

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
профессионального образования**

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра микробиологии, эпизоотологии и вирусологии

**Государственное управление ветеринарии
Краснодарского края**

**Государственное учреждение Краснодарского края
«Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория»**

**А.А. ШЕВЧЕНКО, О. Ю. ЧЕРНЫХ, Г.А. ДЖАИЛИДИ,
В.О. ЧЕРНЫХ Л.В. ШЕВЧЕНКО**

ДИАГНОСТИКА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Учебное пособие

г. Краснодар, 2013

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего профессионального образования**

**КУБАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра микробиологии, эпизоотологии и вирусологии

**Государственное управление ветеринарии
Краснодарского края**

**Государственное учреждение Краснодарского края
«Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория»**

**А. А. ШЕВЧЕНКО, О. Ю. ЧЕРНЫХ, Г. А. ДЖАИЛИДИ,
В. О. ЧЕРНЫХ Л. В. ШЕВЧЕНКО**

ДИАГНОСТИКА АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Учебное пособие

**Для студентов высших учебных заведений факультета
ветеринарной медицины по направлению подготовки
«Ветеринария»**

КРАСНОДАР, 2013

УДК 619:616.98-07:578.833.314]:636.4(075)

ББК 48.73

Д 44

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Г.А. Джаилиди,
В.О. Черных, Л.В. Шевченко.

Учебное пособие «Диагностика африканской чумы свиней».

Краснодар: КубГАУ, 2013. 29 с.

В учебном пособии изложены основные свойства возбудителя африканской чумы свиней; описаны вирусологические, биологические и серологические методы диагностики болезни и дифференциальной диагностики заболевания.

РЕЦЕНЗЕНТЫ:

Лысенко А.А. – доктор ветеринарных наук, профессор, декан факультета ветеринарной медицины КубГАУ.

Куриннов В.В. – доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий лабораторией Всероссийского научно-исследовательского института ветеринарной вирусологии и микробиологии Россельхозакадемии.

Рекомендовано методической комиссией факультета ветеринарной медицины КубГАУ протокол №3 от 19 ноября 2012 года.

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13

Диагностика африканской чумы свиней

Африканская чума (лат. — *Pestis africana suum*; англ. — *African swine fever*; болезнь Монтгомери, восточно-африканская лихорадка) — особо опасная высококонтагиозная инфекционная болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, обширными геморрагиями и цианозом кожи, тяжелыми дистрофическими и некротическими поражениями клеток ретикулоэндотелиальной системы, внутренних органов и высокой летальностью.

Возбудитель болезни. Болезнь вызывает ДНК-содержащий кубической формы вирус семейства *Asfarviridae*. Род – *Asfivirus* размером 170-220 нм. Вирус репродуцируется в организме диких и домашних свиней (в моноцитах, макрофагах и ретикулоэндотелиальных клетках), в культурах клеток свиней, а также в клещах рода *Ornithodoros*. Пораженные вирусом клетки способны к гемадсорбции, в дальнейшем лизируются. В организме инфицированных животных вырабатываются определенные антитела.

Выявлено 8 серологических и иммунологических групп и подгрупп вируса, что представляет собой основное препятствие в разработке средств специфической профилактики (вакцин, гипериммунных сывороток).

Вирус устойчив к широкому диапазону температур, изменениям рН среды, к высушиванию и гниению. Солнечные лучи инактивируют вирус через 40-60 мин. В условиях свинарника при температуре 24 °С остается активным до 4 мес. Поэтому все что имело контакт с больными животными (помещения, кормушки, корма, поилки, предметы ухода, одежда обслуживающего персонала, транспорт, станки, базы) является источником заражения для свиней.

Вирус в крови, взятой от больных свиней, при температуре 5°С сохраняет жизнеспособность до 7 лет, при температуре 20 °С выживает до 18 мес, при 37°С сохраняет активность до 30 дней. При температуре 50°С вирус сохраняется до 1 ч, при 60 °С инактивируется за 20 мин.

В мясе от больного животного при хранении в замороженном состоянии вирус выживает до 155 сут, в копченой ветчине жизнеспособен до 6 мес.

В трупах павших от АЧС свиней вирус сохраняется от 17 сут до 10 недель, в фекалиях до 160 сут, моче выживает до 60 сут, почве остается жизнеспособным в зависимости от сезона года от 112 сут (лето-осень), до 200 сут (осень-зима). Вирус устойчив к дезинфицирующим препаратам.

Основными дезинфицирующими препаратами являются: 5%-ный водный раствор хлорамина при экспозиции 18-20 час, 1,5%-ный водный раствор

формальдегида при экспозиции 18-20 час, 5%-ный водный раствор теотропина для обработки автотранспорта, ценного оборудования, живых животных при экспозиции 18-20 час, раствор хлорной извести с содержанием не менее 4% активного хлора, хлорная известь в виде порошка с содержанием активного хлора не менее 25%.

Эпизоотологические данные. Главный естественный путь заражения свиней в Европе происходит при oro-носовым прямым или косвенным контактом с зараженными свиньями или кормом, контаминированным вирусом. В тех территориях, где существуют клещи *Ornithodoros erraticus*, передача вируса через этот вектор играет очень важную роль в вирусной персистенции и распространении. АЧС может также распространяться посредством косвенного контакта с загрязненными материалами и через укусы насекомых, которые механически транспортируют вирус АЧС. Передача болезни может также произойти через сперму зараженных хряков.

Клинические признаки и течение. Инкубационный период у индивидуальных животных – приблизительно 5-21 дней, но в полевых условиях клинические признаки могут стать очевидными спустя несколько недель после заноса вируса или даже больше.

Проявление острого, подострого или хронического течения АЧС зависит, главным образом, от различий вирулентности вируса.

У выздоровевших свиней после инфекции, вирулентность сохраняется в течение 40 - 60 дней, и эти свиньи становятся переносчиками вируса.

Острое течение. Повышение температуры тела выше 40°C - обычно первый клинический признак болезни, которая сопровождается депрессией, потерей аппетита, быстрым и затрудненным дыханием, и выделениями от носа и глаз. Свиньи передвигаются с нарушением координации и сгущаются. Свиноматки могут абортить на любой стадии супоросности. У некоторых свиней может быть рвота и запор, у других – диарея с примесью крови и кровотечение из носа. Застойные или геморрагические подкожные области становятся очевидными, особенно конечностей и ушей. Кома может развиваться перед смертью, через 1-7 дней после появления клинических признаков. Заболеваемость и смертность в пределах фермы возможны до 100 %.

Посмертно, изменения указывают на геморрагический синдром, с генерализованным застоем, кровянистой жидкостью в груди и брюшных впадинах, увеличенной темной селезенкой, геморрагическими лимфоузлами, которые напоминают кровяные сгустки, особенно почечные и желудочно-печеночные, петехиальные кровоизлияния в почках (корковые и медуллярные пирамиды и почечной лоханки), на брюшной серозной, желудочной и кишечной слизистых оболочках и сердце (эпикард и эндокард) - петехиальные кровоизлияния.

При остром течении классической чумы свиней клинические признаки и патологоанатомические изменения очень схожи. Когда имеют место подкожные кровоизлияния (на теле и ушах) их легко обнаружить и заподозрить острую форму классической или африканской чумы свиней.

Острое течение африканской чумы свиней нужно также иметь в виду в случаях подозрения репродуктивного и респираторного синдрома, отравления (энтеротоксими), постотъёмного мультисистемного синдрома истощения, свиного дерматита и синдрома нефропатии, сальмонеллёза или пастереллёза, или любых брюшных или дыхательных синдромов с гипертермией или в тех случаях, когда отсутствует положительный эффект после антибиотикотерапии.

Подострое течение болезни в энзоотичных территориях. Характеризуется перемежающейся температурой тела, депрессией и пневмонией. Смерть может произойти из-за остановки сердца. Изменения при подострой форме подобны тем, что в острой, но менее выражены. Характерные изменения - большие геморрагии в лимфоузлах, почках и селезёнке, застой в лёгких и отёк, в некоторых случаях интерстициальная пневмония.

Хроническое течение болезни бывает редко. При хроническом течении, могут быть вторичные бактериальные инфекции. По клиническим признакам хроническую АЧС очень трудно определить, так как много других болезней нужно иметь в виду для дифференциального диагноза. Увеличение температуры тела не обязательно у каждого животного, и в неблагополучной ферме может быть обнаружена только у некоторых свиней.

Клинические признаки хронической АЧС могут быть респираторные проблемы, аборты, артриты, хронические язвы кожи или некроз, без типичных клинических признаков. Изменения могут быть минимальными или отсутствовать. Могут быть увеличенными лимфатические узлы и селезёнка, плеврит и фибринозный перикардит, интерстициальная пневмония.

Диагностика. Диагноз устанавливают комплексно с учетом эпизоотологических данных, клинических, патологоанатомических изменений и обязательно лабораторных исследований. В связи с тем, что африканская чума свиней по клиническим и патологоанатомическим признакам имеет сходство с классической чумой, то основанием для подозрения на нее является заболевание свиней, вакцинированных против чумы. В любом случае гибели взрослых животных необходимо исключить заражение их вирусом АЧС.

Для лабораторных исследований при подозрении на африканскую чуму свиней ветеринарный врач осуществляет отбор проб от свиней любой половозрастной группы, в зависимости от эпизоотологических данных и клинических показаний (неожиданная гибель нескольких животных неустановленной этиологии или превышающих технологическую норму). Количество проб бе-

рут от всех павших (заболевших), но не менее, чем от 3-х животных при массовой гибели. Структура проб: «полный набор», включая пробы крови, лимфатических узлов, паренхиматозных органов, костной ткани, трубчатую кость с мозгом (в случае отсутствия органов или их аутолиза).

Отбор проб для вирусологических исследований. Для обнаружения вируса африканской чумы свиней, антигена или генома от павших или убитых с диагностической целью свиней отбирают массой 5-10 г - селезёнку (1/3 часть), порталые, желудочные и подчелюстные (или мезентериальные) лимфоузлы (целиком), лёгкое (5x5 см) и почку (1/3 часть), 3-5 мл крови (или сгусток). Кроме того, рекомендуется в случае аутолиза трупа отбирать грудинную или трубчатую кость.

Отбор проб для серологических исследований. Минимальное количество проб, которые должны быть отобраны для серологических исследований, рассчитывают с учётом 10%-ой серопревалентности заболевших с 95%-ой достоверностью для обследования каждого помещения.

Пробы крови отбирают из полых вен не менее 10 мл от каждой свиньи.

Общие процедуры для транспортирования проб. Все пробы необходимо направлять в лабораторию с сопроводительным документом. Сопроводительные документы должны включать детали происхождения отобранных свиней и клинические признаки или изменения при посмертном вскрытии. В случае содержания свиней на ферме уточнить информацию относительно возраста, категории и фермы, откуда получены пробы. Рекомендуется, чтобы местоположение каждой свиньи, от которой отобраны пробы, было зарегистрировано вместе с её номером.

Рекомендуется, чтобы все пробы:

- содержались и транспортировались в герметичных контейнерах;
- были не заморожены, но содержались охлаждёнными;
- содержались в пакете вместе с пакетом со льдом, а не влажным льдом;
- органы помещают в отдельный запечатанный полиэтиленовый пакет.

Внешняя сторона пакета должна быть маркирована с указанием адреса лаборатории-получателя с последующей надписью: патологический материал от животного; скоропортящийся; хрупкий; не открывать вне ветеринарной лаборатории;

Пакет помещают в большой контейнер с абсорбционным материалом, для защиты от повреждения и предотвращения утечки;

Контейнер транспортируется непосредственно в лабораторию ветеринарным врачом для обеспечения быстрой и надёжной транспортировки.

Лаборатория, получающая пробы должна быть информирована о времени и способе доставки проб.

При транспортировании в целях исключения всех видов досмотра и проверок нарочному выдают справку «Разрешение на транспортирование специального груза»;

Контейнер с пробами транспортируют любым видом транспорта. За доставку специального груза ответственность несёт организация-отправитель.

Разрешение на транспортирование специального груза

С П Р А В К А

Дана представителю (ям) _____

(наименование организации)

(ФИО)

В том, что патологический материал от свиней упакован в контейнере, опечатанный сургучной печатью с оттиском _____ № _____. Спецгруз не взрывоопасен, не огнеопасен, не подлежит всем видам досмотра и контроля!!!

Транспортирование спецгруза _____

(вид транспорта)

Разрешено на основании Санитарных правил «Порядок учёта, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности», утверждённых Постановлением Госсанэпиднадзора РФ от 28.08.95 № 14

Руководитель организации _____ (подпись)

Гербовая печать

Категорически запрещается:

- пересылать пробы почтой или иным способом, кроме нарочного!
- передавать контейнер с пробами другим лицам, а также сдавать в багаж в самолёте, поезде, в аэропортах, железнодорожных и автобусных станциях.

Для лабораторных исследований применяют следующие методы: реакцию гемадсорбции (РГАд) в культурах клеток, реакцию прямой иммунофлюоресценции (РПИФ), полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в формате электрофорезной детекции, ПЦР в формате реального времени, применяют твёрдофазный иммуноферментный анализ (ТФ – ИФА) (сэндвич-вариант). В сомнительных случаях окончательный диагноз устанавливают заражением подозрительным материалом (кровь, суспензия селезенки и лимфатических узлов) свиней, вакцинированных против классической чумы. Заражение свиней (биопроба) проводят в специализированной лаборатории с соблюдением особых мер предосторожности. Серологические типы вируса определяют в реакции преципитации (РП), реакции связывания комплемента (РСК), реакции задержки гемадсорбции (РЗГАд) и другими методами.

Для обнаружения антигена африканской чумы свиней применяют реакцию гемадсорбции (РГАд) в культурах клеток костного мозга (ККМС) или лейкоцитов свиней (ЛС), содержащих эритроциты и последующем обнаружении гемадсорбции ставят в вирусологических лабораториях. Для этого культуру клеток ЛС или ККМС 2-3 суточного возраста, выращенную на стеклянных пластинках из покровных стекол в пробирках (чашках Карреля), заражают экстрактами суспензий органов и кровью и через 24, 48, 72, 96 и 192 часа после инокуляции культуру клеток просматривают под световым микроскопом на наличие гемадсорбции. В положительных случаях наблюдают гемадсорбцию эритроцитов на пораженных вирусом клетках в виде ягоды «малины».

Реакция прямой иммунофлуоресценции (РПИФ) ставят в вирусологических лабораториях для прямого обнаружения вирусного антигена в клетках органов свиней, подозреваемых в заражении вирусом африканской чумы свиней. Внутриклеточный антиген обнаруживают люминесцентной микроскопией препаратов мазков-отпечатков, окрашенных ФИТЦ-иммуноглобулинами (специфические антитела к вирусу африканской чумы свиней, меченные флуоресцеинизотиацианатом). Лучшими органами для РПИФ являются селезёнка и лимфоузлы. Исследование может быть выполнено в течение 2-4 час.

Для выполнения реакции используют «Набор препаратов для дифференциальной иммунофлуоресцентной диагностики африканской чумы свиней (АЧС), классической чумы свиней (КЧС) и болезни Ауески (БА)» или сертифицированные конъюгаты ФИТЦ-иммуноглобулины АЧС, произведённые отдельно во Всероссийском научно-исследовательском институте ветеринарной вирусологии и микробиологии (ВНИИВВиМ), г. Покров Владимирская область.

Оценку результатов микроскопии проводят по условной четырех крестовой шкале при окуляре 10x20-объективе 10. В положительных случаях наблюдают сверкающую, желто-зеленого цвета флуоресценцию клеток с включениями или очаговыми флуоресцирующими комплексами диффузного и гранулярного антигена, в одном из 10-50 полей зрения.

Для обнаружения антигена и антител против вируса африканской чумы свиней применяют твёрдофазный иммуноферментный анализ (ТФ – ИФА) (сэндвич-вариант) основанный на взаимодействии иммобилизованных на поверхности лунок планшет специфических к вирусу АЧС иммуноглобулинов со специфическими антигенами АЧС и последующим выявлением комплекса «антиген-антитело» специфическим к вирусу АЧС конъюгатом антител, меченным пероксидазой хрена (конъюгат ПХ-АЧС). Пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси

водорода и окисление хромогена, в результате чего в лунках развивается окраска субстрата, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антигена в определяемой пробе. В случае отсутствия антигена, конъюгат ПХ-АЧС (т.е. ПХ) удаляется отмывочным раствором и окраска отсутствует.

При визуальном учёте реакцию считают положительной при окрашивании хромогенного субстратного раствора в лунках, в которых предварительно инкубировали исследуемые и специфический антиген в сине-зеленый цвет и отсутствии окрашивания субстрата в лунках, в которых предварительно инкубировали нормальный антиген.

Для обнаружения генома вируса африканской чумы свиней применяют ПЦР в формате электрофорезной детекции. Для выполнения используют «Тест-систему для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР» (производство ГНУ ВНИИВВиМ). Принцип реакции заключается в многократном повторении циклов денатурации исследуемой ДНК при температуре 94°C, гибридизации ДНК со специфическими праймерами при температуре 53°C и синтеза с них комплементарных цепей ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы при температуре 72°C. В результате амплификации концентрация синтезированного фрагмента в исследуемой пробе увеличивается в миллионы раз, что позволяет визуально учитывать результаты анализа с помощью электрофореза в агарозном геле.

Анализ по выявлению вируса АЧС включает выделение ДНК и амплификации специфического фрагмента в полимеразной цепной реакции и электрофорез в агарозном геле.

Результаты электрофореза просматривают в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе "Трансиллюминатор". Результаты реакции выявляются в виде светящихся полос оранжевого цвета.

Реакция считается положительной, если полоса в соответствующем треке располагается в геле точно на таком же расстоянии от старта, что и полоса положительного контроля амплификации. Размер аппликонов после проведения ПЦР- 485 п.н.

Реакция считается отрицательной, если в соответствующих треках полос не обнаружено или полосы не соответствуют по размеру фрагменту в контрольной пробе (т. е. располагаются на другом расстоянии от старта).

Для обнаружения антигена вируса африканской чумы свиней применяют ПЦР в формате реального времени. Реакция заключается в использовании специфического флуоресцентно-меченного зонда, сайт гибридизации которого лежит между сайтами связывания основных диагностических праймеров. В случае присутствия в исследуемом образце генома возбудителя, зонд будет связываться с его ДНК и прибор регистрирует накопление флуорес-

центного сигнала в ходе реакции. Регистрация сигнала происходит через стенки пробирки в режиме реального времени.

Учёт результатов проводят по анализу кривых накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Положительными считают результаты реакции при значениях Ct, не превышающих 35.

Образцы, для которых не определено значение Ct (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) – результаты считают отрицательными.

Дифференциальная диагностика. Африканскую чуму следует дифференцировать от классической чумы, а также от рожи и пастереллеза при помощи соответствующих бактериологических и вирусологических исследований.

Принципы и использование вирусологических методов и оценка их результатов

1. Прямое обнаружение вирусного антигена

1.2. Реакция прямой иммунофлуоресценции (РПИФ)

Принцип метода – прямое обнаружение вирусного антигена в клетках органов свиней, подозреваемых заражении вирусом африканской чумы свиней. Внутриклеточный антиген обнаруживают люминесцентной микроскопией препаратов мазков-отпечатков, окрашенных ФИТЦ-иммуно-глобулинами (специфические антитела к вирусу африканской чумы свиней, меченные флуоресцеинизотиацианатом). Лучшими органами для РПИФ являются селезёнка и лимфоузлы. Исследование может быть выполнено в течение 2-4 час. Поскольку пробы органов могут только быть получены от вынужденно убитых с диагностической целью или павших свиней, использование метода для целей массового обследования ограничено.

Достоверность результатов метода может быть ограничена интерпретацией результатов, если исследуемые органы аутолизированы.

Для выполнения реакции используют «Набор препаратов для дифференциальной иммунофлуоресцентной диагностики африканской чумы свиней (АЧС), классической чумы свиней (КЧС) и болезни Ауески (БА)» или сертифицированные конъюгаты ФИТЦ-иммуноглобулины АЧС, произведённые во ВНИИВВиМ.

Отбор и транспортирование проб биологического материала для исследования

Для обнаружения антигенов вируса от 2-5 подозреваемых в заражении вирусом АЧС животных, убитых в стадии агонии или не позже чем через 2-3 час после гибели отбирают пробы селезенки, легкого и почки и крови, мин-

далин, подчелюстных и мезентериальных лимфатических узлов (у аутолизи- рованного трупа, подозреваемого в гибели от АЧС, отбирают пробы костного мозга любой трубчатой кости)

Пробы указанных органов по 5-10 граммов помещают в стерильные фла- коны (или полиэтиленовые пакеты), которые герметически укупоривают ре- зиновыми пробками, этикетируют, обрабатывают 5,0 %-ным раствором хло- рамина Б или осветленным 20,0 %-ным раствором хлорной извести или 5%- ным раствором NaOH, обвертывают марлей, смоченной одним из указанных дезинфицирующих раствором, укладывают в полиэтиленовые пакеты, герме- тично завязывают и помещают в термос со льдом. Если транспортировка за- нимает более чем 24 часа, пробы замораживают и помещают в термос с су- хим льдом. Термос транспортируют в герметичном контейнере, опечатавают и доставляют нарочным в лабораторию с сопроводительным документом.

1.2.2. Подготовка проб биоматериала к исследованию

Пробы органов очищают от жировой и соединительной ткани, готовят навески по 2-3 г, тщательно растирают в отдельной стерильной ступке со стеклянным песком и готовят 20%-ную суспензию на стерильном 0,85%-ном растворе хлористого натрия рН 7,0-7,5. Суспензии дважды замораживают при минус 20⁰С, оттаивают при (37+0,5)⁰С и центрифугируют 20 мин на хо- лоде (4 ±2)⁰С при 2500-3000 об/мин в течение 10-15 мин. Надосадочную жидкость (экстракт) отсасывают, вносят в него по 200 ЕД/см³ пенициллина и стрептомицина, выдерживают 1 час при (37+0,5)⁰С и используют для иссле- дований в качестве антигена.

1.2.3. Подготовка компонентов набора для проведения исследований

Лиофилизированные препараты набора перед использованием растворя- ют в стерильной дистиллированной воде до объема указанного на этикетке компонента.

1.2.4. Обнаружение антигенов вирусов АЧС и КЧС в или мазках-отпечатках проб органов РПИФ

1.2.4.1. Приготовление мазков-отпечатков

Мазки-отпечатки из испытуемых проб органов свиней готовят на обез- жиренных спирт-эфиром (1:1) стеклянных пластинках изготовленных из по- кровных стекол, укрепленных в расщепках палочек из спичек с условными номерами. Мазок-отпечаток делают, прикладывая стекло к поверхности среза исследуемого органа. Для каждого отпечатка делается новый срез органа. Мазки-отпечатки высушивают на воздухе при комнатной температуре, по-

мещают в химический стакан и фиксируют химически чистым холодным ацетоном в течение 10-15 минут. Затем мазки высушивают, после чего они готовы для постановки реакции прямой иммунофлуоресценции. Контрольные мазки-отпечатки готовят аналогичным способом из проб органов здоровых, не вакцинированных животных. Допускается хранение фиксированных мазков-отпечатков при минус 20⁰С в течение семи суток.

1.2.4.2. Постановка РПИФ – окрашивание мазков-отпечатков

Подготовленные мазки-отпечатки помещают на капли соответствующих ФИТЦ-иммуноглобулинов АЧС или КЧС, нанесенные в рабочем разведении на края предметных стекол. Стекла помещают во влажную камеру на 30 мин при (37+0,5)⁰С. Затем мазки-отпечатки снимают с предметных стекол, ополаскивают в 0,01 М ФСБ (рН 7,0-7,5) и свободными концами спичек укрепляют в гнездах деревянного штатива. Штатив помещают в цилиндрическую банку с 0,01 М ФСБ (рН 7,0-7,5), установленную на магнитную мешалку. Отмывание тест-препаратов от несвязавшихся или неспецифически связавшихся ФИТЦ-иммуноглобулинов ведут в течение 20 мин в темном месте, сменяя ФСБ через 10 мин. После отмывания тест-препараты ополаскивают дистиллированной водой, подсушивают на воздухе и заключают в забуференный раствор глицерина для иммунофлуоресцентной микроскопии (9 частей глицерина и 1 часть ФСБ рН 7,0-7,5). Края тест-препаратов заливают расплавленным парафином.

1.2.4.3. Учет результатов:

- обнаружение антигена вируса АЧС при люминесцентной микроскопии мазков-отпечатков на АЧС исследуют пробы селезенки, лимфатических узлов, легкого, печени. Специфическую флуоресценцию учитывают в клетках лимфоидного ряда, макрофагах, моноцитах. Она характеризуется чаще ярким желто-зеленым свечением гранул, бобовидных включений в цитоплазме или диффузного зеленого свечения всей цитоплазмы. Не учитывают флуоресцирующие клетки, в которых не различают ядро, а также дегенерированные клетки. Оценку результатов микроскопии проводят по условной четырех крестовой шкале при окуляре 10x20-объективе 10:

++++ - сверкающая, желто-зеленая флуоресценция клеток с включениями или очаговыми флуоресцирующими комплексами диффузного и гранулярного антигена, в каждом поле зрения. Результат положительный;

+++ - яркая, зеленая флуоресценция клеток с включениями в одном из 5-10 полей зрения. Результат положительный;

++ - яркая, зеленая флуоресценция клеток с включениями в одном из 10-50 полей зрения. Результат положительный;

+ - яркая, зеленая флуоресценция единичных клеток с включениями (3-5 клеток в мазке-отпечатке). Результат положительный;

– - нечеткая, серо-зеленая тусклая диффузная флуоресценция клеток. Результат отрицательный.

- обнаружение антигена вируса КЧС при люминесцентной микроскопии мазков-отпечатков на КЧС исследуют пробы селезенки, лимфатических узлов почки и легкого животных, ранее не вакцинированных против КЧС. Специфическую флуоресценцию учитывают в лимфоидных клетках паренхимы селезенки и лимфатических узлах, расположенных группами, и клетках эпителия почечных канальцев, расположенных одиночно, группами или в виде сплошного монослоя. Флуоресценция характеризуется ярким диффузным свечением цитоплазмы.

Оценка результатов микроскопии проводится по условной четырех крестовой шкале при окуляре 10x20-объективе 10:

++++ - обнаружение сплошного монослоя клеток с яркой цитоплазматической флуоресценцией. Результат положительный;

+++ - обнаружение единичных групп, состоящих из 10 и более клеток с яркой цитоплазматической флуоресценцией в каждом поле зрения. Результат положительный;

++ - обнаружение единичных групп, состоящих из 10 и более клеток с яркой цитоплазматической флуоресценцией в 5-10 полях зрения. Результат положительный;

+ - обнаружение единичных групп, состоящих из 3-5 клеток с яркой цитоплазматической флуоресценцией в 1-5 полях зрения. Результат положительный;

– - отсутствие в мазках-отпечатках клеток с цитоплазматической флуоресценцией. Свечение клеток тускло-зеленое, нечеткое. Результат отрицательный.

1.3. Обнаружение антигена вируса твёрдофазным иммуноферментным анализом (ТФ–ИФА)

Принцип метода - ТФ-ИФА (сэндвич-вариант) основан на взаимодействии иммобилизованных на поверхности лунок планшет специфических к вирусу АЧС иммуноглобулинов со специфическими антигенами АЧС и последующим выявлением комплекса «антиген-антитело» специфическим к вирусу АЧС конъюгатом антител, меченным пероксидазой хрена (конъюгат ПХ-АЧС). Пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена, в результате чего в лунках развивается окраска субстрата, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антигена в определяемой пробе. В случае отсутствия антигена, конъюгат ПХ-АЧС (т.е. ПХ) удаляется отмывочным

раствором и окраска отсутствует.

1.3.1. Отбор проб и подготовка для анализа

Для выполнения ТФ-ИФА используют пробы органов, подготовленные по п. 1.2.2.

1.3.2. Оборудование и материалы:

- автоматические пипетки, одно- и восьмиканальные, объемом 0,05-0,25 см³ с наконечниками;
- фотометр Multiscan MCC/340 (Labsystems, Финляндия) или аналогичный;
- холодильник бытовой;
- термостат с температурой нагрева (37±0,5) °С;
- пипетки градуированные вместимостью 1, 2, 5, 10 см³;
- цилиндры измерительные вместимостью от 10 до 1000 см³;
- флаконы стеклянные вместимостью 10-20 см³;
- вода дистиллированная;
- натрия хлорид;
- калия фосфат однозамещенный;
- натрия фосфат двузамещенный;
- моногидрат лимонной кислоты; дигидрат цитрата натрия; твин-20; мертиолят;
- трис, 2,2'-азиноди (3-этилбензти-азолинсульфоновой кислоты) диаммониевая соль (АБТС);
- перекись водорода;
- казеин;
- соляная кислота.

1.3.3. Приготовление растворов

Все растворы готовят на дистиллированной воде из солей квалификации хч или чда.

1.3.3.1. Забуференный физиологический раствор 0,01 М, рН 7,2-7,4 (ЗФР):
16,0 г натрия хлорида, 0,4 г калия фосфата однозамещенного, 5,8 г натрия фосфата двухзамещенного растворяют в 2,0 дм³ дистиллированной воды;

1.3.3.2. 0,01 М фосфатно-буферный раствор, рН 7,2-7,4 с твин-20 (ЗФР-Т):
В 2,0 дм³ ЗФР (п. 16.1.) добавляют 1,0 см³ Твин-20;

1.3.3.4. Казеин-мертиолятный буфер (КМБ), рН 7,6-7,8:
4,465 г хлористого натрия, 2,5 г казеина, 0,1 г мертиолята и 0,605 г триса разводят в 500,0 см³ дистиллированной воды. Оставляют на 3-4 часа для набухания казеина, нагревают до 60-70 °С и перемешивают до растворения казеина на магнитной мешалке. Остужают до комнатной температуры. Доводят рН до 7,6-7,8 соляной кислотой. Приготовленный раствор хранят в холодильнике

при $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение 2-х недель. Используют для забивки активных сайтов лунок полистироловых планшетов и разведения сывороток и конъюгата.

1.3.3.5. 0,05 М цитратный буферный раствор, рН 4,0-4,4:

0,265 г моногидрата лимонной кислоты и 0,29 г дигидрата цитрата натрия растворить в $45,0 \text{ см}^3$ дистиллированной воды.

1.3.3.6. Раствор хромофора (АБТС) готовят, растворяя 2,0 мг АБТС в $0,1 \text{ см}^3$ дистиллированной воды.

1.3.3.7. Хромогенный субстратный раствор.

Готовят непосредственно перед использованием, из расчета на один планшет к $10,0 \text{ см}^3$ цитратного буфера (п. 16.4.) добавляют $0,1 \text{ см}^3$ раствора хромофора (п. 16.5.) и $0,015 \text{ см}^3$ 33%-ной перекиси водорода, тщательно перемешивают и используют сразу же после приготовления. Раствор хранению не подлежит.

1.3.3.8. Растворение лиофилизированных компонентов.

Лиофилизированные компоненты набора перед использованием растворяют в ЗФР до объема, указанного на этикетке компонента.

1.3.4. Проведение анализа - выявление специфического антигена вируса АЧС ТФ ИФА

1.3.4.1. В лунки планшетов вносят по $0,1 \text{ см}^3$ ЗФР, содержащего специфические иммуноглобулины в рабочем разведении. Планшеты инкубируют при температуре $(4 \pm 2) ^\circ\text{C}$ в течение ночи. Затем лунки двукратно промывают ЗФР-Т, каждый раз внося в них по $0,3 \text{ см}^3$ раствора и выдерживая планшеты с буфером в течение 30-60 секунд. Для забивки активных сайтов полистирола в лунках панели инкубируют по $0,25\text{-}0,3 \text{ см}^3$ КМБ в течение 30 мин при температуре $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$. Затем планшеты отмывают один раз ЗФР, удаляют влагу постукиванием перевернутой панелью по фильтровальной бумаге;

1.3.4.2. В лунки планшетов вносят пробы исследуемых и контрольных (специфического и нормального) антигенов в двух повторностях в разведении 1:50 на КМБ;

1.3.4.3. Пластины инкубируют при $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ в течение 1 ч. Лунки планшетов четырехкратно промывают ЗФР-Т, каждый раз внося в лунки по $0,3 \text{ см}^3$ раствора и выдерживая планшеты с буфером в течение 30-60 секунд. Раствор из лунок удаляют резким встряхиванием. После последней отмывки раствор полностью удаляют постукиванием планшетов по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге;

1.2.4.5. Специфический иммунопероксидазный конъюгат готовят в рабочем разведении, указанном на этикетке, вносят его по $0,1 \text{ см}^3$ в лунки планшета, кроме лунки А1 (контроль субстрата) и инкубируют его в течение 1 ч при $(37 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$, после чего лунки шесть раз отмывают ЗФР-Т и после его

удаления вносят по 0,1 см³ хромогенного субстратного раствора. После 20-30 мин инкубирования при комнатной температуре проводят учет и оценку результатов.

1.3.4.6. Учет и оценка результатов реакции:

- при фотометрическом учете измеряют оптическую плотность хромогенного субстратного раствора при длине волны 405 нм. Реакцию считают положительной, если оптическая плотность хромогенного субстратного раствора в лунках, в которых предварительно инкубировали исследуемые и специфический антиген в 2 и более раз превышает оптическую плотность в лунках, в которых предварительно инкубировали нормальный антиген;
- при визуальном учёте реакцию считают положительной при окрашивании хромогенного субстратного раствора в лунках, в которых предварительно инкубировали исследуемые и специфический антиген в сине-зеленый цвет и отсутствии окрашивания субстрата в лунках, в которых предварительно инкубировали нормальный антиген.

2. Обнаружение генома вируса АЧС

2.1. ПЦР в формате электрофорезной детекции

Для выполнения используют «Тест-систему для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР» (производство ГНУ ВНИИВВиМ). Принцип реакции заключается в многократном повторении циклов денатурации исследуемой ДНК при температуре 94°C, гибридизации ДНК со специфическими праймерами при температуре 53°C и синтеза с них комплементарных цепей ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы при температуре 72°C. В результате амплификации концентрация синтезированного фрагмента в исследуемой пробе увеличивается в миллионы раз, что позволяет визуально учитывать результаты анализа с помощью электрофореза в агарозном геле.

Анализ по выявлению вируса АЧС включает выделение ДНК и амплификации специфического фрагмента в полимеразной цепной реакции и электрофорез в агарозном геле.

2.1.1. Отбор проб и подготовка для выполнения реакции

Для выполнения ПЦР используют кровь и пробы органов, подготовленные по п. 1.2.2.

2.1.2. Оборудование и материалы:

- ламинарный шкаф (БОВ-001-АМС, г.Миас);
- ПЦР-бокс.-Твердотельный термостат для пробирок типа «эппендорф» на 25 – 100С.- Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой (ОМ-1, г.Ульяновск).

- Микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф» до 16 т.г.- Центрифуга-вортекс
- Амплификаторы («Терцик», ДНК-технология; «Gradient Palm Cycler», Corbett Research).
- Камера для горизонтального электрофореза (S-2, Хеликон).
- Источник постоянного тока с напряжением 150-460 В.
- Ультрафиолетовый трансиллюминатор с кабинетом для просмотра гелей.
- Видеосистема с цифровой видеокамерой для регистрации результатов (BioRad, США).
- Аквадистиллятор.
- Холодильники на 2 – 8 С и на минус 20 С.
- Микроволновая печь для плавки агарозы.
- Автоматические пипетки переменного объема («Ленпипет»).
- Одноразовые наконечники для автоматических пипеток переменного объема.
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл, 0,5 мл, 0,2 мл.

2.1.3. Приготовление растворов

Приготовление буферного раствора для электрофореза

Для приготовления 1 л однократного буфера для электрофореза к 20 мл 50хТАЕ буфера добавить 980 мл дистиллированной воды и 40 мкл раствора бромида этидия.

Приготовление агарозного геля

К 100 мл однократного буфера для электрофореза добавляют 2 г агарозы, доводят до кипения и охлаждают до 45°C. Заливают в специальную форму с гребенкой и дают затвердеть. Форму с агарозой переносят в аппарат для горизонтального электрофореза погружают в буфер и осторожно вынимают гребенку.

2.1.4. Проведение анализа - выявление генома вируса АЧС

2.1.4.1. Выделение ДНК из исследуемого биологического материала

Во избежание перекрестной контаминации до начала работы маркируют чистые пробирки объемом 1.5 мл и вносят в них по 600 мкл раствора №1. После этого приступают к работе с инфицированным материалом.

Образцы исследуемого биологического материала (в объеме 200 мкл) добавляют в подготовленные пробирки, содержащие 600 мкл раствора №1 из набора к тест-системе. Инкубируют 10 мин при комнатной температуре (20±2)°С, периодически плавно перемешивая. Центрифугируют в настольной центрифуге типа "Эппендорф" 1 мин при 13000 об/мин. Надосадочную жидкость переносят в чистые пробирки, а осадок отбрасывают.

К надосадочной жидкости добавляют 40 мкл сорбента (сорбент перед использованием необходимо тщательно ресуспендировать), инкубируют при комнатной температуре (20+2)°С в течение 10 мин, 1-2 раза перемешивая на смесителе типа "Vortex". Центрифугируют 10-15 сек на микроцентрифуге при 6000 - 13000 об/мин, надосадочную жидкость отбрасывают.

К осадку добавляют 0,1 мл раствора №2 из набора, суспендируют и сорбент осаждают центрифугированием в течение 15 сек, надосадочную жидкость отбрасывают. Процедуру повторяют 2 раза.

К осадку добавляют 0.1 мл раствора №3 из набора, перемешивают, центрифугируют 15 сек, надосадочную жидкость отбрасывают. Процедуру повторяют 2 раза. Осадок подсушивают в течение 5-10 мин при 56°С в пробирке с открытой крышкой.

К осадку добавляют 30 мкл деионизированной воды для элюции ДНК с сорбента, перемешивают и инкубируют 10-15 мин при 56°С в закрытых пробирках. Центрифугируют в течение 0,5 мин при 13000 об/мин. Отбранную надосадочную жидкость используют для проведения ПЦР.

Не допускается многократное замораживание и размораживание выделенной ДНК.

ВНИМАНИЕ. На всех стадиях обработки биоматериала удаление супернатанта производить одноразовыми пластиковыми наконечниками при помощи вакуумного насоса в колбу-ловушку с дезинфицирующим раствором (3% хлорамин или 5% перекись водорода и т. п.).

2.1.4.2. Выполнение ПЦР

В отдельной пробирке готовят общую реакционную смесь на N образцов, в число которых входят положительный и отрицательный контроли. Реактивы вносят в последовательности, приведенной в таблице. Работу желательно проводить на холоде. Ферменты добавляют в последнюю очередь.

Реактивы	Кол-во на 1 пробу (мкл)	К-во на N проб (мкл)
Буфер для ПЦР с MgCl ₂	14,625	14,625 x(N+1)
Смесь праймеров с dNTPs	5,35	4,5x(N+1)
Фермент Taq-полимераза	0,25	0,25x(N+1)

Смесь перемешивают, избегая образования пены и немедленно раскапывают по 20 мкл в предварительно промаркированные пробирки, в каждую пробирку добавляют по 2-3 капли масла (примерно, 40 мкл).

Затем в них вносят под масло по 5 мкл ДНК соответствующих анализируемых или контрольных образцов. Пробы вносят в амплификатор со следующим температурным режимом:

94°C - 3 мин	1 цикл
94°C - 20 сек	
53°C - 30 сек	30 циклов
72°C - 45 сек	
72°C - 2 мин	1 цикл

2.1.4.3. Электрофорез продуктов амплификации

К 7 мкл полученной амплификационной смеси (водной фазы) добавляют 1,5 мкл буфера для нанесения образца, пипетируют и полученный образец вносят в лунки агарозного геля, образовавшиеся от зубцов гребёнки.

Электрофорез проводят при напряжении 8 вольт/см длины геля в течение 30 мин. За это время краситель успевает пройти от старта не менее половины геля. Направление движения образцов в геле от "-" к "+"!

2.1.4.4. Учёт результатов

Результаты электрофореза просматривают в ультрафиолетовом свете с длиной волны 254 нм на приборе "Трансиллюминатор". Результаты реакции выявляются в виде светящихся полос оранжевого цвета.

Реакция считается положительной, если полоса в соответствующем треке располагается в геле точно на таком же расстоянии от старта, что и полоса положительного контроля амплификации. Размер аппликонов после проведения ПЦР- 485 п.н.

Реакция считается отрицательной, если в соответствующих треках полос не обнаружено или полосы не соответствуют по размеру фрагменту в контрольной пробе (т. е. располагаются на другом расстоянии от старта).

Обнаружение в треке отрицательного контроля окрашенных фрагментов на уровне полос положительного контроля свидетельствует о перекрестной контаминации в процессе анализа. Результаты не учитывают, выполнение ПЦР повторяют (пп.2.1.4.).

Для документирования полученных результатов возможно использование любой системы гель-документирования используют любой цифровой фотоаппарат с оранжевым светофильтром, либо другие фото- и видеосистемы.

2.2. ПЦР в формате реального времени

Принцип реакции заключается в использовании специфического флюоресцентно- меченного зонда, сайт гибридизации которого лежит между сайтами связывания основных диагностических праймеров. В случае присутствия в исследуемом образце генома возбудителя, зонд будет связываться с его

ДНК и прибор регистрирует накопление флуоресцентного сигнала в ходе реакции. Регистрация сигнала происходит через стенки пробирки в режиме реального времени.

2.2.1. Отбор проб и подготовка для выполнения реакции по п. 2.1.1.

2.2.2. Оборудование и материалы:

- Ламинарный шкаф (БОВ-001-АМС, г. Миас).
- ПЦР-бокс.
- Твёрдотельный термостат для пробирок типа «эппендорф» на 25 – 100С.
- Вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой (ОМ-1, г. Ульяновск).
- Микроцентрифуга для пробирок типа «эппендорф» до 16 т.г.
- Центрифуга-вортекс
- RealTime Амплификаторы («Rotor Gene 6000», Corbett Research; «IQ5» BioRad).
- Холодильники на 2 – 8 С и на минус 20 С.
- Автоматические пипетки переменного объёма («Ленпипет»).
- Одноразовые наконечники для автоматических пипеток переменного объёма.
- Одноразовые полипропиленовые пробирки на 1,5 мл и 0,2 мл.

2.2.3. Проведение анализа - выявление генома вируса АЧС

2.2.3.1. Выделение ДНК из исследуемого биологического материала.

Процедуру выделения ДНК выполняют по описанию приведённому в разделе 2.1.4.1.

2.2.3.2. Выполнение ПЦР

Для выполнения используют Набор № II из Тест-системы для выявления ДНК вируса АЧС методом ПЦР в реальном времени.

В отдельной пробирке готовят общую реакционную смесь на N-количество образцов, в число которых входят отрицательный контроль выделения и дополнительно две пробирки для контроля этапа ПЦР. Реактивы вносят в последовательности, приведенной в таблице. Фермент добавляют в последнюю очередь.

<i>Реактивы</i>	Кол-во на 1 пробу (мкл)
Буфер 1	18 (N+1)
Буфер 2	2 (N+1)
Фермент Таq-полимераза	0,25 (N+1)

Смесь перемешивают, избегая образования пены и раскапывают по 20,0 мкл в пробирки (плашки). Затем в них вносят по 5,0 мкл ДНК соответствующих анализируемых или контрольных образцов.

В контрольные пробирки этапа ПЦР добавляют:

- а) положительный контроль – внести в пробу 5,0 мкл раствора «Положительный контроль ПЦР»;
- б) отрицательный контроль – внести в пробу 5,0 мкл раствора «Буфер для ДНК» из набора Тест-системы.

Пробирки с испытуемыми образцами загружают в реакционный модуль прибора.

Программируют прибор для выполнения соответствующей программы амплификации и детекции флуоресцентного сигнала.

ПЦР в формате реального времени проводят с использованием приборов «Rotor Gene 6000» или «IQ5». Оптимальный температурный режим и количество циклов для обоих этих приборов:

1. 95 С - 3 минуты
2. 94 С - 10 секунд
65 С - 20 секунд
72 С - 13 секунд
Число циклов – 15
3. 94 С - 10 секунд
65 С - 20 секунд – Детекция!
72 С - 13 секунд
Число циклов – 35

Флуоресценцию измеряют при 65 С по каналу FAM.

По окончании выполнения программы приступить к учёту результатов.

2.2.3.3. Учёт результатов

Учёт результатов проводят по анализу кривых накопления флуоресцентного сигнала по каналу FAM с помощью программного обеспечения используемого прибора.

Положительными считают результаты реакции при значениях C_t , не превышающих 35.

Образцы, для которых не определено значение C_t (кривая флуоресценции не пересекает пороговую линию) – результаты считают отрицательными

3. Выделение и идентификация вирусов АЧС, КЧС и БА в зараженных культурах клеток

Принцип метода заключается в инокуляции культуры лейкоцитов (или костного мозга) свиньи, содержащей эритроциты и обнаружении гемадсорбции или вирусспецифического антигена в клетках РПИФ (вирусспецифическую АЧС гемадсорбцию или лизис клеток, вызванный вирусом АЧС, подтверждают РПИФ или ПЦР).

3.1. Выделение и идентификация вируса АЧС

3.1.1. Инокуляция культуры ЛС (или ККМС) испытуемыми пробами биоматериала

Культуру клеток ЛС (или ККМС), выращенную на стеклянных пластинках из покровных стекол в пробирках (или в чашках Карреля), инокулируют экстрактами суспензий органов и кровью (п. 1.2.2.) без удаления ростовой среды. На каждую пробу берут по 4 чашки или 8-10 пробирок: в 2 чашки вносят по 1,0 см³, в оставшиеся 2 чашки – по 0,1 см³, в пробирки по 0,1 см экстракта суспензии. Инкубируют при (37±0,5)⁰С. Через 24, 48, 72, 96 и 192 часа после инокуляции культуру клеток просматривают под световым микроскопом на наличие гемадсорбции.

3.1.2. Идентификация вируса АЧС в культуре клеток в РПИФ

Стеклянные пластинки с культурой ЛС (или ККМС), инокулированной испытуемыми материалами, извлекают из пробирок через 24, 48, 72, 96 часов, укрепляют в расщепы спичек с условными номерами. Препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре, помещают в химический стакан и фиксируют химически чистым холодным ацетоном в течение 10-15 минут, высушивают и ставят РПИФ и РНИФ.

При отсутствии культур клеток, выращенных на стеклянных пластинках в пробирках, клетки ЛС (или ККМС) механически снимают со стекла чашек Карреля через 72-192 часа после инокуляции испытуемого материала, сливают в пенициллиновые флаконы, суспензию центрифугируют при 1500 об/мин в течение 10 минут. Надсадок (ростовая среда) удаляют, суспензию клеток наносят на обезжиренные покровные стекла, вставленные в расщепы спичек с условными номерами, высушивают и фиксируют в ацетоне (п. 1.4.3.1.). Отрицательные тест-препараты готовят аналогично, исключая этап заражения культуры клеток ЛС или ККМС.

РПИФ выполняют, используя для иммуофлуоресцентной обработки препаратов ФИТЦ-иммуноглобулины АЧС в рабочем разведении, указанные на этикетке ампулы.

3.1.3. Учёт и оценка результатов

Учёт и оценку результатов люминесцентной микроскопии проводят, как описано в п. 1.2.4.3.

При получении отрицательного результата (отсутствие гемадсорбции, лизиса и специфического свечения клеток при люминесцентной микроскопии) проводят два последовательных прямых пассажа в культуре клеток ЛС (или ККМС) с одновременным исследованием каждого в РПИФ.

3.2. Выделение и идентификация вируса КЧС

3.2.1. Инокуляция культуры клеток РК-15 испытываемыми пробами биоматериала

В каждую пробирку с выращенной на покровных стеклах культурой клеток РК-15, вносят по $0,5 \text{ см}^3$ суспензий органов или крови (п.1.2.2.), инокулируют с предварительным удалением ростовой среды. На каждую пробу берут 8 пробирок. Пробирки помещают в термостат при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ на 2 ч. Затем, удалив вирусосодержащую жидкость, вносят $2,0 \text{ см}^3$ среды Игла (МЕМ), содержащей 2,0% сыворотки эмбриона КРС (поддерживающая среда). Пробирки инкубируют при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ и через 24, 48 и 72 часа после заражения культуру клеток просматривают под световым микроскопом на наличие неспецифической дегенерации клеток или ЦПД. В случае появления дегенерации клеток поддерживающую среду меняют на свежую.

3.2.2. Идентификация вирусов КЧС в культуре клеток РК-15 в РПИФ

Пластинки с культурой клеток РК-15, инокулированной испытываемыми материалами, через 24, 48 и 72 часа извлекают из пробирок, укрепляют в расщепы спичек с условными номерами. Препараты высушивают на воздухе при комнатной температуре, помещают в химический стакан и фиксируют химически чистым холодным ацетоном в течение 10-15 минут, высушивают и выполняют РПИФ.

РПИФ выполняют, используя ФИТЦ-иммуноглобулины КЧС в рабочем разведении, указанном на ампуле.

3.2.3. Учет и оценка результатов

В зависимости от количества вируса и времени культивирования специфический антиген обнаруживается по яркому желто-зеленому диффузному свечению цитоплазмы пораженных клеток, расположенных группами различной величины (флуоресцирующие микробляшки). При наличии в исходном материале вируса в высокой концентрации ($5,0-6,0 \text{ Ig ЛД}_{50}/\text{см}^3$) отчетливое нежногранулярное свечение цитоплазмы нескольких клеток (5-10), образующих флуоресцирующую микробляшку, обнаруживаются через 24 часа после заражения. Количество таких клеток через 48 часов культивирования увеличивается до 20-40. Через 72 часа после заражения количество пораженных клеток в флуоресцирующих микробляшках увеличивается до 50-100. Обнаруживаются также флуоресцирующие микробляшки, состоящие из 3-6 пораженных клеток (вторичные флуоресцирующие микробляшки). При поражении всех клеток монослоя интенсивность флуоресценции заметно снижается.

Обнаружение в препаратах культуры клеток РК-15 через 24, 45 или 72 часа после заражения флуоресцирующих микробляшек считается положительным результатом люминесцентной микроскопии на КЧС.

Обнаружение в препаратах культуры клеток РК-15 через 24, 48 и 72 часа после инокуляции испытуемого материала нечеткого, зеленовато-сизого или тусклого свечения цитоплазмы считается отрицательным результатом люминесцентной микроскопии на КЧС. В случае получения отрицательного результата проводят два последовательных прямых пассажа в культуре клеток РК-15 с одновременным исследованием на КЧС в РПИФ или РНИФ.

4. Обнаружение специфических антител к вирусу АЧС

4.1. Постановка реакции непрямой иммунофлуоресценции (РНИФ)

Принцип реакции заключается в связывании иммуноглобулинов (антител), содержащиеся в исследуемой сыворотке свиньи после заражения вирусом АЧС, с вирусспецифическим антигеном тест-препарата АЧС и обнаружении комплекса «антиген-антитело» его обработкой антисвинными ФИТЦ-иммуноглобулинами, последующим обнаружением комплекса люминесцентной микроскопией.

4.1.1. Для серологических исследований берут пробы крови от 5-10 животных, по 5-8 см³ с соблюдением правил асептики из коронарной поллой вены, хвостовой или ушной вены, после установления признаков хронического течения болезни.

4.1.2. Для получения сыворотки пробы крови выдерживают 1 час в термостате при $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ или при комнатной температуре $(18-20)^{\circ}\text{C}$ до образования сгустка, делают обводку сгустка и переносят в холодильник на 10-14 часов при $(4\pm 2,0)^{\circ}\text{C}$. После наступления максимальной ретракции сыворотку отсасывают и используют для исследований.

4.1.3. Приготовление культуральных тест-препаратов вирусов АЧС

Культуру клеток РК-15 выращивают на стеклянных пластинках из покровных стекол в пробирках на среде Игла (МЕМ) с 5,0% сыворотки эмбриона КРС. После формирования монослоя среду удаляют и вносят 1,0 см³ вируса АЧС (штамм ФК 32/135, культура клеток ККМС, активность 6,0-7,0 Ig ГАЕ₅₀/см³), разведенного средой Игла (МЕМ) 1:1000. Через 2 часа инкубирования при $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$ в пробирки вносят 2,0 см³ среды Игла (МЕМ) с 2,0% сыворотки эмбриона КРС. Через 72 часа инкубирования, пластины с хорошим состоянием монослоя извлекают из пробирок, укрепляют в расщепы спичек, высушивают на воздухе при комнатной температуре (30-60 мин) и фиксируют охлажденным ацетоном в течение 10-15 мин при температуре от 4 до 8⁰С (положительные тест-препараты) (п.17.1.) и проверяют их пригодность для постановки РНИФ. При наличии в культуральных тест-препаратах антигена

вируса АЧС 5-10 и более флуоресцирующих (антигенсодержащих) клеток в каждом поле зрения люминесцентного микроскопа при увеличении 5×40 их используют для постановки РНИФ.

4.1.4. Постановка и учёт РНИФ

Культуральные тест-препараты (специфические и нормальные) помещают на капли испытуемых сывороток в разведении 1:20, а также контрольных (специфические и нормальная) сывороток в рабочем разведении, нанесенные на края предметных стекол во влажной камере. Стекла помещают во влажную камеру на 30 мин при $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$. Затем мазки-отпечатки снимают с предметных стекол, ополаскивают в 0,01М ФСБ (рН 7,0-7,5) и свободными концами спичек укрепляют в гнездах деревянного штатива. Штатив помещают в цилиндрическую банку с 0,01 М ФСБ (рН 7,0-7,5), установленную на магнитную мешалку. Отмывание тест-препаратов от несвязавшихся или неспецифически связавшихся антител проводят в 0,01М ФСБ рН 7,0-7,5 в течение 20 минут со сменой буферного раствора через 10 минут. Затем тест-препараты подсушивают на воздухе и помещают на капли раствора антисвиных ФИТЦ-иммуноглобулинов (рабочее разведение), нанесенные на края предметных стекол. Стекла помещают во влажную камеру на 30 мин при $(37\pm 0,5)^{\circ}\text{C}$, затем препараты отмывают как описано выше в темном месте и готовят для люминесцентной микроскопии (п.17.2.).

Учёт и оценку результатов РНИФ проводят по интенсивности свечения антигенсодержащих клеток культуральных тест-препаратов АЧС по условной четырехкрестовой шкале:

- ++++ - яркое желто-зеленое свечение вирусспецифических антигенов, клеток специфических тест-препаратов АЧС. Специфические антитела в испытуемой пробе в титре выше 1:20. Результат положительный;
- ++ - умеренное зеленое свечение вирусспецифических антигенов клеток специфических тест-препаратов АЧС антитела в предельных разведениях сыворотки при количественном исследовании испытуемых проб. Результат положительный; аналогичное свечение при качественном исследовании испытуемой пробы сыворотки в разведении 1:20 – результат сомнительный;
- отсутствие специфического свечения антигенсодержащих клеток тест-препаратов АЧС – результат отрицательный.

В случае сомнительного результата необходимо исследовать сыворотку крови животного через две недели после первого взятия. При получении повторного сомнительного результата сыворотку считают отрицательной.

В случае положительного результата при качественном исследовании сывороток в разведении 1:20 проводят количественное исследование испытуемых материалов в разведениях 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320 и т.д.

4.2. Обнаружение специфических антител непрямой методом ТФ ИФА в сыворотке крови больных и переболевших АЧС животных

Принцип метода - непрямой вариант ТФ ИФА основан на взаимодействии иммобилизованного на поверхности лунок планшет стандартного специфического антигена АЧС со специфическими к вирусу АЧС антителами в сыворотках крови обследуемых свиней и последующим выявлением комплекса «антиген-антитело» конъюгатом антисвиных антител с пероксидазой хрена (конъюгат антисвиной-ПХ). Связанная пероксидаза вызывает разложение находящейся в хромоген-субстратном растворе перекиси водорода и окисление хромогена. В лунках развивается окраска, интенсивность которой прямо пропорциональна количеству антител в определяемой пробе сыворотки.

4.2.1. Исследуемые пробы сывороток крови и их подготовка для анализа по п.п. 4.1.1., 4.1.2.

4.2.2. Оборудование и материалы по п. 1.3.2.

4.2.3. Приготовление растворов по п. 1.3.3.

4.2.4. Выполнение анализа – обнаружение специфических антител к вирусу АЧС

4.2.4.1. В лунки планшетов вносят по 0,1 см³ ЗФР, содержащего специфический антиген в рабочем разведении. Планшеты инкубируют при температуре $(4\pm 2)^\circ\text{C}$ в течение ночи. Затем их двукратно промывают ЗФР-Т, каждый раз внося в лунки по 0,3 см³ раствора и выдерживая планшеты с буфером в течение 30-60 секунд. Для забивки активных сайтов полистирола в лунках планшетов инкубируют по 0,25-0,3 см³ КМБ в течение 30 мин при температуре $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$. Затем планшеты отмывают один раз ЗФР, удаляют влагу постукиванием перевернутой панелью по фильтровальной бумаге;

4.2.4.2. В лунки планшетов вносят пробы исследуемых и контрольных (специфической и нормальной) сывороток в двух повторностях в разведении 1:50 на КМБ. Пластины инкубируют при $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$ в течение 1 ч. Лунки планшетов четырехкратно промывают ЗФР-Т, каждый раз внося в лунки по 0,3 см³ раствора и выдерживая планшеты с буфером в течение 30-60 секунд. Раствор из лунок удаляют резким встряхиванием. После последней отмывки раствор полностью удаляют постукиванием планшет по сложенной в несколько слоев фильтровальной бумаге;

4.2.4.3. Иммунопероксидазный антисвиной конъюгат готовят в рабочем разведении, указанном на этикетке, на КМБ, и вносят его по 0,1 см³ в лунки планшета, кроме лунки А1 (контроль субстрата). Инкубируют его в течение 1 ч при $(37\pm 0,5)^\circ\text{C}$, после чего лунки шесть раз отмывают ЗФР-Т и после его удаления вносят по 0,1 см³ хромогенного субстратного раствора. После 20-

30 мин инкубирования при комнатной температуре проводят учет и оценку результатов.

4.2.4.4. Учёт и оценка результатов реакции:

- при фотометрическом учёте измеряют оптическую плотность хромогенного субстратного раствора при длине волны 405 нм. Реакцию считают положительной, если оптическая плотность хромогенного субстратного раствора в лунках, в которых предварительно инкубировали исследуемые и специфическую сыворотку в 2 и более раз превышает оптическую плотность в лунках, в которых предварительно инкубировали нормальную сыворотку;

- при визуальном учёте реакции реакцию считают положительной при окрашивании хромогенного субстратного раствора в лунках, в которых предварительно инкубировали специфическую сыворотку в сине-зеленый цвет и отсутствии окрашивания субстрата в лунках, в которых предварительно инкубировали нормальную сыворотку.

5. Диагностическая оценка результатов исследований на АЧС

5.1. Обнаружение вируса:

обнаружение антигена вируса АЧС в мазках-отпечатках испытуемого материала в РПИФ с интенсивностью свечения на два-четыре креста оценивается как положительный результат. Положительные и отрицательные результаты РПИФ при первичной вспышке оценивают как предварительные, требующие подтверждения ПЦР и выделения вируса с использованием метода культуры клеток или биопробы. При вторичной вспышке - совпадении положительных или отрицательных результатов РПИФ с результатами других методов (ПЦР или ТФ-ИФА) оценивают как окончательные результаты;

- выделение вируса в культуре ЛС или ККМС, инокулированной испытуемым материалом, и его идентификация в РПИФ или реакции гемадсорбции или ПЦР оценивается как положительный результат и ставится диагноз – африканская чума свиней. В случае получения отрицательных результатов, после проведения трех последовательных пассажей испытуемого материала в культуре ЛС (ККМС) или биопробы на свиньях ставится отрицательный диагноз.

5.2. Выявление специфических антител в испытуемом материале в РПИФ оценивается как положительный предварительный диагноз. Для постановки окончательного диагноза необходимо проведение биопробы с последующей реизоляцией и идентификацией вируса в культуре ЛС (ККМС) в РПИФ или реакции гемадсорбции. При получении отрицательных результатов в РПИФ диагноз ставится на основании результатов выделения и идентификации вируса в культуре ЛС (ККМС) в РПИФ или реакцией гемадсорбции.

Меры личной безопасности

1. При работе с компонентами набора следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с ветеринарными препаратами.

2. Все работы необходимо проводить в соответствующей спецодежде с обязательным использованием средств индивидуальной защиты.

3. На рабочем месте запрещается принимать пищу, пить и курить. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

Контрольные вопросы. 1. Правила взятия, оформления и отправки в лабораторию патматериала для исследования? 2. Как ставят диагноз на АЧС? 3. Дифференциальная диагностика АЧС. 4. Методы лабораторной диагностики АЧС. 5. На чем основана лабораторная диагностика на АЧС?

Список использованной литературы

1. СВИНЬИ. Методы лабораторной диагностики африканской чумы свиней (ГОСТ 28573-90. Государственный комитет СССР по управлению качеством продукции и стандартам, Москва, 1990;
2. Методические указания по выявлению вируса африканской чумы свиней ПЦР (Москва, 2000).
3. Правила ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов (Москва, 1988).
4. Куринов В.В., Черных О.Ю., Шевченко А.А. и др. Вспышка африканской чумы свиней в хозяйстве закрытого типа//Труды Кубанского государственного аграрного университета. Серия: Ветеринарные науки, 2009. – №1 (ч.1). - С.57-61.
5. Шевченко А.А., Шевченко Л.В., Черных О.Ю., Шевкопляс В.Н. Лабораторная диагностика инфекционных болезней животных. Учебное пособие. Краснодар. – 2009. – 575 С.
6. Громыко Е.В., Шевченко А.А., Гринь В.А., Черных О.Ю. Африканская чума свиней в Краснодарском крае/ Ветеринария Кубани. – Краснодар. - №1. – 2012. – С. 3-4.

Авторы: А. А. Шевченко, О. Ю. Черных, Г.А. Джаилиди,
В.О. Черных, Л.В. Шевченко.
Учебное пособие «Диагностика африканской чумы свиней».

© Кубанский государственный аграрный университет

350044, Краснодар, ул. Калинина, 13