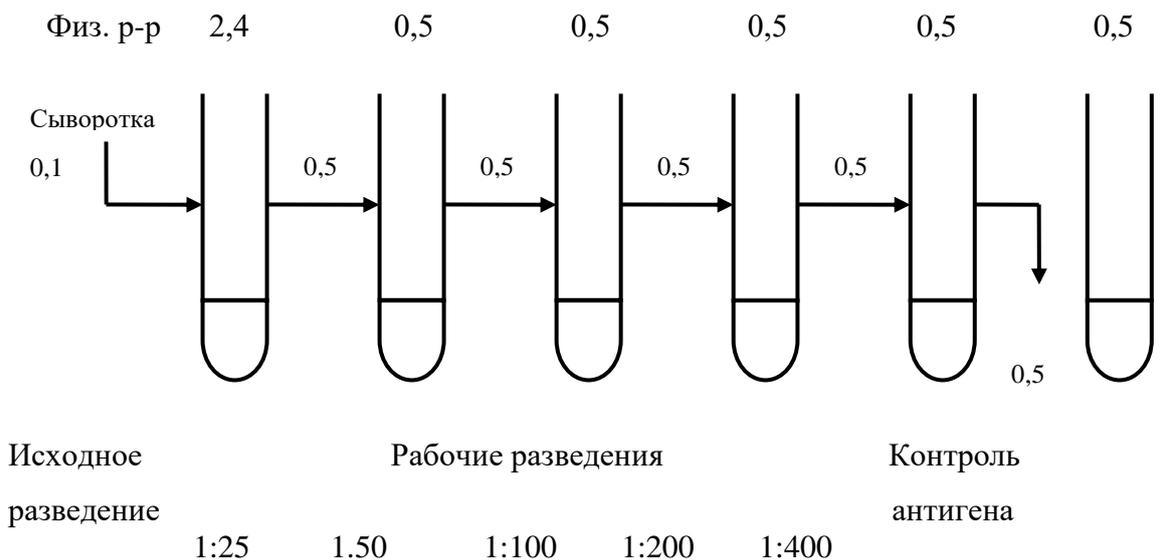
При постановке капельным методом антигеном служит микробная культура.

3. Физиологический раствор поваренной соли.

**Постановка реакции агглютинации классическим (пробирочным) методом.** В качестве примера приводим постановку РА на бруцеллез с сывороткой крупного рогатого скота.

Реакция ставится в объеме 1 мл жидкости. Розлив компонентов реакции проводят индивидуальными мерными пипетками; автоматическими пипетками Флоринского.

Для исследования каждой испытуемой сыворотки крови требуется 5 пробирок, поставленные в первый ряд. Количество таких рядов зависит от числа исследуемых сывороток. В первой пробирке каждого ряда готовят основное разведение 1:25. Для этого к 2,4 мл физиологического раствора добавляют 0,1 мл исследуемой сыворотки. Затем из первой пробирки из разведения 1:25 вносят 0,5 мл во вторую пробирку, получая разведение 1:50. Из этого разведения готовят разведение 1:100, перенося из одной пробирки 0,5 мл жидкости. Методом последовательного разведения готовят разведение 1:200 и 1:400. Из последней пробирки (1:400) излишек жидкости 0,5 мл удаляют (рисунок 2).



Во все пробирки, кроме первой, вносят по 0,5 мл антигена, разведенного 1:10

Рисунок 2 – Схема постановки реакции агглютинации пробирочным методом

Таким образом, получают ряд из четырех исследуемых пробирок с разведениями сыворотки 1:50, 1:100, 1:200, 1:400 в объеме 0,5 мл.

Во все пробирки каждого ряда, кроме первой (1:25), вносят по 0,5 мл антигена, предварительно разбавленного 1:10 физиологическим раствором. Первая пробирка с сывороткой в разведении 1:25 без антигена служит контролем качества сыворотки. При наличии хлопьев, фибрина, эритроцитов и посторонних примесей результаты агглютинации не учитываются.

При постановке РА одновременно с исследуемыми сыворотками ставят контроли:

- с негативной (отрицательной) сывороткой в тех разведениях, как с исследуемыми;
- с позитивной (положительной) сывороткой в разведениях до ее предельного титра;
- контроль антигена (0,5 мл физиологического раствора с 0,5 мл разведенного антигена) для исключения спонтанной агглютинации.

После розлива всех компонентов штативы с пробирками осторожно встряхивают и помешают в термостат при 37-38 °С на 16-20 ч, затем

выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч и проводят учет реакции.

Результаты реакции учитывают визуально и определяют ее степень в плюсах по следующей схеме:

(++++) – полное просветление жидкости, на дне осадок в виде «зонтика», при легком встряхивании осадок разбивается на мелкие зерна, а жидкость остается прозрачной (100 % агглютинация);

(+++) – неполное просветление жидкости, «зонтик» хорошо выражен, при встряхивании - мелкие зерна (75 % агглютинация);

(++) – незначительное просветление жидкости, «зонтик» умеренно выражен, при встряхивании мелкие зерна (50 % агглютинация);

(+) – едва заметное просветление жидкости, «зонтик» выражен слабо, при встряхивании заметно небольшое количество зерен (25 % агглютинация);

(-) – просветление жидкости, образования «зонтика» не наступило, на дне пробирки видна «пуговка» осевших микробов, при легком встряхивании образуется взвесь.

За положительный титр антител принимают последнее разведение сыворотки, в котором произошла агглютинация не менее чем на два плюса (++).

Реакцию считают положительной при наличии агглютинации с сывороткой крупного рогатого скота с оценкой не менее чем два плюса (++) в разведении 1:100 и выше.

Реакцию считают сомнительной при наличии агглютинации только в разведении 1:50 с сыворотками крупного рогатого скота с оценкой не менее чем на два (++).

Для определения природы антител в исследуемом материале предложено несколько модификаций проведения реакции агглютинации.

#### **Другие модификации постановки реакции.**

##### **Кольцевая реакция с молоком (КР)**

Применяется КР с целью проверки благополучия стад на бруцеллез

крупного рогатого скота и для проверки молока при продаже его на рынках.

Компонентами реакции являются:

- исследуемое молоко;
- антиген цветной бруцеллезный для кольцевой реакции с молоком, который представляет собой стандартизованную взвесь убитых бруцелл, окрашенных гематоксилином в синий цвет;
- сыворотка позитивная бруцеллезная. В агглютинационные пробирки берут по 2 мл молока и добавляют по 0,1 мл антигена, затем пробирки тщательно встряхивают для перемешивания молока с антигеном.

При каждой постановке реакции, одновременно с испытуемыми пробами молока, ставят контроли с молоком от заведомо здоровой коровы; со смесью молока здоровой коровы и позитивной бруцеллезной сыворотки (0,05 мл сыворотки на 1 мл молока). Штативы с испытуемыми и контрольными пробами молока помещают в водяную баню или термостат при 37-38 °С на 1 час. Если в молоке имеются бруцеллезные антитела, то они образуют с антигеном комплекс, который адсорбируется на капельках жира и при отстаивании всплывает вверх, образуя синее кольцо (остальная часть молока остается белой) - реакция положительная.

При отрицательной реакции столбик молока остается равномерно окрашенным в первоначальный синий цвет, который был получен сразу после добавления к нему антигена, а слой сливок - белого или слегка желтоватого цвета (рисунок 3).



Рисунок 3 — Реакция агглютинации на предметном стекле: а - положительная; б – отрицательная

При получении положительного или сомнительного результата КР от всех животных берут кровь для исследования на бруцеллез в РБП или РА в

РСК (РДСК), проводят эпизоотологическое обследование хозяйства, клинический осмотр и исследование животных на заболевание маститами.

Капельный метод РА применяют в основном для идентификации культур бактерий, а также для установления их принадлежности к определенным серогруппам и серовариантам. Так поступают при диагностике колибактериоза и сальмонеллезов. Техника постановки РА сводится к следующему. На предметное стекло наносят каплю сыворотки и каплю физиологического раствора (контроль). Петлю с бактериальной культурой увлажняют в капле сыворотки, затем культуру тщательно растирают рядом с каплей, смешивают с сывороткой и энергично 6-10 раз покачивают стекло круговыми движениями. Агглютинация наступает сразу или не позднее 1-2 минут. Реакцию агглютинации учитывают при хорошем освещении. Пользование лупой облегчает учет реакции.

Агглютинация проявляется в виде склеивания бактериальной массы и полного или частичного просветления жидкости.

При отрицательной реакции культура после тщательного смешивания с каплей сыворотки образует гомогенную взвесь. То же самое должно быть при проведении контроля (антиген + физиологический раствор).

#### Роз-бенгал проба (РБП)

Пластинчатую реакцию агглютинации с бруцеллезным роз-бенгал антигеном применяют для исследования сывороток крови при диагностике бруцеллеза у многих видов животных.

Компонентами РБП являются:

- испытуемые сыворотки крови;
- бруцеллезный антиген для РБП, изготавливаемый на биопредприятиях, представляет собой стандартизованную суспензию в буферном растворе инактивированных нагреванием и фенолом бруцелл, окрашенных бенгальским розовым в розовый цвет;
- позитивная бруцеллезная и негативная сыворотки;
- 0,5 % карболизированный физиологический раствор.

Реакцию проводят на чистых сухих эмалированных пластинках с лунками при температуре 18-30 °С.

Исследуемые сыворотки крови в дозе 0,03 мл вносят на дно лунки. При исследовании сывороток крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов, свиней в каждую лунку рядом с сывороткой вносят 0,03 мл антигена, а при исследовании сывороток других животных 0,015 мл, тщательно смешивают покачиванием и легким вращением в течение 4 мин. Одновременно проводят контроли антигена с позитивной и негативной сыворотками, с физраствором.

Реакцию считают положительной при выраженной агглютинации окрашенных бруцелл в виде мелких или крупных хлопьев розового цвета, выделяющихся на белом фоне лунки. Реакцию считают отрицательной при отсутствии агглютинации (смесь гомогенна, равномерно окрашена).

#### Реакция гемагглютинации (РГА)

Эта реакция не относится к реакциям иммунитета, так как является результатом действия естественных гемагглютининов некоторых бактерий и вирусов на эритроциты, что влечет за собой их агглютинацию.

Реакцию ставят на плексигласовых панелях с лунками. Исследуемый материал разводят физраствором и к этим разведениям добавляют равный объем 1-2 % взвеси эритроцитов, после чего панели с реакцией помещают в термостат на 30 минут или оставляют при комнатной температуре на 1 ч.

Учет реакции производят по характеру осадка. При положительной реакции осадок из склеившихся эритроцитов имеет форму раскрытого «зонтика» с изрезанными краями, а при отрицательной – компактный диск в виде «кнопки» с ровными краями.

Реакция гемагглютинации позволяет только выявить гемагглютинирующую способность бактерий и вирусов.

Для идентификации этих микроорганизмов в дальнейшем используют реакцию торможения гемагглютинации.

#### Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

РТГА – иммунная реакция, в которой специфические антитела,

взаимодействуя с антигеном, лишают его способности агглютинировать эритроциты.

Реакция проводится в два этапа. На первом этапе разводят специфическую сыворотку от 1:10 до 1:1280. К каждому разведению сыворотки добавляют равный объем жидкости, содержащий антиген в четырехкратном титре, который определен в РГА. Если титр антигена равен 1:640, агглютинируют эритроциты, делают разведение в 4 раза концентрированное – 1:160.

После инкубирования при 37 °С в течение 30 минут, на втором этапе к этой смеси добавляют равный объем 1-2 % взвеси эритроцитов. Если сыворотки и антигена взято по 0,25 мл, то эритроцитов добавляют 0,5 мл.

Контролем является проба, где сыворотка заменена физраствором. Реакция читается после выдерживания в течение 30 минут в термостате или 45 минут при комнатной температуре. При положительной РТГА образуется плотный осадок эритроцитов (задержка реакции) на дне пробирки, имеющих вид «пуговики» диска.

При отрицательной РТГА отмечается выраженная гемагглютинация в виде «зонтика».

Реакция используется для идентификации и типизации выделенного антигена, титрования вирусосодержащих жидкостей и материалов и серологической диагностики вирусных инфекций.

#### Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации (РНГА)

Сущность этой реакции заключается в том, что на поверхность эритроцитов адсорбируют или антиген, или антитела (иммуноглобулины), которые приобретают способность агглютинироваться в присутствии специфических антител или антигена.

Главные достоинства РНГА – высокая чувствительность и специфичность, техническая простота, стабильность используемых компонентов.

РНГА применяют при диагностике инфекционных болезней:

- 1) для обнаружения титра антител в исследуемой сыворотке крови с помощью известного эритроцитарного антигенного диагностикума;
- 2) для идентификации неизвестного антигена с помощью известного иммуноглобулинового эритроцитарного диагностикума.

Учет РНГА проводится так же, как и при постановке РГА.

### **38. Реакция связывания комплемента (РСК)**

РСК, как и все серологические реакции, может быть использована в следующих направлениях:

- 1) для выявления специфических антител в сыворотке крови больных животных, с включением в реакцию известного антигена, при диагностике бруцеллеза, сапа, листериоза, лептоспироза и др.;

- 2) для определения в исследуемом материале специфического антигена, с использованием известных иммунных сывороток, при диагностике ящура и установления его серотипов и др.

Сущность РСК заключается в том, что при взаимодействии антитела со специфическим для него антигеном, происходит процесс связывания комплемента на этом комплексе. Этот процесс не проявляется визуально. Для выявления связывания комплемента, к смеси, состоящей из антигена, антитела и комплемента, вводится гемолитическая система, состоящая из гемолитической сыворотки (гемолизина) и эритроцитов барана.

Происходит полное связывание комплемента; если взятые для исследования антиген и антитело специфичны, гемолиз не происходит. На дне пробирки, после инкубации в течение 20 мин при 37 °С, и последующем выдерживании смеси в течение 20-24 ч при комнатной температуре, образуется осадок негемолизированных эритроцитов. Если же антиген и антитело неспецифичны и не образуют комплекса, связывающего комплемент, последний остается в свободном состоянии и связывается в гемолитической системе, вследствие чего наступает гемолиз эритроцитов.

Исследуемая смесь приобретает красный лаковый цвет. РСК, как и другие реакции иммунитета, протекает при строгих количественных соотношениях, взятых в опыт компонентов, и точно оттитрованных количествах комплемента, гемолитической сыворотки, антигена и антител (рисунок 4).

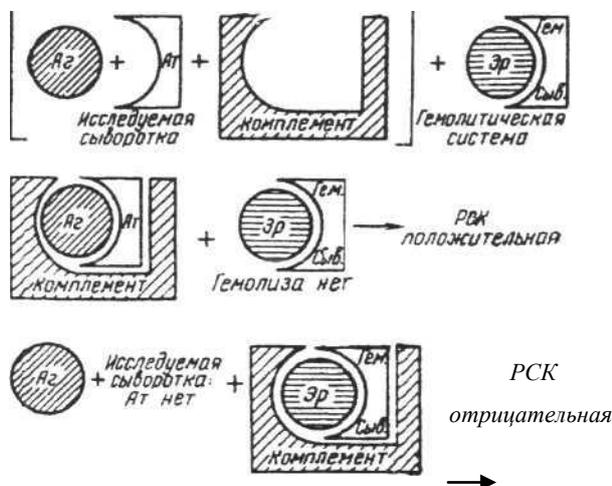


Рисунок 4 – Схема реакции связывания комплемента (Аг - антиген; Ат – антитело; Эр - эритроциты; Гем. сыв. – гемолитическая сыворотка)

Существуют различные модификации реакции связывания комплемента Мы представляем методику постановки РСК при диагностике бруцеллеза. Реакция проходит в водяной бане при 37-38 °С в объеме 1 мл (по 0,2 мл каждого компонента – сыворотки, антигена, комплемента, гемолизина и эритроцитов).

При диагностике сапа и других болезней РСК ставится в объеме 2,5 мл, каждый из компонентов, входящих в реакцию, берется в объеме 0,5 мл.

До проведения главного опыта РСК, определяют качество и проводят титрацию всех компонентов, входящих в реакцию.

1. Исследуемые сыворотки и контрольные (позитивная и негативная) разводят физраствором 1:5 или 1:10 и прогревают в водяной бане в течение 30 мин при 56-58 °С для разрушения собственного комплемента.

2. Антиген бруцеллезный единый для РА, РСК, РДСК, изготовляемый на биофабрике, представляет собой гомогенную взвесь инактивированных

нагреванием и карболовой кислотой бруцелл в физиологическом растворе.

3. Комплемент - вещество белковой природы, быстро инактивируется при нагревании, под действием света, слабыми растворами щелочей и кислот и др. Комплемент – компонент свежей сыворотки крови всех видов животных, очень легко разрушающийся.

В наибольшем и в более постоянном количестве комплемент содержится в сыворотке крови морских свинок, поэтому ее используют в РСК. Кровь у морской свинки берут пункцией из сердца. Взятую в стерильную пробирку кровь ставят на 15-20 минут в термостат, затем кровяной сгусток отделяют стеклянной палочкой от стенки пробирки, оставляют в покое на 15-20 минут. Сыворотку отсасывают, переносят в чистую пробирку и хранят в холодильнике.

В настоящее время биопредприятия выпускают комплемент в лиофилизированном виде.

Для реакции комплемент разводят в физрастворе и определяют его активность.

4. Эритроциты барана. Кровь от барана (овцы) берут из яремной вены с соблюдением правил асептики в сосуд с бусами (стеклянными или фарфоровыми), закрытый ватной пробкой и дефибринируют продолжительным встряхиванием.

Полученную кровь центрифугируют при 1500-2000 об/мин, после чего надосадочную жидкость из центрифужной пробирки удаляют, а оставшуюся эритроцитарную массу ресуспензируют в физрастворе и вновь центрифугируют. Эти операции продолжают до тех пор, пока жидкость над эритроцитами становится прозрачной. Отмытые эритроциты разводят для реакции физраствором 1: 40, т.е. получают 2,5 % взвесь эритроцитов.

5. Гемолитическая сыворотка (гемолизин). Получают на биопредприятиях путем гипериммунизации кроликов 25 или 50 % взвесью эритроцитов в физрастворе. Взвесь эритроцитов вводят кроликам внутривенно 4-5 раз с 3-4 дневными интервалами. Через 7 дней после

последнего введения у кроликов берут кровь. Полученную сыворотку инактивируют 30 мин при 56-58 °С для разрушения кроличьего компонента. Гемолизин консервируют глицерином 1:1 или 0,5 % фенолом и разливают по ампулам.

В реакции используют компоненты, не обладающие антикомплементарными и гемотоксическими свойствами (таблица 10).

Таблица 10 – Проверка компонентов на антикомплементарность и гемо-токсичность по следующей схеме:

Компоненты	Антикомплементарность	Гемотоксичность			
		Комплемента	гемолизина	антигена	физиологического раствора
Комплемент в разведении 1:20	0,2	0,2	-	-	-
Гемолизин в рабочем титре	0,2	-	0,2	-	-
Антиген в рабочем титре	0,4	-	-	0,4	-
Эритроциты (2,5%-ная взвесь)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	-	0,6	0,6	0,4	0,8

Водяная баня - 10 минут при 37-38 °С.

Результат: Гемолиз. Полная задержка гемолиза.

Титрование гемолизина проводят периодически один раз в 3 месяца при использовании каждой новой серии.

Для титрации гемолизина готовят разведения от 1:500 до 1:4000 по схеме (таблица 11).

Таблица 11 – Титрование гемолитина

Основные разведения гемолитина 1:100, мл	Физиологический раствор, мл	Получаемые разведения
0,4	1,6	1:500
0,1	0,9	1:1000
0,1	1,4	1:1500
0,1	1,9	1:2000
0,1	2,4	1:2500
0,1	2,9	1:3000
0,1	3,4	1:3500
0,1	3,9	1:4000

После приготовления разведений гемолитина приступают к его титрованию по схеме (таблица 12).

Таблица 12 – Схема титрования гемолитина

Компоненты	Разведение гемолитина						
	1:500	1:1000	1:2000	1:2500	1:3000	1:3500	1:4000
Гемолитин	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент (1:20)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Эритроциты (2,5%-ная взвесь)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физраствор	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 10 мин при 37-38 <sup>0</sup> С							
Примерный результат	ПГ	ПГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ЧГ

Примечание: ПГ - полный гемолиз; ЧГ - частичный гемолиз

После разлива комплемента в первый ряд пробирок с каждой сыворотки вносят по 0,2 мл антигена в рабочем разведении, а во второй ряд по 0,2 мл физраствора. Пробирки помещают в водяную баню при 37-38<sup>0</sup>С на 20 минут. Затем во все пробирки добавляют по 0,4 мл гемолитической системы, встряхивают их, вновь ставят в водяную баню при 37-38<sup>0</sup>С на 20

минут.

Для приготовления гемолитической системы берется гемолитическая сыворотка в рабочем титре и эритроциты барана в разведении 1:40 в равных частях.

После водяной бани учитывается результат.

Титром гемолизина считают наименьшее его количество, необходимое для полного гемолиза в течение 10 мин при 37-38 °С 0,2 мл взвеси эритроцитов в присутствии 0,2 мл комплемента, разведенного 1:20. В приведенной таблице титр гемолизина равен 1:1500. Рабочий титр гемолизина для РСК должен быть в два раза выше. Так, если титр гемолизина равен 1:1500, то рабочий титр в РСК будет 1:750.

#### Титрование комплемента в гемолитической системе

Комплемент титруют в разведении 1:20 в дозах от 0,02 до 0,2 мл с интервалами в дозах по 0,02 мл. После внесения комплемента в каждую пробирку добавляют недостающее до 0,2 мл количество физиологического раствора и остальные компоненты по схеме, как указано в таблице.

Титром комплемента в гемолитической системе считают наименьшее его количество, вызывающее полный гемолиз эритроцитов в течение 10 мин в водяной бане при 37-38 °С. В примере, приведенном в таблице, титр комплемента в гемолитической системе равен 0,08.

Таблица 13

#### Схема титрования комплемента в гемолитической системе

Компоненты	Номера пробирок									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Комплемент в разведении 1:20	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Физиологический раствор	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	-
Гемолизин в удвоенном титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
2,5 % взвесь эритроцитов барана	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Водяная баня 10 мин при 37-38° С										
Примерный результат	ЧГ	ЧГ	ЧГ	ПГ						

### 3. Титрование комплемента в бактериологической системе.

Перед постановкой главного опыта РСК проводят титрование комплемента в бактериологической системе с позитивной (бруцеллезной) сывороткой, негативной сывороткой крови того вида животных, которых исследуют, и одной сыворотке, взятой из исследуемой партии. Каждую сыворотку разводят 1:5 физраствором (1 мл сыворотки + 4 мл физраствора) и инактивируют.

Сыворотку разливают по 0,2 мл в два ряда, в каждом из которых по 10 пробирок. Затем в пробирки каждого ряда вносят комплемент (в разведении 1:20) в возрастающих дозах от 0,02 мл до 0,2 мл с интервалом 0,02 мл и недостающее до 0,2 мл (в каждой пробирке) количество физраствора.

Точно так же по такой же схеме проводят титрование комплемента в бактериологической системе с использованием позитивной и с одной из исследуемых сывороток. Титром комплемента в бактериологической системе считают минимальное его количество в разведении 1:20, вызывающее полный гемолиз взвеси эритроцитов в разведении 1:40 в пробирках с негативной и исследуемой сыворотками, с антигеном и без антигена, а также в пробирках с позитивной сывороткой без антигена в течение 20 мин в водяной бане при 37-38 °С, при задержке гемолиза в пробирках с бруцеллезной сывороткой и антигеном. Определение титра комплемента в бактериологической системе проводят согласно схеме (таблица 14).

Таблица 14 – Схема титрования комплемента в бактериологической системе

Компоненты	Ряд Пробирок	Номера пробирок									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Негативная сыворотка 1:5	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Антиген в рабочем Титре	1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Физраствор	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент в разведении 1:20	1	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
	2	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20
Недостающее количество физраствора	1	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	-
	2	0,18	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,02	-
Водяная баня 20 мин при 37-38 <sup>0</sup> С											
Гемолитическая система	1	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
	2	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Водяная баня 20 мин при 37-38 <sup>0</sup> С											
Примерный результат	1	НГ	НГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ
	2	НГ	НГ	ЧГ	ЧГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ	ПГ

Примечание: ПГ – полный гемолиз; ЧГ – частичный гемолиз; НГ – нет гемолиза.

=

Таблица 15 – Схема определения титра комплемента

Сыворотки	Ряд пробирок	Номера пробирок и дозы комплемента, мл									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Позитивная	1	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	2	++++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
Негативная	1	++++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
	2	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
Исследуемая	1	++++	++++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
	2	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-

В приведенном примере титр комплемента в этой системе равен 0,10 мл. Рабочий титр комплемента для главного опыта на 0,02 мл больше в данном случае 0,12 мл. (таблица 15).

Расчет количества неразведенного комплемента, необходимого для главного опыта, делают по формуле

$$x = AB : 20,$$

где  $x$  – количество неразведенного комплемента;  $A$  – рабочий титр комплемента;  $B$  – количество пробирок в опыте; 20 – основное разведение комплемента (1:20).

*Пример:*  $x = (0,12 \cdot 100) : 20 = 0,6$ . Так как количество комплемента в рабочем разведении, требующееся для всей реакции (в данном примере 100 пробирок), равно 20 мл ( $0,2 \times 100$ ), то к 0,6 мл неразведенного комплемента следует добавить 19,4 мл физраствора.

### **Главный опыт РСК**

При массовых исследованиях реакцию проводят в одной пробирке в разведении сыворотки 1:5 с антигеном, при повторном исследовании в разведениях одной сыворотки 1:5 без антигена, 1:5 и 1:10 с антигеном.

При исследовании в одной пробирке берут 0,04 мл исследуемой сыворотки и добавляют 0,4 мл физраствора (разведение 1:5).

При постановке реакции в трех пробирках в первую наливают 0,1 мл исследуемой сыворотки и добавляют 0,4 мл физраствора (разведение 1:5). Из первой пробирки 0,2 мл переносят во вторую и 0,1 мл - в третью, в которую затем добавляют 0,1 мл физраствора (разведение 1:10).

Реакцию ставят по схеме главного опыта (таблица 16). Главный опыт сопровождается следующими контролями:

- негативная и бруцеллезная сыворотки в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном, и 1:5 без антигена (по схеме главного опыта);
- гемолитическая система (0,6 мл физраствора и 0,4 мл гемолитической

системы).

Учет результатов РСК проводят визуально. При постановке реакций в одной пробирке (при массовом исследовании) учет проводят один раз – сразу после извлечения штативов из водяной бани; при исследовании в трех пробирках – через 3-4 ч. когда в контрольных пробах с позитивной сывороткой эритроциты осядут на дно пробирки, или на следующий день (пробирки с реакцией хранят в холодильнике).

Таблица 16 – Схема главного опыта РСК

Компоненты	При массовом исследовании		Для повторного исследования			
	пробирки с исследуемыми сыворотками	контроль гемолитической системы	Пробирки для каждой исследуемой сыворотки			контроль гемолитической системы
			1	2	3	
Исследуемая сыворотка	0,04	–	0,04	0,04	0,02	-
Физраствор	0,16	0,6	0,36	0,16	0,18	0,6
Инактивирование сывороток						
Антиген в рабочем титре	0,2	-	-	0,2	0,2	-
Комплемент в рабочем разведении	0,2	-	0,2	0,2	0,2	-
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 20 мин при 37-38 °С						

Результаты реакции оценивают в плюсах по следующей схеме:

(++++) – отсутствие гемолиза, надосадочная жидкость прозрачная и бесцветная;

(+++) – гемолиз 25 % эритроцитов;

(++) – гемолиз 50 % эритроцитов;

(+) – гемолиз 75 % эритроцитов;

(-) – полный гемолиз эритроцитов, осадок отсутствует, жидкость

интенсивно окрашена гемоглобином.

Степень задержки гемолиза эритроцитов определяют по шкале, которую готовят перед учетом реакции. Для этого из реакции выбирают 5 пробирок с полным гемолизом и жидкость из них сливают в одну. Из этой жидкости готовят разведения с меньшим процентом гемолиза по схеме (таблица 17).

Таблица 17 – Степень задержки гемолиза эритроцитов

Компоненты	Номера пробирок				
	1	2	3	4	5
Гемолизирующая жидкость	1,0	0,75	0,5	0,25	-
Физиологический раствор	-	0,25	0,5	0,75	1,0
	100	75	50	25	0

Степень гемолиза в пробирках с исследуемыми сыворотками определяют путем сравнения со степенью гемолиза в пробирках шкалы, процент гемолиза выражают в плюсах.

Диагностическая оценка. При исследовании сывороток в одной пробирке (в разведении 1:5 с антигеном) все сыворотки, давшие задержку гемолиза на один плюс и выше, исследуют повторно в тот же или на другой день в трех пробирках в разведениях 1:5 и 1:10 с антигеном, и 1:5 без антигена.

Реакцию считают положительной при задержке на два-четыре плюса в одном или двух разведениях сыворотки (1:5 или 1:10), и полном гемолизе эритроцитов в контрольной пробирке (без антигена); сомнительной – при задержке гемолиза с оценкой один плюс. При получении сомнительного результата, сыворотки крови от животных через 15-20 дней исследуют повторно. При этом животных, с сывороткой крови которых получена дважды сомнительная реакция, считают реагирующими положительно.

### Реакция длительного связывания комплемента (РДСК)

Эту реакцию, как более чувствительную, применяют вместо РСК при исследовании на бруцеллез, туберкулез, кампилобактериоз. Основные принципы постановки РДСК от РСК мало чем отличаются друг от друга.

Особенность этой реакции заключается в том, что при постановке главного опыта бактериолитическую систему выдерживают при трех температурных режимах: 1) при комнатной температуре 15 минут; 2) при 4 °С в холодильнике - 18-20 ч; 3) на водяной бане 37-38 °С - 15 минут.

После добавления компонентов, входящих в гемолитическую систему, пробирки с реакцией помещают в водяную баню при 37-38 °С на 10 минут.

Результаты РДСК учитывают точно так же, как и при РСК.

### **39. Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)**

Среди методов диагностики бактериальных и вирусных инфекций особое место занимает люминесцентная (флуоресцентная) микроскопия. Повышенная чувствительность, цветное изображение на темном нефлуоресцирующем фоне, возможность обнаружения некоторых микроорганизмов, простота и надежность флуорохромирования – ценные качества этого вида микроскопии.

Особое значение люминесцентная микроскопия имеет при экспресс-диагностике инфекционных болезней, при экспресс-индикации возбудителя во внешней среде. Результаты люминесцентной микроскопии являются довольно специфичными и высоко точными. По данным ряда авторов, этот метод не уступает по показателям данным биопробы и другим методам, однако для люминесцентной микроскопии нужно иметь высококачественные специфические флуоресцирующие сыворотки и специальные краски – флуорохромы. Люминесцентная микроскопия в последние годы находит все большее применение. Так, диагностика инфекционных болезней классическим методом биопробы осуществляется в пределах от 5-9 до 30

суток, а люминесцентным методом достигается за период от 30 минут до 5-6 часов, т.е. во много раз быстрее, чем классическим методом биопробы.

Первый люминесцентный микроскоп был предложен австрийскими учеными Келером и Зидентонфом в 1908 г. Большой вклад в дело создания люминесцентных микроскопов внес академик С.И. Вавилов и его школа.

Люминесцентная микроскопия основана на способности многих веществ биологического происхождения и красителей светиться под воздействием падающего на них света. Молекулы веществ, способных к люминесценции, поглощают энергию падающего на них света и переходят в возбужденное состояние, которое характеризуется более высоким энергетическим уровнем. В таком состоянии они находятся непродолжительное время и вновь возвращаются к исходному энергетическому уровню. Этот период сопровождается отдачей избытка энергии в виде света – люминесценцией. Как правило, для возбуждения люминесценции объект освещают ультрафиолетовыми лучами длиной волны 300-400 нм или сине-фиолетовыми лучами длиной волны 400-460 нм.

Ряд веществ биологического происхождения – хлорофилл, витамин В<sub>2</sub>, алкалоиды, некоторые антибиотики и другие соединения обладают собственной (первичной) люминесценцией. В зависимости от содержания таких веществ в клетке, некоторым дрожжам и бактериям также свойственна первичная люминесценция. Однако, клетки большинства микроорганизмов люминесцируют очень слабо, поэтому их обрабатывают специальными красителями – флюорохромами. Такая наведенная люминесценция называется вторичной.

Люминесцентные микроскопы и люминесцентные устройства, как правило, состоят из трех основных частей: 1) мощный источник света; 2) осветительное устройство и 3) микроскоп. Источником света служат ртутно-кварцевые лампы сверхвысокого давления. Главной составной частью осветительного устройства является система светофильтров, позволяющая выделить из источника света нужные части спектра для возбуждения

люминесценции (ультрафиолетовые, синие, фиолетовые лучи). Микроскоп состоит из тех же составных частей, что и обычный биологический микроскоп.

При люминесцентной микроскопии исследуемые объекты (микроорганизмы) видны потому, что они становятся светящимися, а при световой микроскопии мы видим объекты в результате отражения, преломления света.

В настоящее время выпускаются различные люминесцентные микроскопы - МЛ-1, МЛ-2, МЛ-3, МЛ-4, ЛюМММ, а также люминесцентные устройства, которые монтируются на обычный световой микроскоп, такие, как ОИ-17, ОИ-28.И др. Для иммерсионной микроскопии при люминесцентном исследовании используют специальное нефлюоресцирующее масло, заменяют его диметиловым эфиром фталиевой кислоты, или просто дистиллированную воду.

Для получения эффекта вторичной люминесценции используют: 1) метод простого флюорохромирования (МФ) и 2) методы флюоресцирующих антител (МФА, иммунофлюоресценция).

Метод флюорохромирования. По технике выполнения этот метод не отличается от методов обычной окраски мазков, применяемых при световой бактериоскопии. Для этих целей используют краски, которые светятся в момент облучения их ультрафиолетовыми лучами. Такие краски называются флюорохромами, а окраска ими – метод флюорохромирования. К флюорохромам относятся такие красители, как акридин оранжевый, акридин желтый, аурамин, флюоресцеин, нейтральный красный, риванол и др. Продается специальный «Набор красителей для флюоресцентной микроскопии», содержащий 20 красителей. Флюорохромы растворяют в дистиллированной воде (1:500-1:100000), такие растворы малотоксичны, что дает возможность изучать живую клетку (микроорганизмы).

Препарат для метода простого флюорохромирования можно готовить двумя способами:

а) на свежий мазок-отпечаток (из органов, соскобов со слизистых оболочек) или суспензии инфицированных клеток наносят 1-2 капли рабочего раствора (1:10000) акридинового оранжевого, накрывают покровным стеклом. Приготовленный таким образом свежий (в течение 10-20 мин после его приготовления) препарат рассматривают в люминесцентном микроскопе;

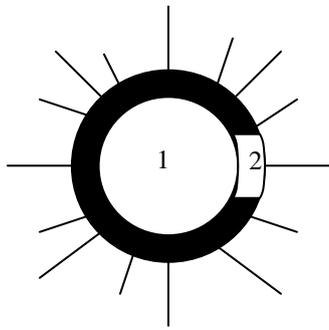
б) мазки-отпечатки, полученные из патологического материала, или инфицированные культуры клеток (на предметных стеклах), фиксируют 96°-ным этиловым спиртом в течение 15-30 мин, промывают дистиллированной водой, наносят на препарат 1-2 капли раствора акридинового оранжевого (1:10000), через 5-10 мин покрывают покровным стеклом и исследуют.

В препаратах ДНК-содержащих вирусов, например аденовируса, вирусный материал светится зеленоватым цветом в ядре в виде гранул различной величины. При наличии в препарате РНК-содержащего вируса, например вируса гриппа, вирусный материал обнаруживается в виде ярко-красных гранул в цитоплазме клеток.

Методы флюоресцирующих антител (МФА). Эти методы основаны на принципе специфического взаимодействия антигена со специфическими антителами, но антитела здесь применяются меченые, т.е. предварительно окрашенные флюорохромом. Эти методы являются по своей сущности разновидностью серологических реакций, но ставятся они на предметном стекле (в мазке).

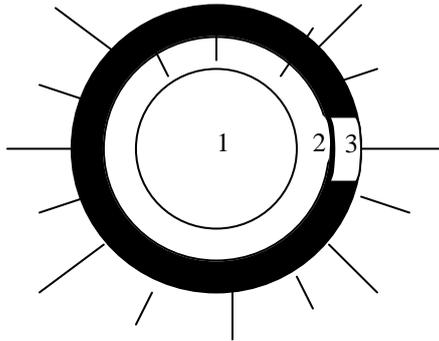
В настоящее время налажено производство флюоресцирующих сывороток и гаммаглобулинов централизованным путем. Выпускаются они в сухом виде в ампулах с приложением на каждую упаковку инструкции по применению и с указанием титра сывороток.

МФА можно разделить на две разновидности (рисунок 5): 1) прямой метод; 2) непрямые методы - а) с использованием антивидовой флюоресцирующей сыворотки и б) с использованием антикомплементарной флюоресцирующей сыворотки.



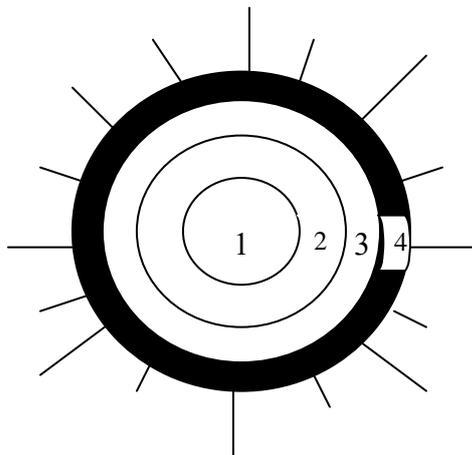
#### **А. Прямой метод**

1. Исследуемый антиген (мазок)
2. Меченые специфическая сыворотка или  $\gamma$ -глобулин



#### **Б. Непрямые методы**

1. Исследуемый антиген (мазок)
2. Немеченые специфическая сыворотка или  $\gamma$ -глобулин
3. Меченая антивидовая сыворотка



1. Исследуемый антиген (мазок)
2. Немеченые специфическая сыворотка или  $\gamma$ -глобулин
3. Комплемент
4. Меченая антивидовая сыворотка

Рисунок 5 – Схема прямого и непрямого методов флюоресцирующих антител (реакция иммунофлюоресценции)

*Прямой метод флюоресцирующих антител.* Этот метод технически наиболее прост и более специфичен по результативности. Сущность метода

заключается в том, что на предметное стекло с фиксированным на нем мазком физическим или химическим способом, содержащим антиген, наносят небольшое количество (2-3 капли) меченой сыворотки или глобулинов в рабочем титре, и выдерживают во влажной камере в термостате 30-40 мин, а затем мазок промывают каким-либо буферным раствором и дистиллированной водой (можно только дистиллированной водой). Высушивают мазки на воздухе или в термостате и просматривают под иммерсионной системой. Если антиген и антитела специфичны, то на темном фоне будет отчетливо видно салатово-зеленое свечение антител, адсорбированных на антигенах. Если же антитела были неспецифичны антигену (или антигена в мазке было мало), то свечение отсутствует, так как антитела удаляются с препарата при промывании водой.

К недостаткам прямого метода следует отнести то, что при этом в лаборатории нужно иметь на каждое инфекционное заболевание специфическую флуоресцирующую сыворотку (или глобулин), а они сравнительно дорогие и имеют небольшой срок хранения.

Непрямые методы флуоресцирующих антител. Называются они так потому, что флуоресцирующая сыворотка (антитело) при этих методах адсорбируется не на сам антиген, а на посредника (на специфическое неокрашенное антитело или на комплемент, которые являются для флуоресцирующих антител антигеном).

Непрямой метод с использованием антивидовой флуоресцирующей сыворотки. Сущность и техника этого метода заключается в том, что на фиксированный мазок сначала наносят специфическую для предполагаемого в мазке антигена иммунную сыворотку или глобулин, и выдерживают во влажной камере при 37 °С 30-40 минут. Затем мазок осторожно промывают фосфатным буфером или просто дистиллированной водой. Если в мазке имеется антиген, то образуется комплекс «антиген-антитело», который при промывании мазка не смывается. Однако полученный комплекс невидим, чтобы его обнаружить в люминесцентном микроскопе, мазок дополнительно

обрабатывают флюоресцирующей антивидовой сывороткой или глобулинами (Антивидовые сыворотки или глобулины получают путем гипериммунизации кролика [или других видов животных] сывороткой или глобулинами того вида животного, на которое получают специфическую видовую сыворотку). Для этого на мазок наносят антивидовую флюоресцирующую сыворотку и снова контактируют во влажной камере при 36-37 °С 30-40 минут. Затем мазок промывают и высушивают на воздухе. В результате антивидовая сыворотка адсорбируется на комплекс «антиген+антитело» и, поскольку антивидовая сыворотка или глобулины флюорохромированы, образовавшийся комплекс «антиген+антитело+антивидовое антитело» светится салатово-зеленоватым цветом.

Если же в первой стадии компоненты были неспецифичны или в мазке было мало антигена, комплекс «антиген+антитело» не образуется, и антивидовые антитела не свяжутся, при промывании мазка смоются с него и поэтому свечения не будет.

Непрямой метод, с использованием антикомплементарной флюоресцирующей сыворотки, по своей сущности и технике является разновидностью РСК, но ставится на предметном стекле, и роль гемолитической системы выполняет флюоресцирующая антикомплементарная сыворотка.

Для подтверждения специфичности результатов РИФ необходимы следующие контроли. Для прямого варианта проводят окраску гомогенных и гетерогенных в антигенном отношении микроорганизмов люминесцирующей сывороткой. Свечение бактерий должно быть в первом случае и отсутствовать во втором.

Для непрямого метода мазки, содержащие гомологичные и гетерологичные в антигенном отношении микроорганизмы, обрабатывают люминесцирующей сывороткой. Бактериальные клетки не должны светиться. Мазки с гомологичными и гетерологичными бактериями обрабатывают иммунной (антимикробной) сывороткой (1 этап), с последующим нанесением

флюоресцирующей антиглобулиновой сыворотки (2 этап). Специфическое свечение бактерий должно быть в первом случае и отсутствовать во втором.

Интенсивность свечения оценивается по четырехкрестовой системе: ++++ – очень яркая флюоресценция по периферии микробной клетки; +++ – яркая флюоресценция периферии клетки; ++ – слабое свечение периферии клетки; + – нет контрастного свечения периферии и тела микробной клетки. Реакцию иммунофлюоресценции засчитывают, если специфическое свечение микробных клеток на четыре или на три креста.

Таблица 18 – Схема обработки мазка флюоресцирующими сыворотками

Прямой метод				
1	2		3	
Изготовление, сушка. Фиксация	Нанесение флюоресцирующей сыворотки на мазок (3-15 мин во влажной камере при 37 °С)		Отмывка сыворотки физ. раствором (5-10 мин)	
Непрямой метод				
1	2	3	4	5
Изготовление, сушка, фиксация	Нанесение специфической сыворотки на мазок (3-15 мин)	Отмывка Сыворотки физ. раствором (5-10 мин)	Нанесение Специфической меченой сыворотки на мазок (3-15 мин) во влажной камере	Отмывка сыворотки физ. раствором

#### 40. Иммуноферментный метод диагностики инфекционных болезней

Иммуноферментный метод основан на взаимодействии антигена и антитела, где в качестве метки в конъюгате (комплекс антитела или антигена с ферментом) используется фермент пероксидаза или другая соответствующая к ним субстратная смесь (5-аминосалициловая кислота и

перекись водорода или ортафенилендиамин и перекись водорода). По чувствительности этот метод в 100 и более раз превышает РНГА, РДП и др. Предел чувствительности иммуноферментного метода достигает 1-10 нг/мл специфического белка.

Иммуноферментный метод используется для выявления и идентификации микроорганизмов и антител к ним. Различают две разновидности иммуноферментного метода: гомогенный и гетерогенный.

Гетерогенный, в литературе он описан под названием иммуносорбентного – ELISA – теста и РЭМА – реакция энзиммеченых антител (или антигенов), адсорбированных на поверхности водонерастворимых полимерных материалов. При гомогенном иммуноферментном методе не используется твердая фаза.

Гомогенный иммуноферментный метод в основном используется для определения низкомолекулярных антигенов (гормонов, лекарственных препаратов).

Основные компоненты, необходимые для выполнения твердофазного иммуноферментного метода:

1. Специфические иммуноглобулины (выделяются из гипериммунной сыворотки осаждением сульфатом аммония с последующей очисткой).
2. Антивидовые глобулины (выделяются из антивидовых сывороток осаждением сульфатом аммония с последующей очисткой).
3. Белок А (выделяют из золотистого стафилококка) или бычий сывороточный альбумин.
4. Антиген (готовят из органов зараженных животных). Заведомо положительные или отрицательные антигены.
5. Фермент пероксидаза (выделяют из хрена).
6. Конъюгаты (пероксидаза, связанная с антителами или антигеном методом периодатного окисления).
7. Субстратная смесь (5-аминосалициловая кислота и перекись водорода или ортофенилендиамин и перекись водорода).

8. Детергент (поверхностноактивные вещества: твин-20, 80, тритон X-100, сорбиталь с-20).
9. Иммунологический планшет (планшет из прозрачного полистирола).
10. Шприц-дозатор (для разлива ингредиентов реакции).

На биофабриках и в лабораториях научно-исследовательских институтов выпускают готовые диагностические наборы.

Существуют прямой и непрямой методы постановки этой реакции. На практике в основном используется непрямой метод.

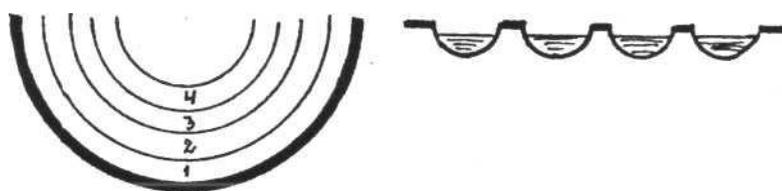
*Методика* постановки иммуноферментного метода для определения антигена.

Перед постановкой реакции лиофилизированные компоненты растворяют в объеме, указанном на этикетке 0,01 М раствором фосфатного буфера или дистиллированной водой и доводят до объема рабочих разведений. Объем компонентов, вносимых поэтапно в лунки планшета, равен между собой и составляет по 0,1 мл.

Этапы постановки реакции (рисунок 6):

I. Сенсibilизация планшета. В лунки планшета вносят специфические антитела (иммуноглобулины) в рабочем разведении, указанном на этикетке.

Планшет с антителами инкубируют в термостате при 37 °С 3 часа или при 4 °С 18 часов. По окончании инкубации проводят отмывку планшета раствором фосфатного буфера, содержащим твин, 3-4 раза, предварительно встряхнув содержимое лунок. Остатки раствора удаляют постукиванием о фильтровальную бумагу.



Твердый субстрат (пластиковый микропланшет)

Рисунок 6 – Схема выявления антиген» иммуноферментным методом.

Последовательность внесения компонентов:

1. Фиксация специфических антител на твердом субстрате.
2. Исследуемый антиген в разведениях.
3. Меченая ферментом антивидовая сыворотка.
4. Субстратная смесь (3 % раствор перекиси водорода с индикатором). Положительная реакция: изменение цвета индикатора (оранжевое окрашивание).

2. Внесение антигенов. В лунки планшета, сенсibilизированные специфическими антителами, вносят контрольные положительный и отрицательный антигены и исследуемую пробу в разведениях от 1:10 до 1:1280 и инкубируют в термостате при 37 °С 1 час. По истечении срока инкубации проводят трехкратную отмывку лунок планшета от несвязавшихся с антителом антигенов и подсушивают на фильтровальной бумаге.

3. Внесение пероксидазного антивидового конъюгата в разведении с целью выявления комплекса антиген+антитело. Залитые планшеты помещают в термостат при 37 °С на 1 час. Затем лунки планшета трехкратно отмывают с раствором ФБТ и подсушивают.

4. Внесение субстратной смеси. Для проявления реакции в лунки планшета вносят раствор субстрата (индикатора пероксидазы) - ортофенилдиамина, к раствору которого добавляют 3 % раствор перекиси водорода для выявления комплекса антиген+антитело+конъюгат. Планшеты закрывают и оставляют в темном месте при комнатной температуре на 15-30 мин.

5. Учет реакции проводят визуально или спектрофотометрически.

При визуальной оценке реакции учет проводят по четырехкрестовой системе:

- ++++ - интенсивное окрашивание;
- +++ - оранжевое окрашивание;
- ++ - бледно-оранжевое окрашивание;
- + - желтое окрашивание.

Пробу считают положительной при оценке в два креста и более. За титр антигена принимают наивысшее разведение, при котором в реакции со специфическим антителом наблюдается бледно-оранжевое окрашивание (2+), значительно превосходящее по интенсивности окрашивание контрольных лунок планшета.

При спектрофотометрическом учете результатов реакции производят расчет коэффициента специфичности, который равен отношению оптической плотности (ОП) продукта реакции в лунках с контрольным положительным антигеном (ОП<sub>1</sub>) к оптической плотности субстратной смеси в лунках с контрольным отрицательным антигеном (ОП<sub>2</sub>). Реакцию считают положительной, если коэффициент специфичности не ниже 2,1, и отрицательной, если ниже 2,1.

Техника постановки иммуноферментного метода для обнаружения (или титрования) антител выполняется так же, как при обнаружении и идентификации микробного антигена, с той разницей, что материалом является исследуемая сыворотка крови.

#### **41. Радиоиммунный метод**

Отличие этого метода от ИФА заключается в том, что в качестве метки антигенов и антител используют не фермент, а радиоактивный изотоп как <sup>125</sup>I или др. Результаты реакции учитывают путем определения радиоактивности исследуемых образцов. Это очень чувствительный и надежный метод, но требует специального оборудования и условий работы с радиоизотопом.

#### **42. Иммуоблоттинг**

Иммуоблоттинг (от англ. blot – пятно) – высокочувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА.

Принцип метода заключается в том, что антигены возбудителя разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносят их из геля на активированную бумагу или нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью ИФА. Фирмы выпускают такие полоски с «блотами» антигенов. На эти полоски наносят исследуемую сыворотку. Затем, после инкубации, отмывают от несвязавшихся антител и наносят сыворотку против иммуноглобулинов того вида животного, который был донором исследуемой сыворотки, меченную ферментом. Образовавшийся на полоске комплекс (антиген+антитело исследуемой сыворотки+меченое антитело против иммуноглобулинов животного исследуемого вида) выявляют добавлением хромогенного субстрата, изменяющего окраску под действием фермента.

#### **43. Реакция нейтрализации (РН)**

Реакция нейтрализации (РН) вируса основана на способности специфических антител, достаточно прочно соединяться с вирусной частицей. Как наиболее универсальная реакция она широко применяется в вирусологии.

Принцип (сущность) реакции нейтрализации состоит в следующем. Этапы постановки: в пробирке смешивают равные объемы вирусного антигена (суспензия вируса, вируссодержащего материала) и известной иммунной или неизвестной исследуемой сыворотки крови; эту смесь выдерживают при определенной температуре и длительности по времени, что зависит от вируса. Затем этой смесью заражают живые биологические системы (постановка биологической пробы), которые подбирают с учетом наилучшего культивирования данного вируса. Если во взятой сыворотке крови содержатся антитела, то вирус будет нейтрализован антителами сыворотки и биологическая проба окажется отрицательной, что будет свидетельствовать об образовании комплекса «антиген+антитело» (+), а

результат реакции нейтрализации даст положительный диагностический ответ.

Результаты РН учитывают по отсутствию: 1) гибели, развития клинической картины болезни и патологических изменений в органах и тканях лабораторных животных; 2) гибели, патологических изменений в оболочках и гемагглютининов в жидкостях полостей куриных эмбрионов; 3) цитопатического действия (ЦПД) или бляшкообразования в культуре клеток.

Для постановки РН нужны следующие четыре компонента:

- 1) вирусный антиген – суспензия известного вируса или неизвестный вируссодержащий материал;
- 2) специфические вируснейтрализующие антитела – известная гипериммунная сыворотка или неизвестная исследуемая сыворотка крови, предварительно обработанная для удаления неспецифических ингибиторов вирусов;
- 3) живые биологические системы-лабораторные животные, развивающиеся куриные эмбрионы и культуры клеток;
- 4) нормальная сыворотка крови, не содержащая специфические антитела, для контроля.

Реакцию нейтрализации в вирусологии применяют с целью:

- 1) идентификации выделенного неизвестного вируса с помощью известных специфических антител, содержащихся в диагностической гипериммунной сыворотке крови;
- 2) обнаружения и титрования неизвестных противовирусных антител в исследуемой сыворотке крови с помощью известного вирусного антигена;
- 3) определения количественного содержания (титра) антител в лечебных, профилактических и диагностических препаратах.

Поскольку специфические антитела (SS) с гомологичными вирусными антигенами (AS) взаимодействуют в строго определенных количественных соотношениях и содержание антител в сыворотке всегда неизвестно, берут

ряд пробирок, в которых вирус и сыворотка находились бы в разных соотношениях. РН ставится в двух модификациях:

- 1) с постоянным разведением (дозой) известной гипериммунной сыворотки крови и разными дозами вируса (вирусодержащего материала) для идентификации выделенного неизвестного вируса;
- 2) с постоянной дозой известного вируса (вирусного антигена) и разными разведениями (дозами) исследуемых сывороток крови для обнаружения и титрования неизвестных противовирусных антител в парных сыворотках при ретроспективной диагностике вирусных болезней.

**Методика постановки РН с постоянным разведением (дозой) иммунной сыворотки и разными дозами вирусного антигена (вирусодержащего материала).** Последовательность следующая:

1. На физиологическом растворе готовят два ряда десятикратных последовательных разведений вируса (вирусодержащего исследуемого материала):  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  и т.д.

2. Готовят одно разведение иммунной сыворотки (SS) в концентрации 1:10 или 1:20.

3. Готовят одно разведение нормальной сыворотки (SN) в концентрации 1:10 или 1:20.

4. Равные объемы каждого разведения вирусодержащего материала и иммунной сыворотки (по 1 или 2 мл) вносят в пробирки первого ряда, встряхивают и оставляют для контакта при температуре 4; 22 и 37 °С от 30 мин до 18 ч в зависимости от вируса.

5. Равные объемы каждого разведения вирусодержащего материала и нормальной сыворотки (по 1 или 2 мл) вносят в пробирки второго ряда, встряхивают и оставляют для контакта при температуре 4; 22 и 37 °С от 30 мин до 18 ч в зависимости от вируса.

6. Каждым разведением вирусодержащего материала и иммунной сыворотки (вирус + SS и вирус + SN) заражают либо лабораторных животных, либо куриные эмбрионы, либо культуру клеток: 4 тест-объекта на

каждое разведение вируса.

7. Учитывают результаты заражения по каждой группе зараженных тест-объектов (лабораторные животные, куриные эмбрионы, культуры клеток), считая за положительный результат действие вируса, за отрицательный – отсутствие его действия.

8. Полученные результаты обрабатывают статистически по методу Рида и Менча, выводят отношение индекса нейтрализации (IN):

$$IN = \frac{\text{Титр} \cdot \text{вируса} \cdot \text{с} \cdot \text{нормальной} \cdot \text{сывороткой}}{\text{Титр} \cdot \text{вируса} \cdot \text{с} \cdot \text{иммунной} \cdot \text{сывороткой}}$$

Индекс нейтрализации – число, показывающее, во сколько раз иммунная (специфическая) или исследуемая сыворотка снижает титр вируса по сравнению с нормальной сывороткой. Установлено, что если  $IN < 10$  (меньше) 10, то результат РН отрицательный; если  $IN > 10$  (больше) 10, но  $< 50$  ( $> 10$ , но  $< 50$ ), то результат РН сомнительный; если  $IN > 50$  (больше) 50, то результат РН положительный.

Пример. Титр вируса + SS =  $10^{-2}$ , титр вируса + SN =  $10^{-8}$ . Индекс нейтрализации будет равен

$$IN = \frac{10^{-8}}{10^{-2}} = 10^{-6} = 1000000$$

9. Обязательно одновременно ставят контроли: 1) с иммунной (специфической) сывороткой без вирусосодержащего материала; 2) с нормальной сывороткой без вирусосодержащего материала. Оба контроля должны быть отрицательными, т.е. отсутствие гибели животных, эмбрионов, ЦПД в клетках.

Таким образом, РН с разведением вируса позволяет определить, во сколько раз антитела исследуемой сыворотки способны снизить титр вируса путем нейтрализации его инфекционной активности.

**Методика постановки РН с постоянной дозой известного вирусного антигена и разными разведениями (дозами) исследуемой сыворотки.**

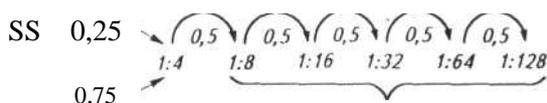
Последовательность следующая.

1. Предварительно титруют вирус в той биологической системе, которую будут использовать для РН (титр вычисляют по Риду и Менчу).

2. Готовят одно разведение вируса с таким расчетом, чтобы в 1 мл материала содержалось 100 ЭД<sub>50</sub>/мл.

3. Готовят двукратные последовательные разведения исследуемой сыворотки крови, предварительно обработанной для удаления неспецифических ингибиторов вирусов, или поддерживающей среды, начиная от разведения 1:4 до 1:128, для чего используют физиологический раствор (для лабораторных животных, куриных эмбрионов) или поддерживающую питательную среду для культур клеток.

4. Смешивают равные объемы каждого разведения исследуемой сыворотки и вируса в выбранной дозе (1 и 2 мл), смесь оставляют для контакта при температурах 4; 22 и 37 °С от 30 мин до 18 ч в зависимости от вида вируса.



физ.р-р по 0,5 мл

5. Смесь каждого разведения исследуемой сыворотки и вируса заражают либо лабораторных животных, либо КЭ, либо культуру клеток: 4 тест-объекта на каждое разведение сыворотки (по 0,2 мл).

6. Результаты РН учитывают через некоторое время, когда произойдет гибель лабораторных животных или эмбрионов или же наступит ЦПД в клетках.

7. Рассчитывают разведение исследуемой сыворотки, защищающее 50% зараженных биологических систем от действия 100 ЭД<sub>50</sub>/мл вируса, по Риду и Менчу.

За титр антител исследуемой сыворотки принимают то ее разведение, которое предотвращает гибель 50 % лабораторных животных, куриных

эмбрионов или же сдерживает развитие ЦПД вируса в 50 % зараженных культур клеток.

8. Обязательно одновременно ставят следующие контроли:

1) контроль вируса с материалом, используемым для разведения сыворотки – результат положительный;

2) контроль исследуемой сыворотки с материалом, использованным для разведения используемой для исследования сыворотки – результат отрицательный;

3) контроль материала, использованного для разведения сыворотки – результат отрицательный.

Таким образом, РН с разведением сыворотки позволяет определить титр антител в исследуемой сыворотке, показателем которого служит разведение сыворотки, защищающее 50 % зараженных биологических систем от действия 100 ЭД<sub>50</sub>/мл вируса.

Достоинства РН заключаются в ее универсальности и высокой специфичности. К недостаткам РН относятся высокая трудоемкость, необходимость строго соблюдать стерильность материалов, инструментов, высокая стоимость живых биологических систем и относительная длительность биологической пробы.

#### **44. Сравнительная чувствительность серологических методов исследований**

Метод	Чувствительность, мг/мл.
Реакция преципитации	$10^{-4} - 10^{-6}$
Реакция агглютинации	$10^{-6} - 10^{-7}$
Реакция связывания комплемента	$10^{-6}$
Реакция пассивной гемагглютинации	$10^{-7} - 10^{-9}$
Реакция иммунофлуоресценции	$10^{-7}$
Реакция коагглютинации	$10^{-8} - 10^{-9}$

Иммуноферментный анализ	$10^{-6} - 10^{-7}$
Радиоиммунный анализ	$10^{-9}$ и менее
Иммуноблоттинг	$10^{-7} - 10^{-9}$

#### РАЗДЕЛ 4

### РЕТРОСПЕКТИВНАЯ (СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ) ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Для диагностики вирусных болезней животных и людей широко используют различные серологические реакции. Они основаны на взаимодействии вирусных антигенов со специфическими (гомологичными, своими) антителами.

Вирусы являются антигенами, так как их белковая оболочка вызывает выработку специфических антител. Антитела накапливаются в основном в сыворотке крови. Они способны соединяться в комплекс антиген + антитело только со своим антигеном. Если антиген – инфекционный агент (вирус), антитела его нейтрализуют: в этом состоит биологическая роль антител.

Взаимодействие антител со своими антигенами возможно не только в живом организме, но и в пробирке. На этом и основаны серологические реакции (от лат. *serum* – сыворотка). Если взятая пара АГ (антиген) и АТ (антитело) гомологичны или соответствуют друг другу, то в пробирке они образуют комплекс АГ+АТ. Это позволяет обнаружить по известному антителу неизвестный антиген. А если брать сыворотку в разведениях, то можно установить и титр антител в ней. Идентификация неизвестного антигена возможна также путем испытания его с различными антителами.

Обычно источником антител служит сыворотка крови животных и людей, иммунизированных искусственным или естественным путем определенными вирусными антигенами. Антигенностью у вирусов обладают их белки. Поэтому в серологических реакциях в качестве вирусного антигена используют корпускулярный антиген в виде суспензии вирусов или

растворимые белки вирусов.

Широкое распространение нашли следующие серологические реакции: 1) нейтрализации (РН); 2) торможения гемагглютинации (РТГА); 3) непрямой гемагглютинации (РНГА); 4) связывания комплемента (РСК); 5) диффузной преципитации (РДП); 6) торможения гемадсорбции (РТГАд); 7) иммунофлуоресценции (РИФ). Все эти реакции различаются между собой методом определения образовавшегося комплекса антиген + антитело или тем, что комплекс вообще не образовался.

При серологической (ретроспективной) диагностике исследованиям подлежат сыворотки больных животных и людей. Обычно используют парные сыворотки, для получения которых от каждого животного (человека) кровь берут дважды с интервалом в 2-3 недели: в начале, т. е. в острой стадии, и в конце болезни, т.е. в период реконвалесценции. Сроки взятия крови варьируют в зависимости от особенностей течения болезни. Взятие крови и получение из нее сыворотки осуществляют в асептических условиях, так как сыворотки должны быть стерильными. До исследования сыворотки хранят в пробирках под пробками в холодильнике или в замороженном состоянии.

Цель исследования – установить в парных сыворотках наличие и титр антител к вирусам, которые предположительно могли быть возбудителями болезней у животных (человека), от которых получены сыворотки.

Основанием для предположения, к каким вирусам искать антитела, служит предварительный диагноз, поставленный по данным эпизоотологических наблюдений, клиническим признакам и патологоанатомическим изменениям (в случае зооантропоноза – по данным медслужбы). Наличие в сыворотках антител и их титры определяют в серологических реакциях; в качестве антигена используют предполагаемый вирус. Выбор серологических реакций определяется тем, какая реакция наиболее результативна для данного вируса, а также возможностями лаборатории и степенью квалификации персонала. При этом также

учитывают быстроту получения ответа и трудоемкость работы.

После установления титра антител в парных сыворотках прослеживают динамику титра: нарастание титра антител во второй сыворотке по сравнению с таковым в первой в 4 раза и более, достоверно свидетельствует об активном инфекционном процессе в организме животного (человека) в период взятия у него крови. При этом болезнь была вызвана тем вирусом, к которому определены антитела в парных сыворотках.

Недостаток серологической диагностики заключается в ретроспективности, так как к моменту постановки диагноза животное (человек), от которого получены парные сыворотки, уже или выздоровело, или пало. Однако серологические методы позволяют получить точный диагноз, что служит обоснованием мероприятий по ликвидации вспышки вирусной болезни или ее эпизоотии.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Ig - иммуноглобулин

АГ – антиген

АП – агаровый преципитин

АТ – антитело

ВВ – выделение вируса

ГА – гемагглютинация

ГАД – гемадсобция

ГАЕ – гемагглютинирующая единица

ГР- - грамотрицательная

ГР+ - грамположительная

ЕД – единица действия

ИГ – ингибция гемагглютинации

ИД<sub>50</sub> – доза вируса, вызывающая клиническую картину поражения у 50% зараженных лабораторных животных

ИДАГ – иммунодиффузия на агаровом геле

ИФ – иммунофлуоресценция

КК – культур клеток

КОЕ – колониеобразующие единицы

КР – кольцевая реакция

КФ – комплементная фиксация

КФЛП – комплементная фиксация для лейкоза птиц

КЭ – куриный эмбрион

ЛД<sub>50</sub> – доза вируса, вызывающая гибель 50% животных

МБИ – микроскоп биологический исследовательский

МБР микроскоп биологический рабочий

МЛ – микроскоп люминесцентный

МПА – мясо-пептонный агар

МПБ – мясо-пептонный бульон

МПЖ – мясо-пептонный желатин  
МФА – метод флюоресцирующих антител  
НВ – нейтрализация вируса  
ОМЧ – общее микробное число  
ОТ – обратная транскриптаза  
ПЦР – полимеразная цепная реакция  
РА – реакция агглютинации  
РБП – роз-бенгал проба  
РГА – реакция гемагглютинации  
РДП - реакция диффузионной преципитации  
РДСК – реакция длительного связывания комплемента  
РИА – радиоиммуноанализ  
РИМ – радиоиммунный метод  
РИФ – реакция иммунофлуоресценции  
РН – реакция нейтрализации  
РНГА – реакция непрямой гемагглютинации  
РСК – реакция связывания комплемента  
РТГА – реакция торможения гемагглютинации  
РЭМА – реакция энзиммеченых антител  
СТИ- санитарно-технический институт  
ТЦД<sub>50</sub> – доза вируса, дающая цитопатический эффект у 50% зараженных культур клеток (КК)  
ФИСА – ферментативный иммуносорбентный анализ  
ЦПД – цитопатогенное действие  
ЦЭ – цитопатогенный эффект  
ЭИД<sub>50</sub> – доза вируса, обуславливающая регистрируемый патологический процесс у 50% зараженных куриных эмбрионов (КЭ)  
ЭИЯ – эмбриональные индюшачьи яйца  
ЭКЯ – эмбриональные куриные яйца  
ЭЛД<sub>50</sub> – доза вируса, вызывающая гибель 50% зараженных КЭ

ЭМ – электронный микроскоп

ЭУЯ – эмбриональные утиные яйца

## ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусова Р.В., Преображенская Э.А., Третьякова И.В. Ветеринарная вирусология. Москва «КолосС», 2007г.
2. Воронин Е.С., Петров А.М., Серых М.М. Иммунология. М.; Колос – Пресс, 2002.
3. Госманов Р.Г., Колычев Н.М., Плешакова В.И. Ветеринарная вирусология. Санкт-Петербург - Москва – Краснодар, издательство «Лань», 2010г.
4. Госманов Р.Г., Колычев Н.М., Барсков А.А. Практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. Омск – издательский дом «Лео», 2008.
5. Колычев Н.М., Госманов Р.Г. Ветеринарная микробиология и иммунология. Москва «КолосС», 2003.
6. Костенко Т.С., Родионова А.М., Скородумов Д.И. практикум по ветеринарной микробиологии и иммунологии. М. «Колос», 2001.
7. Коляков Я.Е. Ветеринарная иммунология. М.: Агропромиздат, 1986.
8. Кондратьева И.А., Воробьева Н.В., Буракова О.В. Практикум по иммунологии. М.: Изд-во МГУ, 2001.
9. Лабораторные исследования в ветеринарии: Вирусные, риккетсиозные и паразитарные болезни / Под ред. Б.И.Антонова. – М. Агропромиздат, 1987.
10. Лабораторные исследования в ветеринарии: Бактериальные инфекции. Под редакцией Б.И. Антонова, Москва, Агропромиздат, 1986.
11. Прикладная иммунология. Под редакцией проф. А.А.Сохина, проф. Е.Ф.Чернушенко. Киев. «Здорорвья», 1984.
12. Сюрин В.Н., Белоусова Р.В., Фомина Н.В. Диагностика вирусных болезней животных (справочник). Москва, 1991.
13. Скородумов Д.И., Суботин В.В., Сидоров М.А., Костенко Т.С. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. Москва. Изд-во «Изограф», 2005.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
<b>РАЗДЕЛ 1. БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА</b>	<b>5</b>
1. Методы бактериологической диагностики.....	5
1.1. Принципы организации и оборудование ветеринарных лабораторий.....	5
1.2. Техника безопасности при работе в ветеринарной лаборатории...	6
1.3. Общая схема проведения бактериологической диагностики.....	7
1.4. Правила взятия, консервирования и транспортировки патологического материала.....	8
2. Микроскопические методы исследований.....	11
2.1. Устройство микроскопа и правила работы с ним.....	11
2.2. Виды микроскопа и их назначение.....	14
3. Приготовление препаратов для микроскопии.....	17
3.1. Техника приготовления препаратов для микроскопии.....	17
3.2. Бактериологические краски.....	19
3.3. Простой метод окрашивания препарата.....	20
3.4. Изучение основных форм бактерий.....	21
4. Дифференциально-диагностический метод окрашивания бактерий по Граму.....	22
4.1. Сложные (дифференциальные) методы окрашивания бактерий....	22
4.2. Окрашивание по Граму.....	23
4.3. Специальные методы окрашивания (по методу Циля-Нельсона и Козловского).....	24
4.4. Окраска спор.....	25
4.5. Окраска капсул.....	26
5. Бактериологические методы исследования.....	27
5.1. Назначение и классификация питательных сред для бактерий.....	28
5.2. Приготовление питательных сред. ....	30
6. Стерилизация.....	35

6.1.	Физические методы.....	36
6.2.	Химические методы стерилизации.....	40
6.3.	Механические методы.....	41
7.	Посев бактерий на питательные среды.....	43
7.1.	Техника посевов бактерий на питательные среды.....	43
7.2.	Методы культивирования бактерий.....	45
7.3.	Методы выделения чистых культур бактерий.....	46
8.	Культуральные свойства бактерий.....	51
8.1.	Культуральные свойства бактерий на плотных питательных средах.....	51
8.2.	Культуральные свойства бактерий на жидких питательных средах.....	52
9.	Ферментативные (биохимические) свойства бактерий.....	53
9.1.	Определение ферментации углеводов.....	53
9.2.	Определение протеолитических свойств.....	55
9.3.	Определение редуцирующей (восстанавливающей) способности..	56
9.4.	Определение фермента каталазы.....	56
9.5.	Определение плазмокоагуляции.....	56
9.6.	Определение ДНК-азы.....	57
9.7.	Определение гемолитической способности.....	57
10.	Определение чувствительности бактерий к антибиотикам.....	57
10.1.	Методы серийных разведений.....	58
10.2.	Метод диффузии в агаре (метод бумажных дисков).....	60
11.	Исследование бактерий на подвижность.....	61
12.	Биологические методы исследований.....	63
12.1.	Методы заражения лабораторных животных.....	63
12.2.	Определение вирулентности микробов.....	68
12.3.	Бактериологическое исследование трупа.....	70
13.	Культивирование анаэробных микроорганизмов.....	72
14.	Методы изучения микроскопических грибов и актиномицетов....	78

15.	Методы изучения риккетсий, хламидий и микоплазм.....	84
15.1.	Методы изучения риккетсий.....	84
15.2.	Методы изучения хламидий.....	85
15.3.	Методы изучения микоплазм.....	85
16.	Методы идентификации возбудителей инфекционных болезней...	85
<b>РАЗДЕЛ 2. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА</b>		
<b>ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ</b>		
17.	Экспресс методы.....	89
18.	Вирусологические методы.....	91
19.	Культивирование вирусов в живых биологических системах.....	91
20.	Культивирование вирусов на естественно-восприимчивых и лабораторных животных.....	92
21.	Культивирование вирусов в развивающихся куриных эмбриона...	95
22.	Культивирование вирусов на культурах тканей и клеток.....	97
23.	Структура вирусологической лаборатории. Правила техники безопасности и режим работы.....	107
24.	Схема лабораторной диагностики вирусных болезней животных.....	109
25.	Получение вирусосодержащего материала от больных животных и трупов: консервация, транспортировка и подготовка к исследованию.....	113
26.	Микроскопические методы обнаружения элементарных телец и вирусных телец-включений.....	120
27.1.	Лабораторные животные и их использование в вирусологии. Постановка биологической пробы на лабораторных животных....	122
27.2.	Вскрытие трупов лабораторных животных и получение вирусосодержащего материала.....	125
28.1.	Культивирование вирусов в развивающихся куриных эмбрионах.	128
28.2.	Экспериментальное заражение куриных эмбрионов вакцинами	

	штаммами вирусов болезни Ньюкасла и оспы птиц.....	131
28.3.	Вскрытие погибших куриных эмбрионов. Признаки размножения вируса и патологические изменения. Получение вирусосодержащего материала. Индикация вируса в капельной реакции гемагглютинации (РГА).....	133
29.1.	Использование культур клеток и тканей в вирусологии. Питательные среды, солевые растворы и другие компоненты. Посуда и ее подготовка.....	135
29.2.	Методика получения первично-трипсинизированных культур клеток из тканей куриного эмбриона и их культивирования.....	138
29.3.	Заражение первично-трипсинизированной культуры клеток вирусом. Определение цитопатогенного действия вируса.....	142
30.	Выделение бактериофагов. Методы определения их титра.....	145
31.	Титр вируса. Единицы количества вирусов. Метод титрования вирусов по инфекционному действию. Метод расчета титра вируса по Риду и Менчу.....	148
32.	Титрование вирусов по гемагглютинирующему действию. Постановка развернутой реакции гемагглютинации (РГА).....	151
33.	Электронная микроскопия в диагностике вирусных болезней.....	154
34.	Использование в вирусологии полимеразной цепной реакции (ПЦР).....	159
35.	Использование в вирусологии ДНК-зондов.....	163
	<b>РАЗДЕЛ 3. МЕТОДЫ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ</b>	166
36.	Реакция преципитации: кольцепреципитации, диск-преципитации, диффузной преципитации.....	179
37.	Реакция агглютинации: пробирочный метод. Другие модификации постановки.....	184
38.	Реакция связывания комплемента (РСК).....	194

39.	Методы иммунофлуоресценции (РИФ).....	206
40.	Иммуноферментный метод диагностики инфекционных болезней.....	213
41.	Радиоиммунный метод .....	217
42.	Иммуноблоттинг.....	217
43.	Реакция нейтрализации.....	218
44.	Сравнительная чувствительность серологических методов исследований.....	223
	<b>РАЗДЕЛ 4. РЕТРОСПЕКТИВНАЯ (СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ) ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ</b>	224
	Список сокращений.....	227
	Литература.....	230
	Оглавление.....	234

Учебное пособие предназначено для слушателей факультета повышения  
квалификации по специальности «Ветеринария»

Госманов Р.Г.

Галиуллин А.К.

Нургалиев Ф.М.

Идрисов Г.Г.

**ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ  
БОЛЕЗНЕЙ**