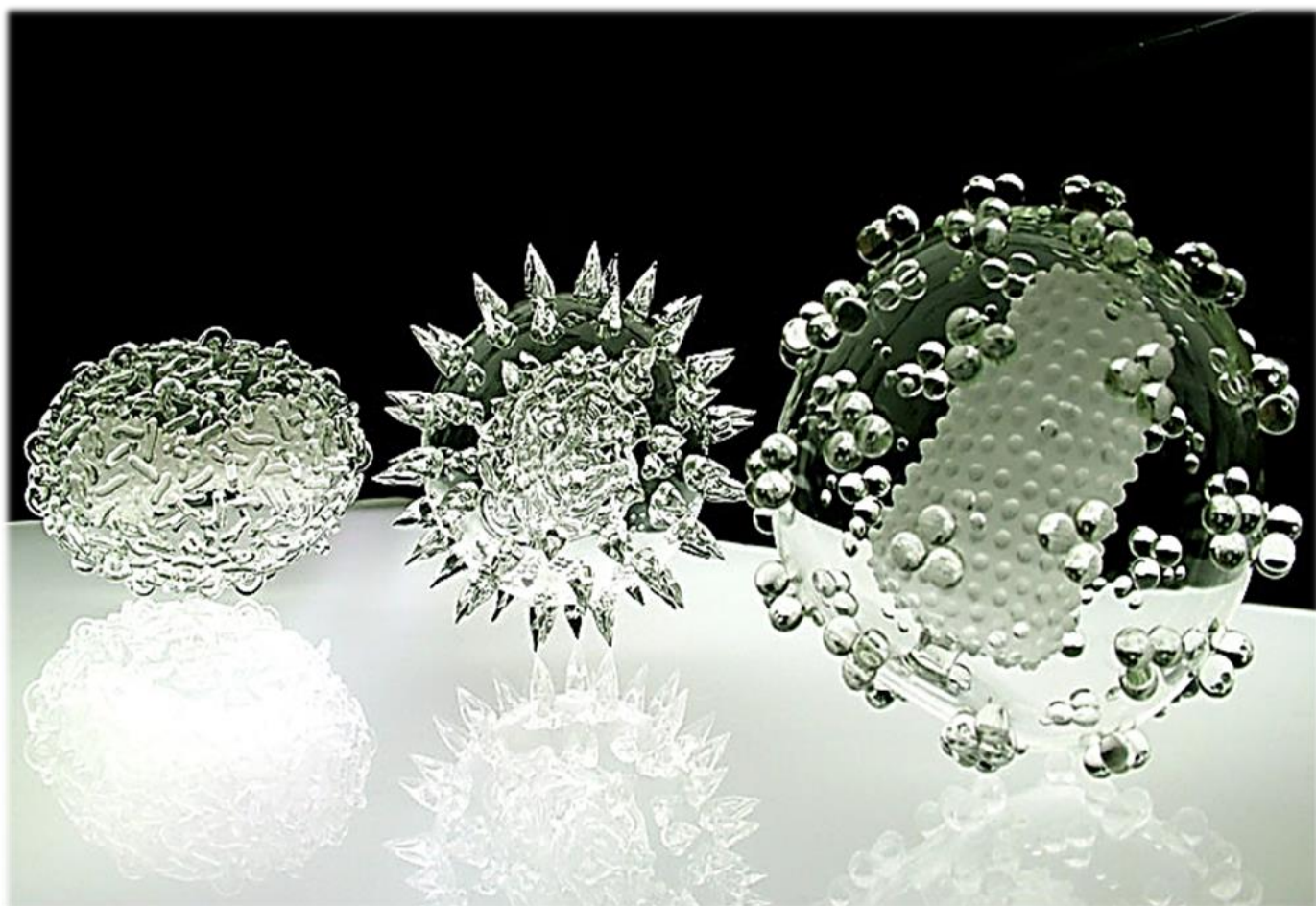


О. Н. НИКОЛАЕВА, А. В. АНДРЕЕВА

# ВЕТЕРИНАРНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

(МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ)

Учебное пособие



МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

О. Н. НИКОЛАЕВА, А. В. АНДРЕЕВА

# ВЕТЕРИНАРНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ (методы диагностики вирусных инфекций)

Учебное пособие

Рекомендовано научно-методическим советом ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ  
в качестве учебного пособия для обучающихся по специальности «Ветери-  
нария» и направлению подготовки (аспирантура) «Ветеринария и зоотехния»

Уфа  
Башкирский ГАУ  
2018

**УДК 619:616.9-07(07)**  
**ББК 48.73я7**  
**Н63**

Рекомендовано научно-методическим советом  
ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ в качестве учебного пособия  
для обучающихся по специальности «Ветеринария» и направлению  
подготовки (аспирантура) «Ветеринария и зоотехния»  
(протокол № 8 от 11 апреля 2018 г.).

**Рецензенты:**

**А. К. Галиуллин** – д-р ветеринар. наук, профессор,  
зав. кафедрой микробиологии ФГБОУ ВО «Казанская государственная  
академия ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана»;

**М. В. Сычева** – д-р биол. наук, профессор,  
зав. кафедрой микробиологии и заразных болезней  
ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный аграрный университет»

**Николаева О. Н., Андреева А. В.**

**Н63**      **Ветеринарная вирусология и биотехнология (методы диагно-**  
**стики вирусных инфекций): учебное пособие / О. Н. Николаева,**  
**А. В. Андреева. – Уфа : Башкирский ГАУ, 2018. – 80 с. : ил.**

**ISBN 978-5-7456-0602-1**

В учебном пособии даны сведения об основных лабораторных методах диагностики вирусных болезней животных и птиц. Описаны цели, схемы и этапы постановки, учёт диагностических реакций, а также их достоинства и недостатки.

Учебное пособие предназначено для обучающихся по специальности «Ветеринария» и направлению подготовки (аспирантура) «Ветеринария и зоотехния», а также для ветеринарных специалистов.

**УДК 619:616.9-07(07)**  
**ББК 48.73я7**

**ISBN 978-5-7456-0602-1**

© Николаева О. Н., Андреева А. В., 2018  
© Башкирский государственный  
аграрный университет, 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение .....	4
Реакция гемагглютинации (РГА) .....	5
Реакция задержки гемагглютинации (РЗГА) .....	10
Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) .....	15
Реакция гемадсорбции (РГАд) и реакция задержки гемадсорбции (РЗГАд) .....	20
Реакция иммунодиффузии (РИД) и иммуноэлектрофорез .....	22
Реакция иммунофлуоресцирующих антител (РИФ) .....	30
Реакция связывания комплемента (РСК) .....	34
Реакция нейтрализации (РН) .....	39
Иммуноферментный анализ (ИФА) .....	46
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) .....	54
Метод ДНК-зондов .....	73
Библиографический список .....	77

## **ВВЕДЕНИЕ**

Диагностика вирусных инфекций является одной из самых сложных проблем клинической ветеринарной медицины. Особо опасные вирусные инфекции несут в себе потенциальную угрозу для продовольственной и экономической безопасности страны.

Чаще всего на основании клинических признаков и эпизоотологических данных можно поставить только предварительный диагноз на вирусную инфекцию, так как многие вирусные болезни имеют схожую клиническую картину. Также болезнь может быть вызвана не одним, а двумя и более инфекционными агентами, в том числе их ассоциацией. Поэтому требуются лабораторные исследования для определения возбудителя. Лабораторные методы исследований при вирусных инфекциях играют ведущую, а в ряде случаев решающую роль.

В настоящее время для диагностики вирусных инфекций применяются различные методы. В практической работе наиболее доступными и распространёнными являются серологические методы диагностики и молекулярно-генетические методы исследований.

В связи с вышеизложенным, авторы включили в данное учебное пособие основные методы лабораторной диагностики вирусных инфекций.

## РЕАКЦИИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РГА)

Впервые этой реакцией занялись в бактериологии Краус и Людвиг в 1920 году на примере стафилококков и микоплазм, которые вызвали агглютинацию эритроцитов. В виду своей неспецифичности реакция была забыта и к ней вернулись вновь при вирусологических исследованиях. В 1941 году Херст, Мак. Клиленд и Хейр сообщили, что вирус гриппа агглютинирует эритроциты кур. Феномен склеивания эритроцитов изучали во многих лабораториях мира, в том числе и в СССР. Реакцией занимались в 1943 году Шубладзе и Соловьев, в 1945 году Дробышевский, в 1947 году Нарциссов. Было выяснено, что вирус гриппа агглютинирует не только эритроциты кур, но и других видов млекопитающих и птиц. Дальнейшие исследования позволили установить, что гемагглютинирующими свойствами обладают многие вирусы, но они обладают различной чувствительностью по отношению к эритроцитам разных видов животных. Указанная особенность используется при дифференциальной диагностике вирусных болезней. При помощи РГА обнаруживают вирусы чумы птиц, оспы голубей, кур, гриппа поросят, людей, инфекционного гепатита утят и т.д.

**Сущность РГА** заключается в способности некоторых вирусов адсорбироваться на поверхности эритроцитов разных видов животных и птиц, вызывать их склеивание и образовывать осадок в виде перевернутого зонтика розового цвета.

Реакция вирусов гемагглютинации неспецифична. Специфичность реакций устанавливается с помощью иммунных сывороток; гемагглютинация в присутствии специфической к данному вирусу сыворотки подавляется.

Несмотря на указанную способность, **РГА широко используется:**

- для обнаружения вируса в исследуемом материале, для определения его количества.

- для изучения взаимодействия вируса и клетки.

- для изучения энзимных свойств.

- для очистки и концентрации вируса.

**РГА протекает в 3 стадии:**

Адсорбция вируса на эритроцитах:

Склеивание эритроцитов, на которых адсорбировались вирусы;

Сползание вирусов с поверхности эритроцитов.

**Механизм РГА**

Установлено, что во внешней оболочке вируса имеются сложные белковые тела – гемагглютинины, ферменты. Вирусные гемагглюти-

нины – это сложные белки, располагающиеся на поверхности вируса, которыми он адсорбируется на отдельных участках эритроцитов (т.е. рецепторах). На поверхности вирусов кроме гемагглютининов имеются энзиматические части (фермент нейроминидаза), который разрушает рецепторы эритроцита, состоящие из мукопротеидов. В результате этого происходит элюция вируса. На эритроцитах с разрушенными рецепторами второй раз вирус уже не адсорбируется, но они могут участвовать в реакции с другой дозой эритроцитов. Для вирусологических исследований в основном используют эритроциты птиц (кур) и других видов животных. Установлено, что для постановки РГА можно использовать не только свежие эритроциты, но и обработанные формалином, которые хранятся длительное время (рисунок 1).

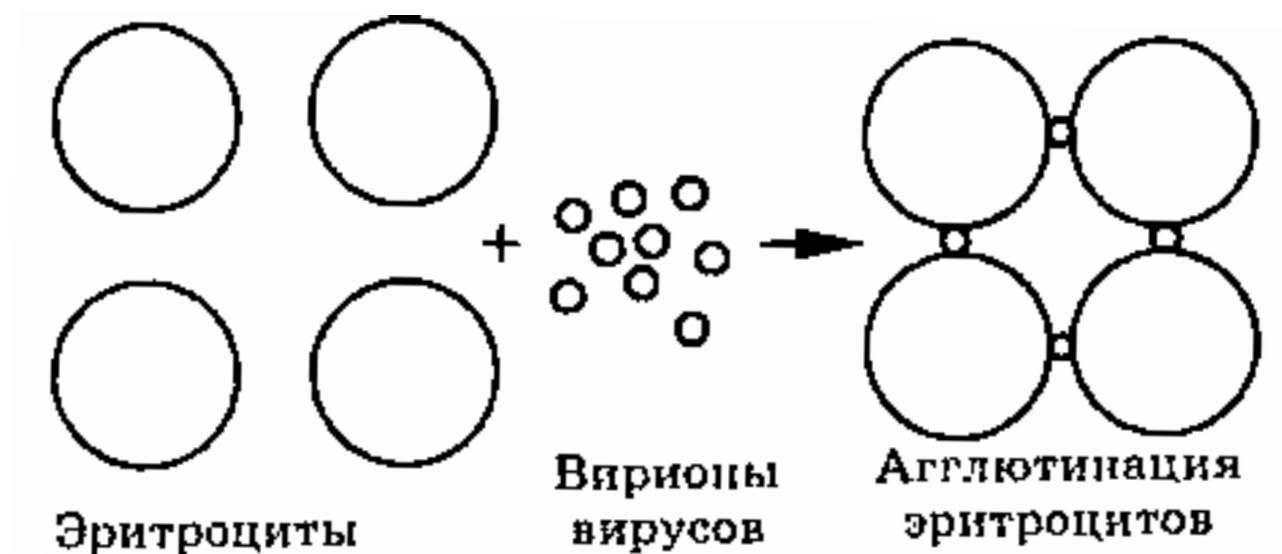


Рисунок 1

Механизм реакции гемагглютинации (Р.В. Белоусова с соавт., 2006)

### **Компоненты РГА**

- Вирус или вируссодержащий материал.
- 1% взвесь эритроцитов кур, морских свинок или других видов животных в зависимости от гемагглютинирующих свойств вируса.
- Изотонический раствор хлорида натрия рН 7.2–7.4

### **Приготовление 1% взвеси эритроцитов**

Кровь берут из подкрыльцовой вены петухов старше 6 месяцев, или из сердца морской свинки или из яремной вены барана. Место взятия крови предварительно дезинфицируют. Кровь собирают в стерильную колбу, на дне которой находятся стерильные бусы, чтобы

предотвратить свертывание крови. Вместо бус можно использовано лимоннокислый натрий следующего состава: 0,85 г хлорида натрия, 6 г цитрата натрия на 100 мл воды. Кровь в колбе непрерывно встряхивают до ее остывания, в результате кровь дефибринируется. Дефибринированную кровь центрифугируют, полученный осадок эритроцитов трехкратно отмывают изотоническим раствором хлорида натрия с последующим осаждением и центрифугированием. Из отмывтых эритроцитов готовят 1% взвесь на физиологическом растворе и используют в реакции гемагглютинации. Эритроциты можно хранить при +4° С 2–3 суток. Для длительного хранения эритроцитов применяют консервирующий раствор Альсевера, приготовленный по прописи: глюкоза – 10, 25 г, лимоннокислый натрий 4,0 г, лимонная кислота – 0,275 г, хлористый натрий – 2,2 г, дистиллированная вода до 500 мл.

Стерилизуют в аппарате Коха в течение 3 дней. Консервируют свежую кровь раствором Альсевера в соотношении 1:5 (кровь барана 1:1). Консервированная кровь может храниться в холодильнике 8–12 недель.

Для РГА используют и формализированные эритроциты, которые получают следующим образом. Из полученной крови путем центрифугирования получают суспензию эритроцитов, их отмывают физиологическим раствором, затем фиксируют 3% растворами формалина в течении 8 часов при температуре – 37°С, встряхивая каждые пол часа по 4 минуты. Фиксированные формалином эритроциты представляют 10% взвесь. Перед постановкой реакции из нее готовят 1% взвесь эритроцитов.

### **Техника постановки реакции гемагглютинации**

РГА можно ставить 2 методами: капельным и пробирочным (или в пластинках Шервинского).

Капельный метод. На чистое обезжиренное предметное стекло наносят каплю 5 % взвеси эритроцитов и каплю испытуемого антигена или вируссодержащего материала, затем тщательно смешивают стеклянной палочкой. Если реакция положительная, то через 1,5–2 минуты можно наблюдать хлопья агглютинированных эритроцитов. Этот метод является ориентировочным и применяется для идентификации вирусов, обладающих гемагглютинирующей активностью.

Пробирочный или пластинчатый метод. РГА применяют для изучения гемагглютинирующих свойств вируса и для определения его титра с целью приготовления рабочей дозы вируса для постановки РГА.



При постановке РГА в ряде лунок готовят двукратно возрастающие разведения вирусосодержащего материала от 1:10 до 1:1280. С этой целью в ряд лунок вносят по 0,5 мл физиологического раствора. В первую лунку вносят 0,1 мл вирусосодержащего материала, перемешивают содержимое луночки и переносят в каждую последующую лунку по 0,5 мл, из последней луночки 0,5 мл выливают в дезинфицирующий раствор. Затем в каждую луночку вносят по 0,5% взвеси эритроцитов кур (таблица 1).

Параллельно ставят контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию, для чего в лунку вносят 0,5 мл физиологического раствора и 0,5 мл 1% взвеси эритроцитов.

Пластину после постановки реакции слегка встряхивают и оставляют при комнатной температуре или при температуре – 4°C в зависимости от свойств изучаемого вируса. Результата реакции учитывают через 30–45 минут после полного оседания эритроцитов в контроле.

Таблица 1 Схема постановки РГА

Компоненты	Разведение вируса								
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	К
Физиологический раствор	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Вирусосодержащий материал	0,1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Эритроциты 1%	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Примечание: из последней лунки 0,5 мл убрать.

#### Учет РГА (проводится в крестах)

При положительной РГА (+++) образуется характерный осадок эритроцитов в виде ажурного перевернутого зонтика с неровными зубчатыми краями, наползающими на стенки лунки. Чем выше концентрация вируса, тем лучше выражен зонтик и, наоборот, при уменьшении концентрации вируса формируется на дне луночки зона из плотно осевших эритроцитов.

«++++» – Зонтик выражен, но края его меньше изрезаны.

«++» – Зонтик выражен хорошо, в центре луночки имеется плотный осадок эритроцитов, который при наклоне пластинки не сползает.

«+» – Зонтик в виде зернистой каймы по краю, осадок из эритроцитов значительный, при наклоне сползает.

«-» – При отрицательной реакции образуется ровный диск из осевших эритроцитов, зонтик отсутствует.

**ТИТР ВИРУСА.** За гемагглютинирующий титр вируса принимают наибольшее разведение вирусосодержащего материала, давшего четко выраженную гемагглютинацию эритроцитов (т.е. зонтик) не менее, чем на «++».

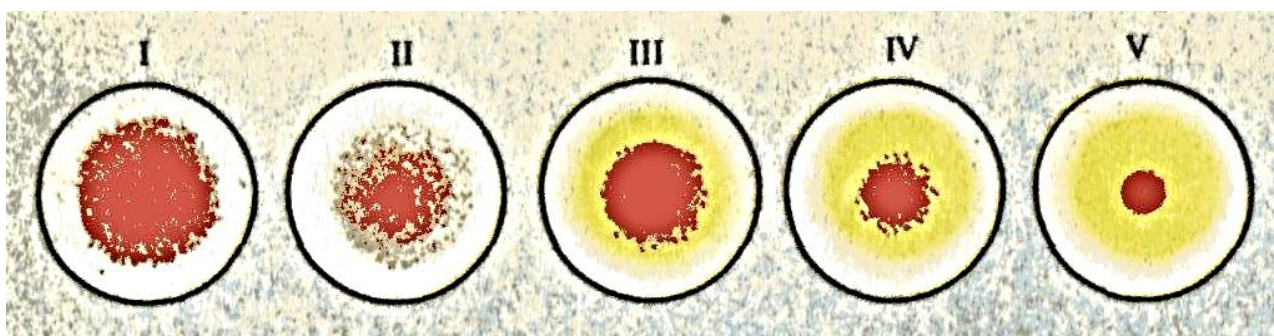


Рисунок 2

Учёт РГА (I, II, III – интенсивная агглютинация, обозначаемая четырьмя, тремя и двумя плюсами; IV – слабая агглютинация, обозначаемая одним плюсом; V – отсутствие агглютинации, обозначаемое минусом)

*(Р.В. Белоусова с соавт., 2016)*

1 ГАЕ вируса (гемагглютинирующая единица вируса) количество вируса, содержащегося в 0,5 мл наибольшего разведения вирусосодержащего материала, давшего четко выраженную гемагглютинацию.

#### Факторы, влияющие на ход РГА:

Количество вируса в исследуемом материале.

Концентрация эритроцитов.

Эритроциты определенного вида, пола и возраста животных.

Наличие ингибиторов, угнетающих действие вируса.

Температура, при которой идет реакция.

рН физиологического раствора, чистота посуды.

#### **Контрольные вопросы:**

1. На каком свойстве вирусов основана постановка РГА?
2. Какова сущность РГА?
3. Каков учет РГА?

## РЕАКЦИЯ ЗАДЕРЖКИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РЗГА)

Серологические исследования занимают одно из основных мест в вирусологии для постановки диагноза. Имеется несколько основных реакций (РЗГАд, РЗГА, РСК, РН, РИД и др.), которые одинаково подходят для идентификации многих типов. Все эти реакции подчиняются основным иммунологическим закономерностям, в основе которых лежит взаимодействие вирусов-антигенов со специфическими антителами в электролитной среде. В качестве антигенов обычно используют суспензию из ткани животных, зараженных куриных эмбрионов, тканевых культур и др.

Особенно чёткую реакцию дают очищение и концентрированные антигены, что очень важно для таких реакций, как РЗГА и РСК.

Некоторые типы вирусов и риккетсий имеют по два антигена:

1) А-антиген или вирусный компонент обуславливающий образование антигенов

2) S-антиген или растворимый компонент, который взаимодействует с комплементсвязывающими антигенами.

Содержание антител определяют в специфических или исследуемых сыворотках. При этом в последнем случае по известному антигену в сыворотках определяют наличие или отсутствие антител.

Реакция задержки гемагглютинации (РЗГА) еще называется реакцией торможения гемагглютинации (РТГА).

Впервые она была предложена в 1941 году Солком, который определил, что при добавлении к РГА специфичность сыворотки гемагглютинации не наступает, то есть наблюдается подавление гемагглютинирующих свойств вирусов специфическими антителами. Этот феномен получил название РЗГА и был широко использован для диагностики различных вирусных заболеваний. Реакций при этом оказалась высокоспецифичной. При исследовании некоторых вирусов (вирусов гриппа), реакция позволяет выделять не только типовые, но и штаммовые различия вирусов.

В настоящее время РЗГА вследствие своей доступности и простоты широко используется для определения антител вирусов в крови больных и выздоравливающих животных (ретроспективная диагностика), изучения антигенной структуры различных вакцин и т. д.

Реакция протекает в две фазы:

1-я фаза – специфическая: антиген + антитело. Она подчинена всем законам серологической реакции, специфичность антитела и

антигена, влиянию в растворе наличию эритроцитов, продолжительностью взаимодействия.

2-я фаза – индикаторная, по сути дела является реакцией ГА.

Если сыворотка оказалась специфичной, то она нейтрализует способность вируса склеивать эритроциты. Если антител нет или они неспецифичны вирусу, то произойдет РГА. С диагностической целью используют парные сыворотки (взятые в начале занятия и через несколько дней, чтобы обнаружить увеличение количества антител) (рисунок 3).

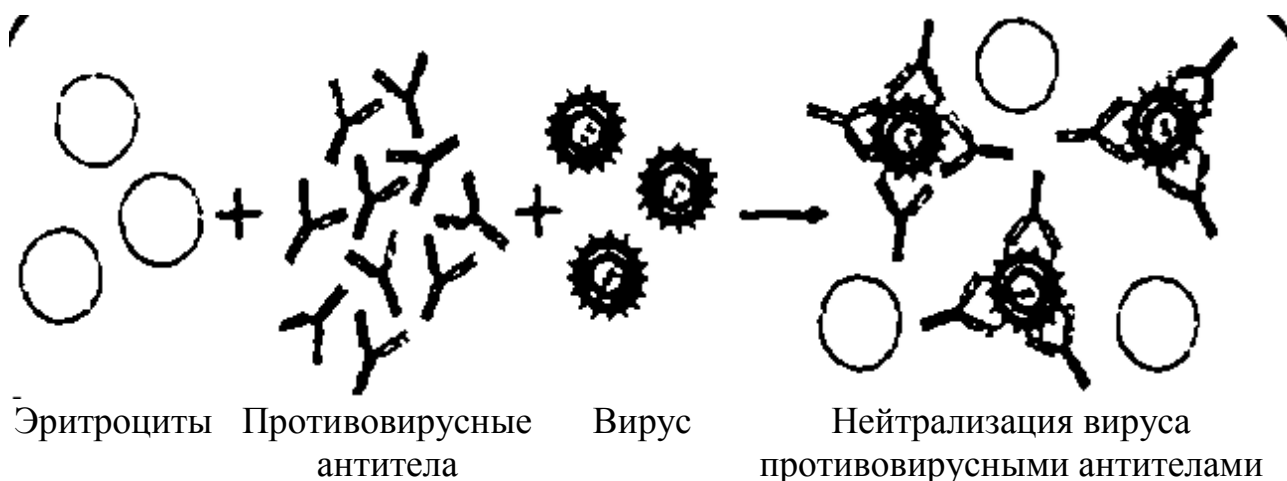


Рисунок 3

Принцип реакции задержки гемагглютинации (Р.В. Белоусова с соавт., 2016)

В РЗГА используются эритроциты тех же вирусов, что и в РГА. РЗГА ставят, как на доске из плексигласа, так и в пробирках. Перед постановкой РЗГА определяют рабочую дозу антигена в 4-х кратном размере по отношению к конечному титру антигена в РГА (4 АЕ).

Так, например, если положительная РГА на «++++» получается при разведении в 1:160 (1 АЕ), то доза вируса в РЗГА будет соответствовать разведению 1:40 (4 АЕ) (таблица 2).





При правильном выборе рабочей дозы вещества 1, 2, 3-й пробы полная агглютинация в 3–4 креста, а в 4 и 5 пробах – неполная агглютинация или она отсутствует. Особенно важно, чтобы в 3-й пробе, содержащей 1 АЕ, вирус была полная агглютинация.

Параллельно ставят контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию, для чего в лунку вносят 0,5 мл физиологического раствора и 0,5 мл 1% взвеси эритроцитов.

Пластины после постановки реакции слегка встряхивают и оставляют при комнатной температуре или при температуре – 4°C в зависи-

мости от свойств изучаемого вируса. Результаты реакции учитывают через 30–45 минут после полного оседания эритроцитов в контроле.


Таблица 2 Определение правильности выбора рабочей дозы вируса 4ГАЕ (Н.А. Ожередова с соавт., 2016)

Компоненты	№ пробирки				
	1	2	3	4	5
Физиологический раствор	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Вирус 8АЕ	0,5				
1 % взвесь эритроцитов	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Получение разведения вируса в АЕ	4 АЕ	2 АЕ	1 АЕ	0,5 АЕ	0,25 АЕ

Примечание: из последней лунки 0,5 мл убрать.

Перед постановкой реакции готовят разведение сывороток, начиная от 1:10 до 1:1280 (таблица 3).

Таблица 3 Техника постановки РЗГА (Н.А. Ожередова с соавт., 2016)

Компоненты	Разведение вируса									
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	К	К
Физиологический раствор	0,9	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Вирусодержащий материал	0,1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Эритроциты 1%	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	

### Учёт реакции

Оценка результатов реакции производится по наличию или отсутствию агглютинации. Если гемагглютинации нет или она есть и оценивается + (одним крестом), то РЗГА будет положительной, то есть

живые бактерии: в сыворотке были антитела, которые нейтрализуют гемагглютинирующие свойства вируса наоборот. Отрицательной реакцией считается, если в пробирке имеется гемагглютинация в 2–4 креста (рисунок 4).

Абсолютным титром антител в исследуемой сыворотке по РЗГА считается наивысшее разведение ее, при которой будет полная задержка ГА.

#### Факторы, влияющие на РЗГА

1. Родство антигена и антитела.
2. Неспецифические ингибиторы.
3. Авидность вирусов.
4. Чувствительность вирусов к эритроцитам.
5. Температура помещения, где ставится РЗГА.

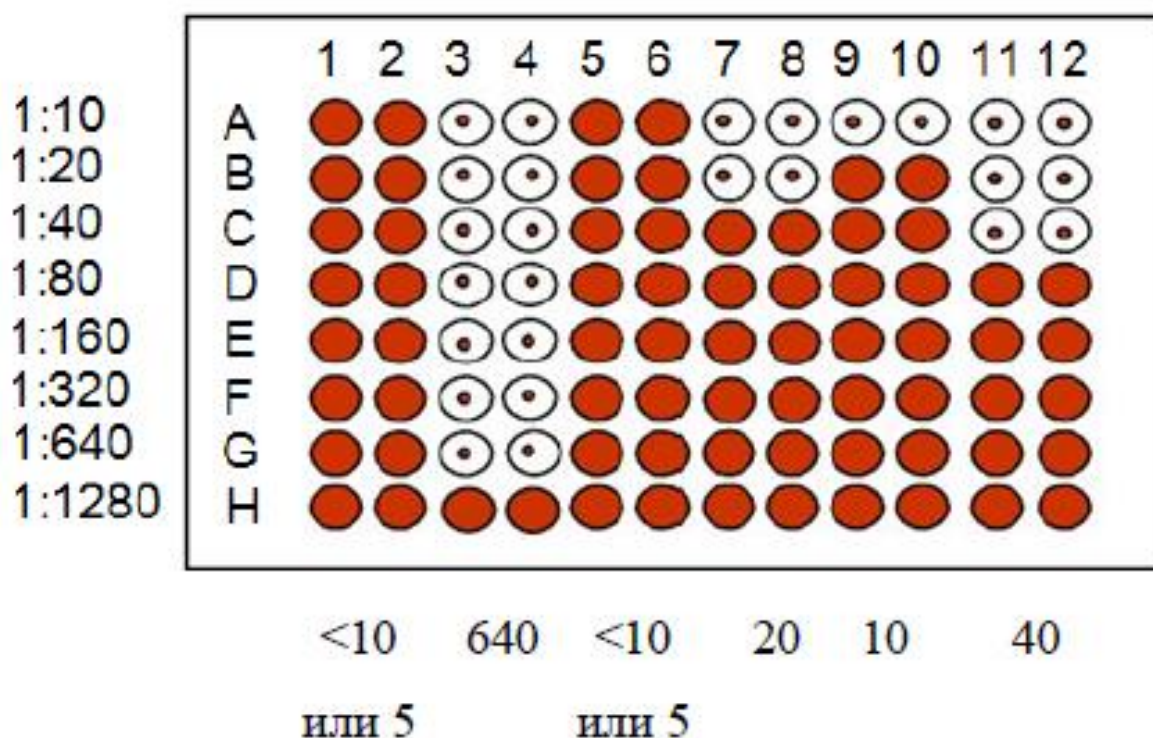


Рисунок 4  
Учёт РТГА (И.Н. Жилинская с соавт., 2007)

#### Неспецифические ингибиторы РЗГА и методы их удаления

Одни из недостатков РЗГА является неспецифическая ингибиция ГА, не зависящая от наличия специфических антител.

У вирусов даже одного вида существует чувствительные и не чувствительные штаммы к не специфическим ингибиторам.

При отсутствии в лаборатории штаммов, нечувствительных к неспецифическим ингибиторам, сыворотки должны подвергаться допол-

нительной обработке с целью удаления не специфических ингибиторов. Известны ингибиторы двух видов: термолабильные и термостабильные. Для освобождения от термолабильных ингибиторов вся сыворотка подвергается однократному прогреванию. Сыворотки различных видов животных прогревают в течение 30–40 мин при следующих температурах:

Сыворотки лошади – 54 °С;

Свиней, овец, крупного рогатого скота – 56 °С;

Сыворотки птиц – 58 °С;

Кролика – 60 °С.

Для удаления термостабильных ингибиторов (липопротеины, гликопротеины) используют следующие методы: ферментативная дегидратация при помощи ферментов, разрушающих рецептор (РРФ; путём окислительного размождения с помощью перманганата калия; путем осаждения при насыщении двуокисного углерода).

Следует отметить, что при этом титры неспецифических ингибиторов могут уменьшаться в разведение 1:20000, 1:500 соответственно до 1:40; 1:20. В то время титр антител к гомологичному вирусу снижается в сыворотке в 2–4 раза, т.е. сохраняется на высоком уровне, что гарантирует возможность идентификации выделенного штамма вируса, начиная с разведения 1:40 и выше. В этих разведениях ингибиторы отсутствуют и РЗГА идет хорошо.

Достоинства РЗГА:

простота техники постановки,

быстрота ответа,

не требуется стерильной работы,

специфичность, дешевизна.

Недостаток РЗГА:

РЗГА возможна только с гемагглютинирующими вирусами.

### **Контрольные вопросы:**

1. Какова история изучения РЗГА?
2. В чем заключается сущность РЗГА?
3. Какова техника постановки РЗГА пробирочным методом?
4. Какова техника постановки РЗГА пластинчатым методом?
5. Что такое титр вируса и 1 ГАЕ?
6. Каковы факторы, влияющие на ход РЗГА?
7. Как проводят учет результатов РЗГА?

## РЕАКЦИЯ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ (РНГА)

Многие вирусы – возбудители опасных инфекционных болезней людей и животных не обладают гемагглютинирующими свойствами, следовательно, РГА и РТГА (РЗГА) нельзя использовать для диагностики этих болезней.

Однако четкая гемагглютинация наступает при смешивании сенсibilизированных (предварительно нагруженных) вирусом эритроцитов со специфической для него сывороткой. Этот метод гемагглютинации получил название реакции непрямой гемагглютинации.

Впервые эту реакцию разработали советские ученые А. К. Кравченко и М. И. Соколов в 1945 году для обнаружения антигенов бактерий. Используя открытие советских ученых и способность вирусов адсорбироваться на эритроцитах, американские ученые Вернети Андерсен в 1946 году разработали эту реакцию со свежими эритроцитами для диагностики вирусных болезней. Вскоре для этой цели было предложено использование консервированных эритроцитов, обработанных формальном и танином.

В настоящее время РНГА применяется для диагностики вирусных болезней животных, вызываемых семейством герпесвирусов: ринопневмонии лошадей, инфекционного ринотрахеита КРС, инфекционного ларинготрахеита кур, болезни Ауески, злокачественной лихорадки КРС, болезни Марека, бешенства, заболеваний, вызываемых семейством коронавирусов – инфекционного бронхита кур, вирусного гастроэнтерита свиней, аденовирусной инфекции и др.

*Сущность реакции* в том, что эритроциты, на которых предварительно адсорбированы антигены или антитела, способны агглютинироваться в присутствии гомологичных антител или антигенов. Эритроциты выполняют роль носителей со специфическими детерминантами, агглютинация которых происходит в результате реакции антиген-антитело. Регистрируют данную реакцию по характеру образовавшегося осадка эритроцитов, она **является сугубо специфической** серологической реакцией (рисунок 5).



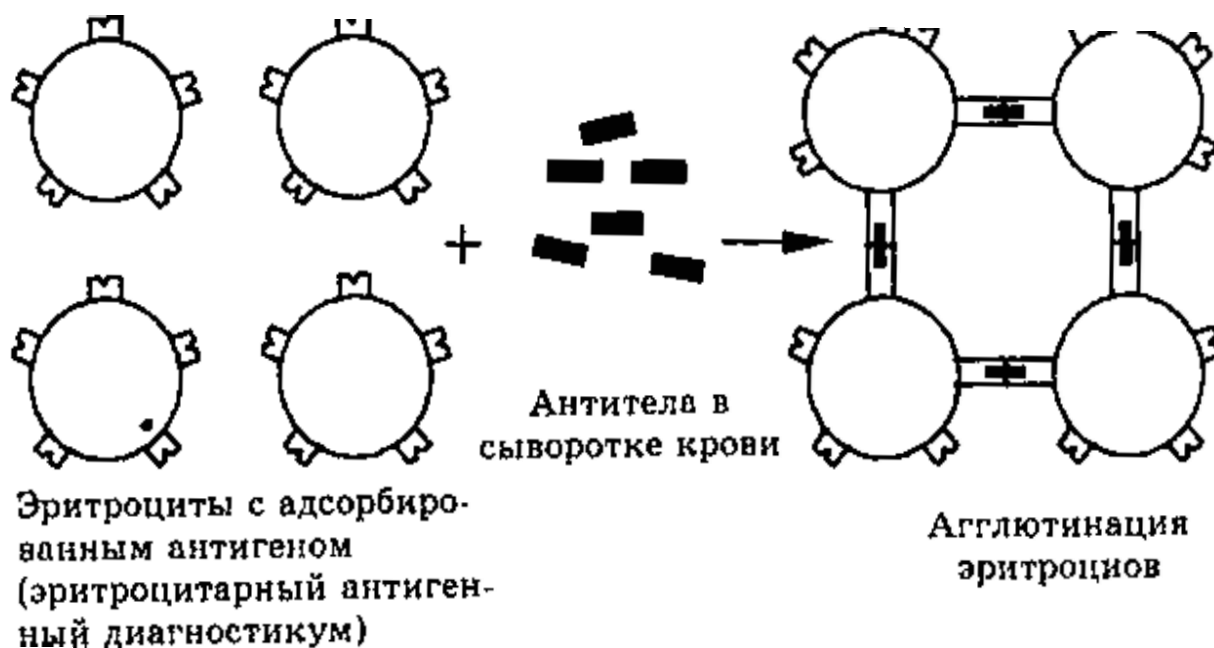


Рисунок 5  
Механизм реакции непрямой гемагглютинации  
(Р.В. Белоусова с соавт., 2006)

РНГА – высокочувствительная реакция, она позволяет выявить даже очень малое количество специфических антител.

Для постановки реакции выпускаются коммерческие препараты эритроцитарные диагностикумы:

**антигенный эритроцитарный диагностикум** – к поверхности эритроцитов присоединены антигены, способные в исследуемой сыворотке определять антитела;

**антительный эритроцитарный диагностикум** – эритроциты, сенсibilизированные антителами, применяют для быстрого обнаружения антигенов в различных субстратах.

Для постановки РНГА необходимы следующие компоненты:

Эритроцитарный диагностикум – 1% взвесь эритроцитов.

Физиологический раствор.

Исследуемые сыворотки крови.

Стандартные контрольные (нормальная и заведомо положительная сыворотка крови).

#### Постановка РНГА

РНГА обычно ставят на пластинах из оргстекла с луночками, как и РГА и РЗГА (таблица 4).

Таблица 4 Схема постановки РНГА  
(Н.А. Ожередова с соавт., 2016)

Компоненты	Разведения сывороток								Компоненты	Контроль			
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280		1	2	3	4
Физраствор	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	Физраствор	0,2	0,2	0,2	0,2
Исследуемая сыворотка 1:5	0,2				Последова- тельный перенос по 0,2 мл				Эритроци- тарный диа- гностикум	0,2	0,2	0,2	
Эритроци- тарный диа- гностикум	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	«+» сыворотка		0,2		
									«-» сыворотка			0,2	
									Исследуемая сыворотка				0,2
									1% взвесь эритроцитов				0,2
Учёт реакции	Экспозиция при комнатной температуре 2–3 часа												

Исследуемые и контрольные сыворотки крови предварительно инактивируют при температуре 56–58 °С 30 минут для разрушения ингибиторов (неспецифических антител).

Реакцию ставят в объеме 0,4 мл.

Исследуемые и контрольные сыворотки разводят двукратно физиологическим растворам в объеме 0,2 мл, начиная с разведения 1:10 и до 1:1280.

Исходное разведение сыворотки 1:5.

На каждую пробу исследуемых и контрольных сывороток используют отдельный ряд пластин.

В 8 луночек – ряд пластин наливают по 0,2 мл физраствора. Затем в первую лунку приливают 0,2 мл исследуемой сыворотки (1,5) и последовательно переносят из лунки в лунку по 0,2 мл жидкости. Из последней лунки убирают 0,2 мл в свободную лунку ряда.

Затем к каждому разведению сыворотки добавляют по 0,2 мл эритроцитарного антигена (сенсibilизированные эритроциты соответствующим вирусом).

Одновременно ставят 4 контроля:

1. На спонтанную гемагглютинацию эритроцитарного антигена. Для этого сенсibilизированные эритроциты соединяют с физраствором в смеси с 1% нормальной сывороткой крови кролика для стабилизации эритроцитов.

2. На активность сенсibilизированных вирусом эритроцитов (к разведениям стандартной положительной сыворотки добавляют сенсibilизированные эритроциты).

3. На специфичность сенсibilизированных эритроцитов (к разведениям нормальной сыворотки добавляют сенсibilизированные эритроциты).

4. На отсутствие в исследуемой сыворотке неспецифических гемагглютининов (к исследуемой сыворотке добавляют 1% взвесь обычных эритроцитов).

Пластинки осторожно встряхивают и выдерживают 2–3 часа при комнатной температуре.

Титр антител исследуемой сыворотки в нашем примере 1:80. Заключение: в исследуемой сыворотке крови обнаружены специфические антитела в диагностических титрах (1:80).

Учет РНГА (проводится в крестах)

«+++» – четкий перевернутый зонтик склеенных эритроцитов.

«++» – слабый зонтик с кольцом не агглютинированных эритроцитов.

«+» – по краю луночки слабая агглютинация эритроцитов, на дне широкое красное кольцо.

«–» – осадок эритроцитов в виде холмика (бугорка) или плотного кольца.

Учет РНГА начинают с контроля. В 1, 3, 4 контролях надосадочная жидкость должна быть прозрачной, на дне осадок осевших

эритроцитов в виде бугорка (холмика). Во 2 контроле должна быть четкая положительная реакция осадок эритроцитов в виде перевернутого зонтика.

Положительная РНГА позволяет определить титр специфических антител в исследуемой сыворотке крови.

Титром антител в РНГА считается наибольшее разведение сыворотки крови, при котором происходит гемагглютинация сенсibilизированных эритроцитов с оценкой не менее два креста.

### **РТНГА (реакция торможения непрямой гемагглютинации)**

Некоторые исследователи рекомендуют для идентификации типов и вариантов вируса ставить РТНГА. Для этого в ряд лунок разливают по 0,2 мл двукратного разведения вируса 1:2 – 1:128, во втором ряду разводят нормальную без вируса культуральную жидкость. Затем в каждую луночку обеих рядов добавляют 0.2 мл специфической сыворотки, на 3 разведения меньше указанного титра. Реакцию помещают на 40–60 минут в термостат.

Затем, во все лунки добавляют по одной капле эритроцитарного диагностикума. Пластинки встряхивают и выдерживают 1–2 часа при комнатной температуре.

Затем проводят учет РТНГА.

РТНГА считают положительной, а вирус идентифицированным, если в первом ряду с вирусом произойдет торможение гемагглютинации хотя бы в первых 2–3 лунках при полной гемагглютинации и контрольном ряду.

#### Достоинства РНГА:

эта реакция обладает высокой чувствительностью, превосходя РИД, РСК и приближаясь к иммуноферментному анализу, отличается простотой техники постановки и быстротой ответа (2...3 ч).

#### Недостаток РНГА:

определенные трудности в приготовлении стабильных эритроцитарных диагностикумов.

### **Контрольные вопросы:**

1. На каком свойстве вирусов основана постановка РНГА?
2. Какова сущность РНГА?
3. Каков учет РНГА?

## РЕАКЦИЯ ГЕМАДСОРБЦИИ (РГАд) И РЕАКЦИЯ ЗАДЕРЖКИ ГЕМАДСОРБЦИИ (РЗГАд)

**Реакция гемадсорбции (РГАд)** – это не серологическая реакция. Она основана на способности вируса адсорбироваться на эритроцитах (рисунок 6).

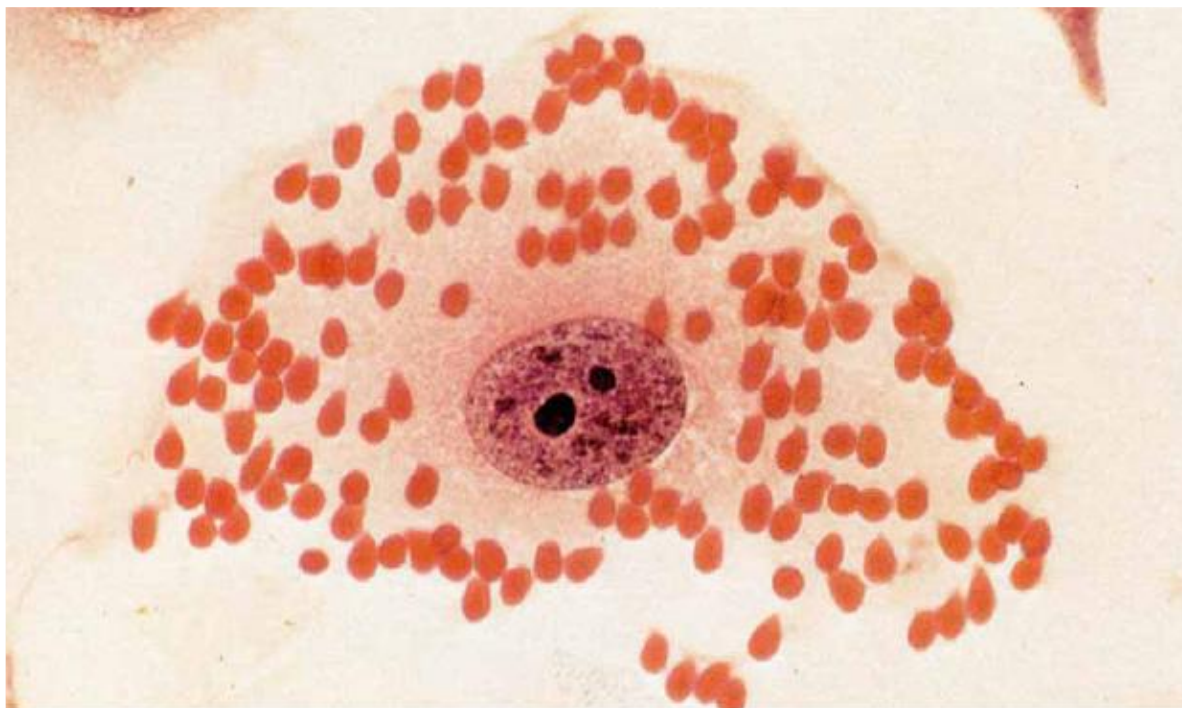


Рисунок 6

Гемадсорбция на культуре клеток  
(<http://medicine-live.ru/atlas/micro/viruses>)

Впервые о способности инфицированных вирусом клеток (КК) адсорбировать на своей поверхности эритроциты сообщили в 1957 году Фогель и Щелоков. В настоящее время РГАд используется для раннего обнаружения вируса в исследуемом материале, не обладающего гемагглютинирующими свойствами и вызывающего латентную вирусную инфекцию в клетках (аденовирусы, вирус классической чумы свиней, вирус диареи крупного рогатого скота и др.)

### Техника постановки РГАд:

Культуру клеток заражают исследуемым материалом и инкубируют в термостате.

Через 2–3 суток (при отсутствии ЦПД) в КК вносят 2–3 капли 0,5% взвеси эритроцитов (кур, морских свинок и др.). Способность вируса адсорбироваться на эритроцитах сохраняется и тогда, когда он находится внутри тканевой клетки. Поэтому не вирус адсорбируется на эритроцитах, а эритроциты плотно адсорбируются на оболочке клетки, пораженной вирусом. При покачивании пробирок эритроциты не отделяются от клеток. Если вируса в клетке нет, то эритроциты не адсорбируются, а просто оседают на монослой и при покачивании КК легко всплывают. Большую роль в адсорбции играет родство рецепторов пораженной вирусом клетки с рецепторами эритроцитов. Здоровые контрольные КК не способны адсорбировать эритроциты на своей поверхности.

**Реакция задержки гемадсорбции (РЗГАд)** – это серологическая реакция, она применяется для идентификации вируса. РЗГАд состоит из 2-х реакций неспецифической (РГАд) и специфической (РЗГАд). После обнаружения вируса в исследуемом материале его соединяют со специфической гипериммунной диагностической сывороткой к предлагаемому вирусу. Выдерживают на контакте 30–40 мин и вновь с этой смесью ставят РГАд по описанной выше методике.

Если антитела сыворотки соответствуют вирусу, то они вирус нейтрализуют. Следовательно, вирус не проникает и не будет размножаться в клетке. Мы в эти КК вносим эритроциты, они адсорбироваться на поверхности клеток не будут. То есть мы увидим задержку (торможение) гемадсорбции. В этом случае РЗГАд считается положительной, диагноз поставлен. Какая сыворотка, такой и вирус.

### **Контрольные вопросы:**

1. На каком свойстве вирусов основана постановка РГАд и РЗГАд?
2. Какова сущность и учет РГАд?
3. Что определяется при постановке РГАд?
4. Какова сущность и учет РЗГАд?

## РЕАКЦИЯ ИММУНОДИФФУЗИИ (РИД) И ИММУНОЭЛЕКТРОФОРЕЗ

**РДП** – это серологическая реакция, в результате которой комплекс антиген-антитело (преципитат) выпадает в осадок и образует полосу преципитации в геле.

Сущность реакции заключается в том, что специфические антигены и антитела диффундируют в геле агара из мест локализации навстречу друг другу. Если они окажутся гомологичными, то образуется комплекс антиген-антитело, который к диффузии не способен вследствие более крупных размеров. Он оседает (преципитирует) на месте образования в виде беловатой полосы преципитации, которая хорошо заметна на фоне прозрачного геля. Если же диффундирующие друг другу навстречу антиген и сыворотка не гомологичны, полосы преципитации не образуется.

Антитела называются **преципитины**, антигены – **преципитиногены**, комплекс антиген + антитело – **преципитат**.

Здесь мы сталкиваемся с феноменом преципитации. По гипотезе Маррека (теория «решетки») при взаимодействии антител с поливалентным антигеном происходит образование «решетки», напоминающей кристаллическую. При оптимальных соотношениях антигена и антитела образуются прочные комплексы, которые, постепенно увеличиваясь в размерах, становятся видимыми невооруженным глазом. Область этих соотношений, при которых в надосадочной жидкости после образований преципитата не обнаруживаются ни свободные антигены, ни свободные антитела, называется **зоной эквивалентности**. При избытке антигена образуются мелкие, растворимые, не видимые глазом соединения, так как каждый активный центр антитела «заполнен» молекулой антигена (б). При избытке антител образующиеся мелкие комплексы также не могут быть связаны вместе из-за отсутствия антигена в достаточном количестве (в), вследствие чего большие агломераты не образуются. **Феномена преципитации не происходит**, так как образуется растворимый комплекс антиген-антитело (рисунок 7).

При постановке пробирочного метода реакции преципитации в бактериологии при серологической диагностике сибирской язвы, реакция протекает в присутствии физиологического раствора в пробирках Уленгута, а при диагностике вирусных болезней в агаровых пластинах в чашках Петри или на предметных стеклах (макропреципитация и микропреципитация), а также в специальных аппаратах – метод электродиффузионной преципитации.

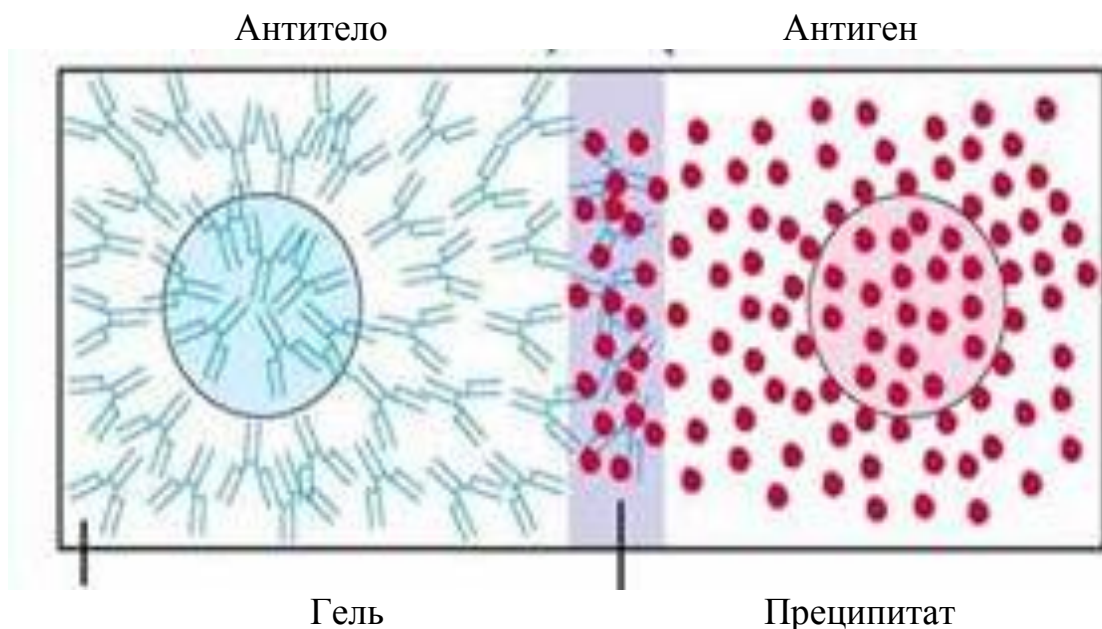


Рисунок 7

Механизм реакции преципитации ([www.intranet.tdmu.edu.ua](http://www.intranet.tdmu.edu.ua))

В настоящее время РИД широко используется при лабораторной диагностике вирусных заболеваний – инфекционного бронхита, инфекционного ларинготрахеита кур, оспы кур, Ньюкаслской болезни птиц, классической чумы птиц, чумы свиней, ящура, бешенства, лейкоза и т.д.

Постановка РИД позволяет решать ряд практических задач, важнейшими из которых являются следующие:

- обнаружение в сыворотке крови специфических антител – преципитинов, гомологичных данному антигену.
- обнаружение в патматериале вирусных антигенов, гомологичных известным антителом сыворотки.
- титрование антител сыворотки, когда высшее разведение сыворотки, еще дающее преципитацию с гомологичным антителом служит показателем титра антител в сыворотке.
- изучение антигенной структуры вирусов – между луночками с антигеном с антителами образуется несколько линий преципитации.

При постановке РИД используют следующие компоненты:

- исследуемая сыворотка или суспензия из патматериала.
- диагностическая гипериммунная преципитирующая противовирусная сыворотка или вирус-диагностикум (антиген).
- стандартный очищенный (осветленный) агар или агар-агар фирмы Дифко.

Постановка реакции

В настоящее время РИД ставится методом макро- и микропреципитации:



**1. Макропреципитация.** РИД ставится в чашках Петри. На строго горизонтальной поверхности лабораторного стола расставляют чашки Петри (диаметром 100 мм) и в каждую чашку Петри вносят по 12,5 мм расплавленного агара (толщиной 3 мм). В толще агара делают отверстия (лунки).

Для вырезания лунок можно использовать готовый штамп, представляющий собой трубочки с острыми краями, жестко скрепленные в соответствии с типом расположения и количеством лунок. Если готового штампа нет, можно воспользоваться любой трубкой подходящего диаметра, например, гильза от патрона к мелкокалиберной винтовке. В этом случае целесообразно нарисовать карандашом на бумаге количество и взаимное расположение лунок и подложить этот трафарет под стекло с агаром, по нему вырезать лунки. Остающийся в лунках агар можно извлекать иглой, ученическим пером или пастеровской пипеткой.

При постановке РИД для диагностики лейкоза крупного рогатого скота имеются специальные наборы, которые содержат соответствующие компоненты, необходимые для постановки реакции. Рекомендуется проводить реакцию при расположении лунок по следующей схеме (рисунок 8).



Рисунок 8  
Постановка РИД (схема авторов)

У образовавшихся лунок дном служит стекло, а стенками – слой агара. Чтобы избежать подтекание жидкостей под агар, рекомендуют

лунки заплавить с тем, чтобы они были полностью в слое агара. Пастеровской пипеткой в лунку вносят каплю расплавленного (50–60 °С) агара таким образом, чтобы он занял половину лунок. Соприкасаясь за короткое время с холодным дном и стенками лунок, агар застывает покрывает тонким слоем дно и стенки лунок.

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

РИД можно ставить в двух вариантах:

1. В центральную луночку помещаем стандартную сыворотку, а в периферические луночки исследуемый вируссодержащий материал.

2. В центральную луночку помещаем антиген-диагностикум, а в периферические луночки – исследуемую сыворотку.

Одновременно ставят контроли с положительными и отрицательными сыворотками (антигенами).

После заполнения лунок соответствующими компонентами чашки Петри помещают во влажную камеру, чтобы предотвратить высыхание агара. В качестве влажной камеры используют эксикатор на дне которого, находится небольшое количество воды. Эксикатор с чашками Петри оставляют при комнатной температуре или помещают в термостат при 37 °С, где диффузия идет несколько быстрее. Учет результатов РИД проводят через 24–48 часов (рисунок 9).



Рисунок 9

Реакция диффузионной преципитации при диагностике лейкоза крупного рогатого скота (*фото авторов*)

**2. Микропреципитация.** РИД ставится на обезжиренных предметных стеклах. Стекля укладывают горизонтально на поверхность стола. На них предварительно наносят каплю расплавленного агара, пипеткой равномерно распределяется она по стеклу, делают тонкий мазок. Застывший слой агара наливают сверху 2,5 см агарового геля толщиной приблизительно 2 мм.

После застывания агара делают в нем лунки металлической тонкостенной трубочкой диаметром 4–5,6 мм согласно трафарету. Агаровые столбики извлекают иглой, подкапывают расплавленный агар и проводят закапывание компонентов реакции (при лабораторной диагностике бешенства) (рисунок 10).

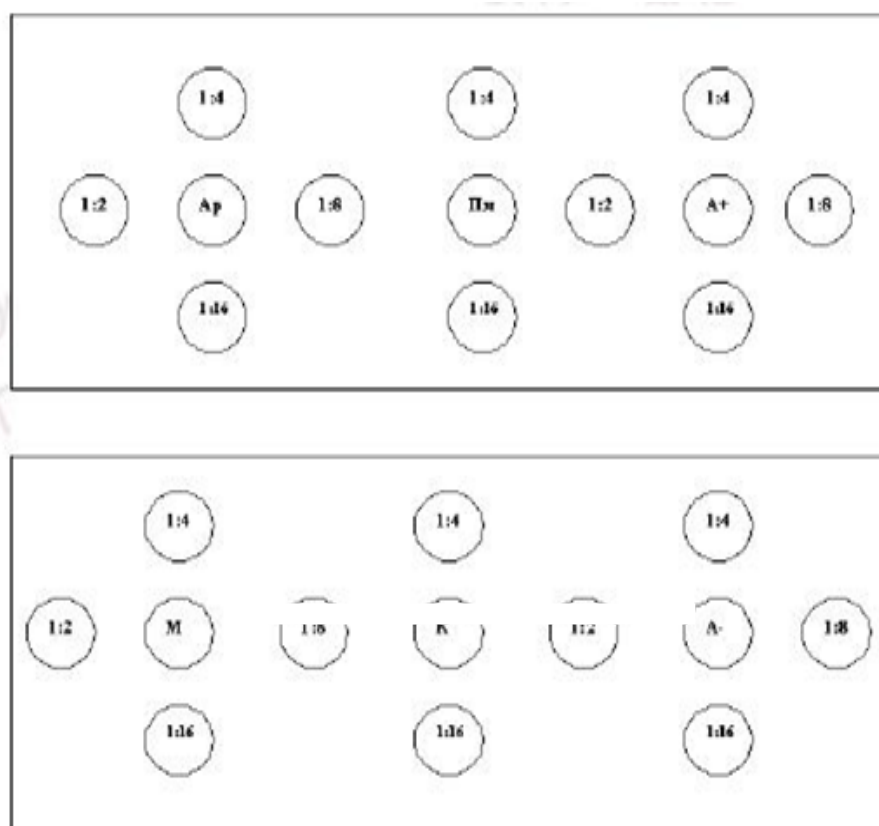


Рисунок 10

Постановка РИД методом микропреципитации (лабораторная диагностика бешенства): Ар – аммонов рог; Пм – продолговатый мозг; А+ – положительный контрольный антиген; М – мозжечок; К – кора больших полушарий; А- – отрицательный контрольный антиген

(П.И. Барышников с соавт., 2015)

После заполнения лунок соответствующими компонентами подготовленные предметные стекла помещают во влажную камеру (чашки Петри с листом фильтровальной бумаги, пропитанной водой) и переносят их в термостат при 37 °С на 6 часов. Затем, выдерживают чашки Петри при комнатной температуре еще 42 часа. РИД учитывают через 6, 24, 48 часов после его постановки.

При постановке РИД для диагностики вирусных заболеваний необходимо пользоваться соответствующими ГОСТами, применительно к конкретному заболеванию.

Постановка РИД методом микропреципитации считается более экономной, так как лунки делают несколько меньших размеров, и затрачивается меньшее количество компонентов.

#### Учет реакции

Проводится в затемненной комнате, просматривают чашки Петри в рассеянном свете на темном фоне.

Реакция считается положительной, если между луночкой, содержащей стандартную сыворотку (антиген) и периферической луночкой, содержащей испытуемый материал видна беловатая линия преципитации.

Реакция считается отрицательной, если линия преципитации отсутствует.

Линии преципитации иногда бывают видны не очень четко. Для усиления их Кроул предложил использовать 0,065 % раствор сернокислого кадмия. Стекла с агаровыми пластинками заливают раствором кадмия. Через 10 минут линии преципитации проявляются ярче.

При учете РИД обязательно сравнивают полученный результат с контролями.

**Иммуноэлектрофорез (ИЭФ).** Метод электрофоретического разделения антигенных смесей в агаровом геле с последующим выявлением отдельных антигенов при помощи реакции диффузионной преципитации. Иммуноэлектрофорез применяют для изучения состава сложных антигенных смесей, например, микробных растворимых антигенов, белков сыворотки крови и т.д.

Для приготовления агарового геля и заполнения кювет электрофоретической камеры используют различные буферные растворы:

1) веронал-мединаловый (барбитуратный) буферный раствор, рН 8,6, ионная сила 0,05; веронал – 1,84 г, мединал – 10,3 г, дистиллированная вода – до 1000 мл; 2) трис-буфер, рН 8,9; трис (оксиметил)-аминометан – 60,5 г, этилендиаминотетра-уксусная кислота – 6 г, борная кислота – 4,6 г, дистиллированная вода – до 1000 мл.

Существует много других буферных растворов, различающихся по значениям рН и ионной силе. Ионная сила равна половине суммы произведения концентрации каждого иона, присутствующего в растворе, на квадрат его валентности. Чем ниже ионная сила буфера, тем быстрее двигаются белки, но чрезмерное снижение ионной силы ухудшает разделение компонентов.

Для проведения электрофореза расплавленный гель наливают на стеклянные пластины размером  $(13-18) \times (18-24)$  см (макрометод) или на предметные стекла (микрометод) слоем толщиной 2–4 мм. Затем в агаровом геле с помощью пробойников вырезают лунки для растворов, подлежащих электрофоретическому разделению. Если объем жидкости достаточно велик (макрометод), то ее предварительно диализируют против буферного раствора, который используют для электрофореза.

Подготовленную пластину помещают в камеру для электрофореза (рисунок 11). Слой агара на пластине благодаря агаровым «мостикам» или полоскам хроматографической бумаги сообщается с анодной и катодной кюветами, заполненными буферным раствором. Ток через выпрямитель поступает на пластину с агаром (напряжение обычно 300–500 В и силой тока 30–40 А). Если градиент потенциала на агаровой пластине составляет 5–6 В/см, то на пластине длиной 18 см разгонка белков завершается за четыре-пять часов, при меньших размерах пластины разгонка происходит быстрее.



Источник питания «Эльф-4»  
для электрофореза нуклеиновых  
кислот в агарозных и акриламидных  
гелях (ДНК-Технология, Россия)



Камера  
для горизонтального  
электрофореза SE-2  
(ХЕЛИКОН, Россия)

Рисунок 11

Оборудование для электрофореза ([http://laboria.ru/meditsinskoe\\_oborudovanie](http://laboria.ru/meditsinskoe_oborudovanie))

По истечении указанного времени пластину с гелем вынимают из камеры, в агаре по длине пластины прорежают траншею, которую заполняют иммунной сывороткой. Пластины помещают во влажную камеру. Образование дуг преципитации завершается через несколько суток. Электрофореграммы можно высушивать на стеклах, окрашивать или при помощи специальных реактивов определять химическую природу веществ в дугах преципитации (рисунок 12).

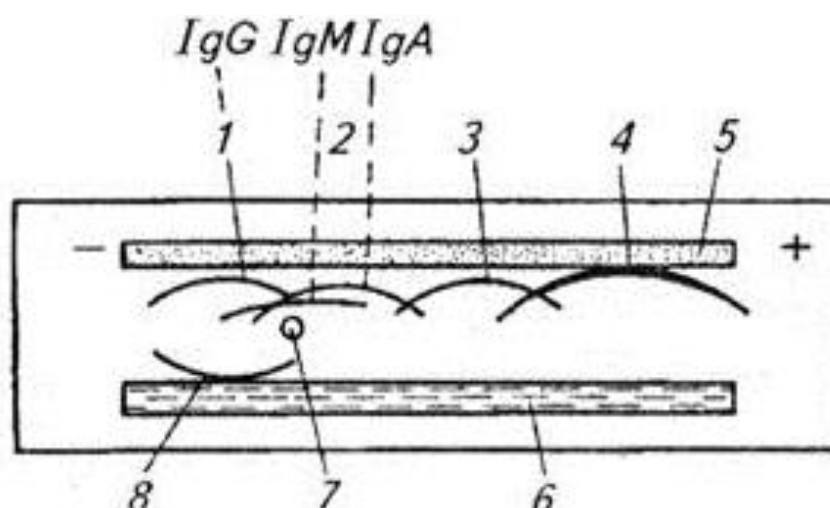


Рисунок 12

Иммунофореграмма цельной сыворотки и определение компонентов сыворотки, содержащих преципитирующие антитела:  
 1 –  $\gamma$ -глобулин; 2 –  $\beta$ -глобулин; 3 –  $\alpha$ -глобулин; 4 – альбумин; 5 – канавка, заполненная антисывороткой к цельной бычьей сыворотке; 6 – канавка с раствором овальбумина; 7 – сыворотка телят; 8 – линия преципитации, которая указывает, что антитела к овальбумину расположены во фракции IgG  
 (Р.В. Белоусова с соавт., 2016)

#### Достоинства РИД:

простота техники постановки;  
 нетребовательность к чистоте компонентов (можно использовать неочищенный антиген);  
 минимальная потребность в компонентах;  
 возможность документирования результата, путем фотографирования.

#### Недостатки РИД:

реакция идет только при наличии сравнительно высокой концентрации специфических антител;  
 при помощи реакции выявляются лишь растворимые и четко преципитирующие антигены;  
 длительность реакции – 48–72 часа.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Какие практические задачи позволяет решать РИД?
2. В чем заключается сущность РИД?
3. Каковы компоненты РИД?
4. Каким образом проводится постановка РИД методами макро- и микропреципитации?
5. В чем достоинства и недостатки РИД?
6. Для каких целей применяют метод электрофореза?

## **РЕАКЦИЯ ИММУНОФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ (РИФ)**

В настоящее время в вирусологии используются следующие методы иммунофлуоресценции (реакции иммунофлуоресценции).

### **Прямой метод иммунофлуоресценции.**

Прямой метод РИФ является универсальным методом экспресс диагностики различных инфекционных бактериальных и вирусных болезней, вызываемых в основном крупночастичковыми вирусами.

Определенными вирусами иммунизируют кроликов. Из сыворотки крови получают гамма-глобулины и их обрабатывают флуорохромами. Мечеными антителами обрабатывается мазок и помещается на 25–30 минут в термостат при температуре 37 °С, затем мазок промывается водой, высушивается и смотрится под люминесцентным микроскопом. Если будет свечение цвета люминесцентной краски (флуорохрома), то в исследуемом материале имеются микробы или вирусы, специфические антителам данной сыворотки. При отсутствии иммунной связи меченые антитела не соответствуют антигену и легко смываются водой, специфическое свечение отсутствует (рисунок 13).

### **Непрямые методы иммунофлуоресценции**

РИФ применяются в основном для диагностики вирусных болезней, вызываемых мелко и среднечастичковыми вирусами. Имеются два не прямых метода РИФ.

1. Антигаммаглобулиновый. Сначала кролика иммунизируют определенным гамма-глобулином и получают специфические антигаммаглобулины, которые окрашивают флуорохромами. Затем из вирусного материала готовят мазки, фиксируют их на пламени, или с помощью фиксирующей жидкости (метилового спирта, ацетона, очищенного бензина). После этого препарат обрабатывают гамма-глобулинами, специфическими к предполагаемому вирусу, и течение 20–30 минут. Если вирус соответствует гамма-глобулину, то антитела адсорбируются на вирусе или на тканевых клетках, пораженных вирусом. Затем мазки промывают водой и обрабатывают ме-



ченными антигаммаглобулинами. также 20–30 минут при температуре 37 °С. Антигаммаглобулины адсорбируются на специфических гамма-глобулинах, (антителах, которые являются антигеном ни отношению к антигаммаглобулинам). Если произойдет такая последовательная иммунная связь, то образуется крупный конгломерат, который будет светиться. Если же гамма-глобулины неспецифичны к вирусу, то специфического свечения вируса не будет, т.к. гамма-глобулины и антигаммаглобулины смываются водой (рисунок 14).

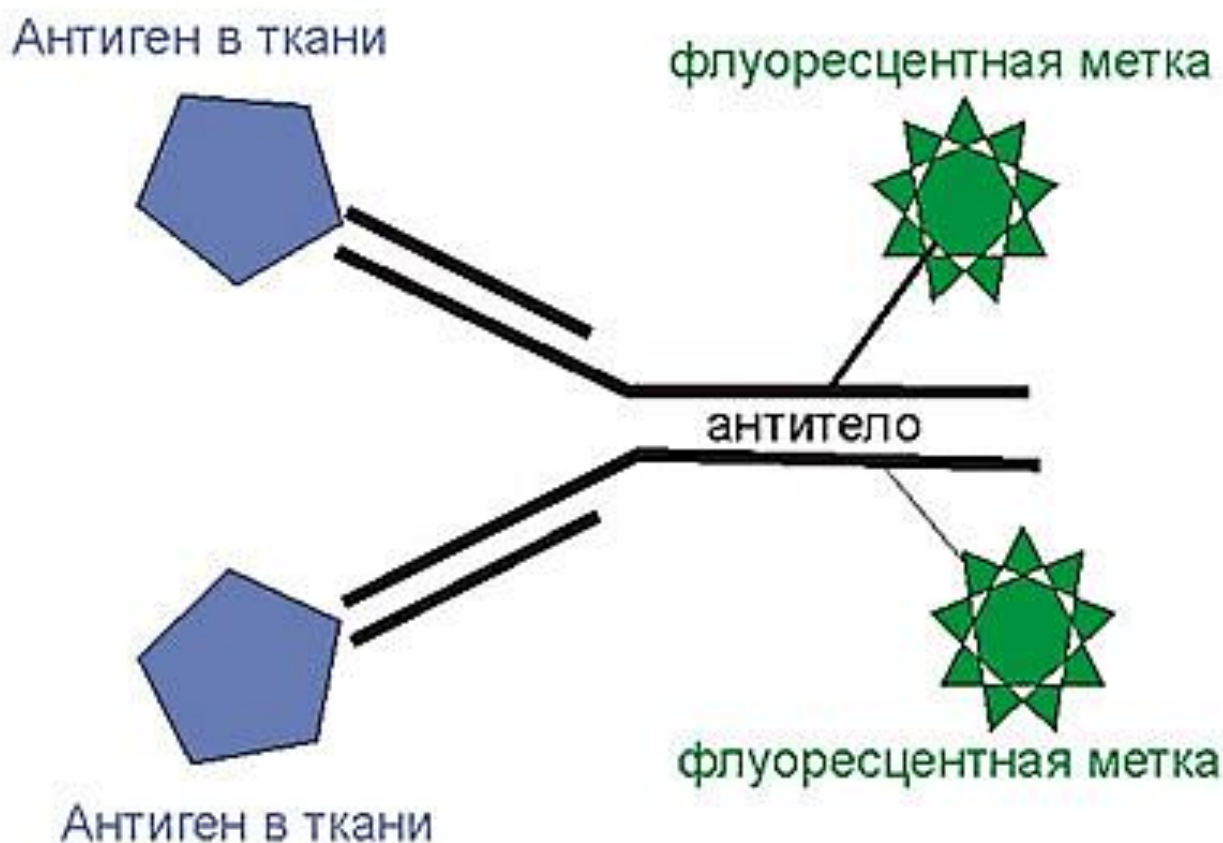


Рисунок 13  
Прямой метод РИФ ([www. nsau.edu.ru](http://www.nsau.edu.ru))

2. Наиболее широко для диагностики вирусных болезней, вызываемых мелкими и среднечастичковыми вирусами, применяется метод Гольдвассера-Шеппарда (антикомплементарный метод РИФ). При высокой чувствительности и специфичности он проще, дешевле и удобнее в работе, т.к. требуется только меченый антикомплемент. Для его получения комплементом иммунизируют животное. Комплемент



как белок является антигеном. Из сыворотки крови этого животного получают антикомplement, который является специфическим анти-телом к complementу. Его окрашивают флуорохромами. Затем из вирусного материала делают мазок, обрабатывают его специфическими гамма-глобулинами против предполагаемого вируса в течение 20–30 минут при температуре 37 °С. Затем мазок промывают и наносят complement.

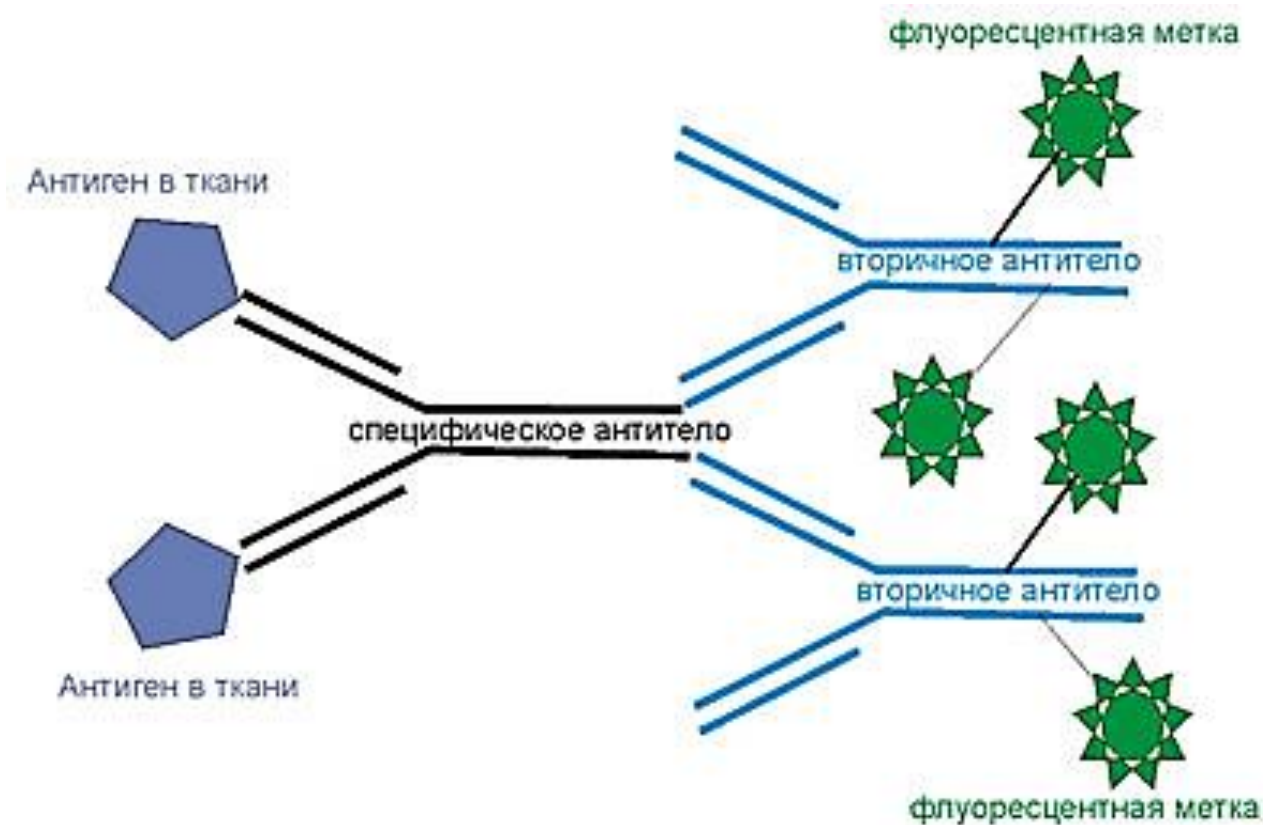


Рисунок 14  
Непрямой метод РИФ ([www. nsau.edu.ru](http://www.nsau.edu.ru))

Снова мазок промывают и обрабатывается меченым антиком-плементом, снова промывают через 10–15 минут. Если в исследуемом материале будет вирус, специфический к гамма-глобулину, то гам-ма-глобулин прочно адсорбируется на вирусе или на клетках, пора-женных вирусом, на образовавшийся комплекс (антиген-антитело) всегда адсорбируется complement и при ополаскивании водой он не смывается. На образовавшийся иммунный комплекс-антиген-анти-тело-complement адсорбируется меченый флуорохромом-анти-

комплемент. В данном случае комплемент является антигеном, антикомплемент-специфическим антителом.

В положительном случае, если вирус будет соответствовать гамма-глобулину, то весь крупный иммунный комплекс (вирус-гамма-глобулин-комплемент) будет светиться цветом того флуорохрома, которым был помечен антикомплемент (рисунок 15).

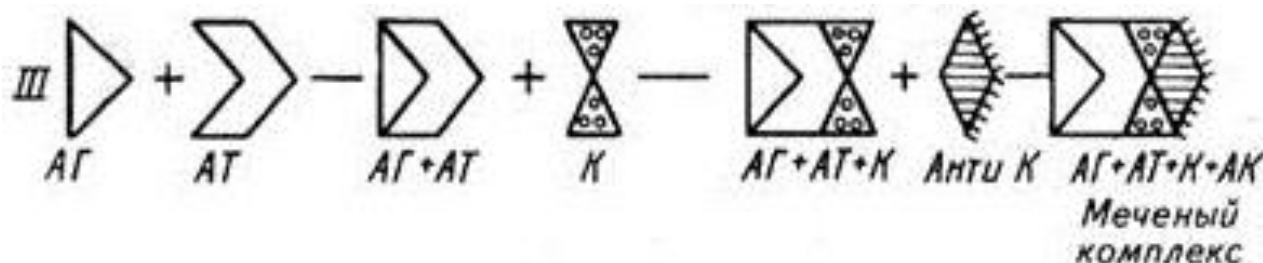


Рисунок 15

Антикомплементарный метод РИФ

(Аг – антиген; Ат – антитело; К – комплемент)

(Р.В. Белоусова с соавт., 2006)

#### Положительные стороны РИФ:

высокая чувствительность, специфичность реакции;

цветное изображение исследуемого объекта;

относительная простота и быстрота постановки и учета РИФ (1–2 ч).

#### Отрицательные стороны РИФ

для постановки РИФ необходим набор высокоактивных специфических гипериммунных сывороток, меченных определенными флуорохромами или меченый флуорохромомантикомплемент;

РИФ проводится только при помощи люминесцентного микроскопа.

#### **Контрольные вопросы:**

1. Каким образом работает люминесцентный микроскоп?
2. Какие применяются флуорохромы?
3. Что такое иммунофлуоресценция?
4. Для каких целей проводится РИФ?
5. Каковы методы РИФ?
6. Каким образом проводится учет РИФ?

## **РЕАКЦИЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА (РСК)**

Из серологических реакций, применяемых для диагностики вирусных болезней РСК является наиболее трудоемкой и сложной. Ставят РСК для диагностики многих вирусных болезней – чума собак, свиней, КРС, бешенства, вирусного гепатита, аденовирусной инфекции, диареи КРС, ящура, по двум вариантам: по известному антигену обнаруживают в исследуемой сыворотке крови антитело или по известным стандартным сывороткам определяется в исследуемом материале антиген. Такой вариант широко используется для типизации вирусов ящура и других вирусов, обладающих плюрализмом.

В РСК факт взаимодействия антигена и антитела устанавливают при помощи специальной индикаторной системы, которую лизирует комплемент. Комплемент (С) не способен соединяться с антигеном (АГ) или с антителами (АТ) в отдельности, но реагирует с образовавшимся комплексом АГ – АТ. В РСК участвуют две системы: АГ – АТ и комплемент.

Исследуемая АГ – АТ-система: искомый компонент (например, антитела) в ней может количественно варьировать или полностью отсутствовать. При взаимодействии комплемента с системой АГ – АТ видимые феномены отсутствуют.

Индикаторная АГ – АТ-система состоит из эритроцитов барана (антиген) и гемолизина (антитела к эритроцитам барана). При взаимодействии комплемента с системой АГ – АТ наблюдают процесс иммунного лизиса эритроцитов. На конкуренции исследуемой и индикаторной систем АГ – АТ за комплемент основана диагностическая РСК (рисунок 15).

Постановка РСК зависят не только от болезни, но и от цели; обнаружение антигены, типирование вируса, обнаружение антител и определение их титра.

При типизации вирусов ящура используют РСК.

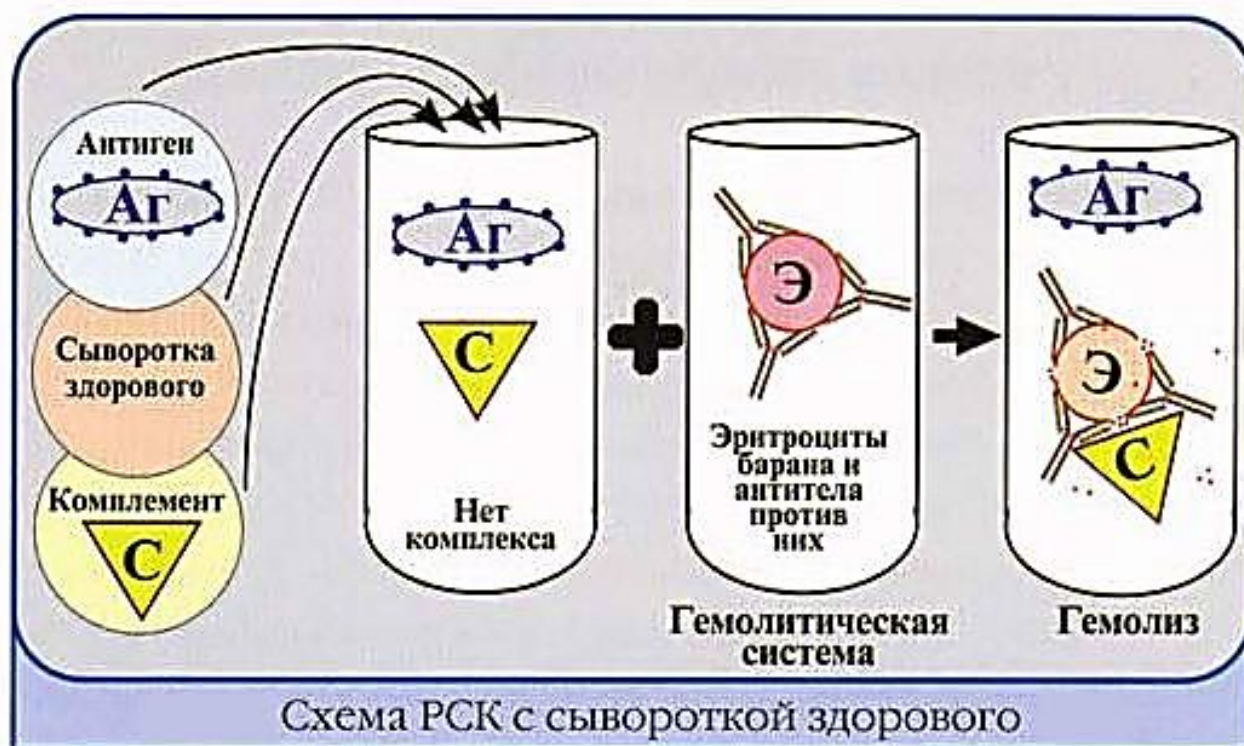


Рисунок 15  
Схема РСК ([www.nsau.edu.ru](http://www.nsau.edu.ru))

Компоненты реакции:

1. *Антиген* – готовят из вирусосодержащего материала, где наибольшее накопление вируса. Если патматериал консервирован, его

отмывают от консерванта стерильным физраствором, затем готовят 10% суспензию на физрастворе или фосфатном буфере. Суспензию переносят в центрифужные пробирки и подвергают 2–3-х кратному замораживанию при 20 °С и оттаиванию в термостате при 37 °С и центрифугируют при 3000 оборотов в минуту 15–20 минут. Надосадочную жидкость используют в качестве антигена. Для устранения антикомплиментарной активности антиген прогревают в водяной бане при 56 °С в течении часа, затем консервируют мертиолятом в разведении 1:10000. Хранят антиген в холодильнике при +4 °С.

2. *Иммунная сыворотка* – используют стандартные типоспецифические сыворотки, они готовятся на биофабрике путем гипериммунизации кроликов каждым типом вируса в отдельности. Сыворотки инактивируют прогреванием в водяной бане при 56–64 °С – 30 мин.

3. *Комплемент* – фактор литического действия, выпускается биофабриками в лиофилизированном виде. Это не специфический термолабильный белок, больше всего его имеется в сыворотке крови морской свинки. Лиофилизированный комплемент сохраняет активность в течение 1 года, комплемент титруют в день постановки главного опыта. В РСК его берут строго определенное количество, чтобы хватило на одну систему. В реакцию комплемента может вступать только при наличии комплекса «антиген + антитело», поэтому если в первой системе не будет комплекса, то комплемент остается не связанным и переходит в гемолитическую систему, где всегда есть указанный комплекс т.к. гемолизин – антитело, а эритроциты барана – антиген.

4. *Эритроциты* – являются антигеном в гемолитической системе. Получают от овец в лаборатории, берут кровь из яремной вены во флакон со стеклянными бусинками и тщательно дефибринируют кровь встряхиванием, затем фильтруют через марлю в центрифужные пробирки и вентилируют при 2000–3000 оборотов в минуту 10–15 минут, недостаточную жидкость удаляют, трижды промывают осадок эритроцитов. Из отмытых эритроцитов готовят 2,5 % взвесь на физрастворе.

5. *Гемолизин* – сыворотка крови кролика, гипериммунизированного эритроцитами барана. Содержат антитела к эритроцитам барана.

Выпускается гемолизин в сухом виде. Физраствор применяют чистый, свежий без консервантов. рН 7,2–7,4.

#### Постановка главного опыта

При определении типов вируса ящура перед проведением главного опыта стандартные сыворотки и антигены не титруют, а используют их в удвоенных титрах. В качестве испытуемого антигена для РСК используют содержимое афт или суспензию из слизистых оболочек, сделанную на физрастворе 1:2. Комплимент берут в рабочем титре. Одновременно ставится контроль с диагностической стандартной сывороткой и стандартным антигеном (таблица 5).

Таблица 5    Постановка главного опыта РСК  
(Н.А. Ожередова с соавт., 2016)

Компоненты реакции	Стандартные сыворотки типов						
	0		А		С		Контроль
	с/а №1	№2б/а	с/а№3	№4б/а	№5 с/а	№6 с/а	7 б/сыв
1. Сыворотки в рабочем титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	–
2. Испытуемый антиген	0,2	–	0,2	–	0,2	–	0,2
3. Комплемент в рабочем титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
4. Физраствор	–	0,2	–	0,2	–	0,2	0,2
Водяная баня 20 минут при 37–38 °С							
5. Эритроциты барана 2,5%	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
6. Гемолизин в рабочем титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 10 минут при 37–38 °С							
Ожидаемый результат	?	гем	?	гем	?	гем	гем

Учет реакции производят сразу после прохождения реакции в гемсистеме (5–10 мин) и через 10–12 часов. Оценивают реакцию в крестах, при этом во внимание принимают наличие осадка эритроци-



тов на дне и цвет надосадочной жидкости. Степень задержки гемолиза оценивают в крестах:

«++++» – 100%, полная задержка гемолиза, жидкость не окрашена, все эритроциты в осадке

«+++» – 75%, выраженная задержка гемолиза, жидкость розовая, эритроциты в осадке

«++» – 50%, частичная задержка гемолиза, жидкость окрашена интенсивно, осадок эритроцитов ясно виден

«+» – 25%, слабая задержка гемолиза, жидкость интенсивно окрашена, осадок незначительный, слабо заметен

«–» – полный гемолиз, жидкость окрашена интенсивно, осадка нет (рисунок 16).

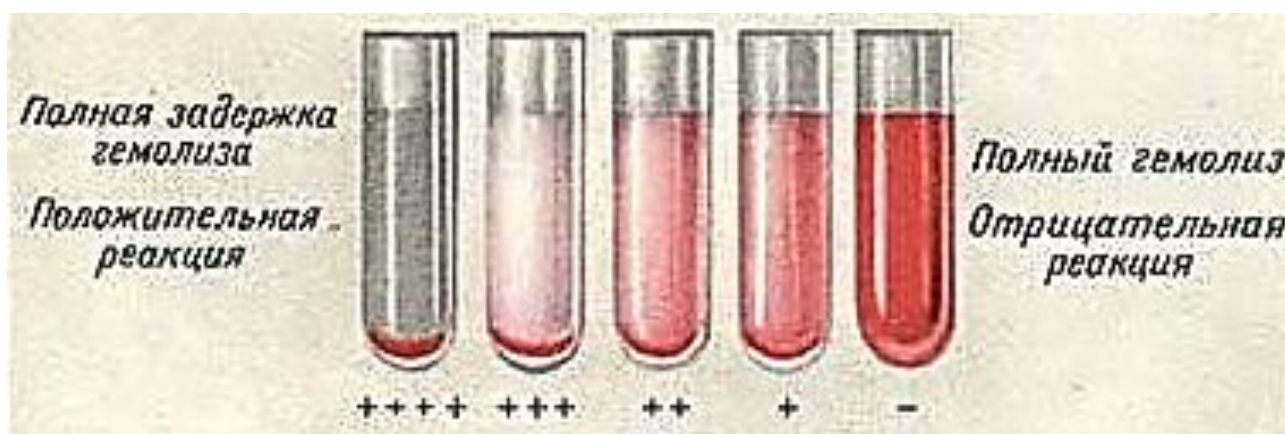


Рисунок 16  
Учёт РСК ([www.nsau.edu.ru](http://www.nsau.edu.ru))

Если количество вирусного материала не достаточно для исследования в РСК проводят его расплодку на культиваторе клеток или на мышатах-сосунах или морских свинках. Мышатам вводят подкожно в область спины 0,1–0,2 мл, морским свинкам внутрикожно в дозе 0,2–0,5 мл, за животными наблюдают 5–7 дней, а затем готовят антиген для РСК.

### **Контрольные вопросы:**

1. Какие практические задачи позволяет решать РСК?
2. В чем заключается сущность РСК?
3. Каковы компоненты РСК?
4. Каким образом проводится постановка РСК?
5. Каким образом проводится учет РСК?

## РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ (РН)

Сущность реакции нейтрализации заключается в способности вируснейтрализующих антител иммунных сывороток подавлять инфекционные свойства вируса. В результате этого вирус утрачивает способность размножаться и вызывать поддающиеся учету изменения в чувствительной к нему биологической системе (культура клеток, развивающийся куриный эмбрион, организм восприимчивого лабораторного животного).

Цели использования в вирусологии:

- для идентификации выделенного вируса;
- определения наличия антител и изменения их титра в сыворотке крови больных и переболевших животных;
- установления количественного содержания антител в лечебных, профилактических и диагностических препаратах (гамма-глобулины, диагностические сыворотки).

В зависимости от цели исследования применяют два варианта постановки РН:

1 – для идентификации и определения титра вируснейтрализующих антител в исследуемых сыворотках крови (в данном случае соединяют равные объемы разных разведения сыворотки с постоянной дозой вируса);

2 – для идентификации и изучения неизвестного вируса (соединяют равные количества одного и того же разведения сыворотки с убывающими дозами вируса).

Определение титра вируснейтрализующих антител.

*Компоненты:*

- исследуемая сыворотка,
- стандартный вирусный антиген AS,
- специфическая гипериммунная сыворотка SS,
- нормальная сыворотка крови, не содержащая специфические антитела, для контроля SN,
- тест-объект (лабораторные животные, культуры клеток, куриные эмбрионы).

Реакцию ставят в два этапа:

первый этап – определение титра вируса;

второй – постановка основного опыта РН в этом варианте.

Для определения титра вируса:

1. готовят 10-кратные разведения вируссодержащего материала,
2. каждым разведением вируссодержащего материала заражают тест-объекты.



3. титр вируса вычисляют статистически, методом Рида и Менча, находят 1 ЛД<sub>50</sub>.

4. для постановки реакции используют 100 или 1000 ЛД<sub>50</sub>.

Например, титр вируса при предварительном его титровании равен 10<sup>8</sup> ЛД<sub>50</sub>/мл, т.е. 1 мл вируса в разведении 10<sup>-8</sup> содержит 1 ЛД<sub>50</sub>, а 100 ЛД<sub>50</sub> равно 10<sup>-6</sup>.

Постановка основного опыта РН. После установления титра вируса готовят двукратные разведения исследуемой сыворотки, начиная с 1:2 до 1:128 и более, в зависимости от предполагаемого титра вируснейтрализующих антител, в объеме 0,5 мл и к каждому разведению сыворотки добавляют по 0,5 мл вирусосодержащего материала в разведении, соответствующем 100 ЛД<sub>50</sub>.

Одновременно ставят контроли:

а) контроль вируса (100 ЛД<sub>50</sub> вирусосодержащего материала соединяют с физиологическим раствором в равных объемах);

б) контроль иммунной сыворотки (иммунную сыворотку в рабочем титре соединяют с вирусосодержащим материалом в равных объемах);

в) контроль нормальной сыворотки (нормальную сыворотку соединяют с 100 ЛД<sub>50</sub> вируса в равных объемах).

Пробирки встряхивают и выдерживают в термостате при 37 °С в течение 30...60 мин. Смесью из каждой пробирки, в том числе и из контрольных, заражают чувствительных лабораторных животных (4 гол.).

Идентификацию вируснейтрализующих антител с применением данного тест-объекта проводят при диагностике ящура, бешенства, лейкоза птиц. Объем и место введения смеси те же, что были выбраны при определении 1 ЛД<sub>50</sub>. Сроки наблюдения за животными аналогичны вышеуказанным.

*Учет результатов.* Вначале учитывают результаты контроля. В первом и третьем из них животные должны погибнуть, во втором – остаться в живых. Если исследуемая сыворотка содержит антитела, то они будут нейтрализовать патогенное действие вируса и животное не погибает. Однако, сыворотку используют в разведениях, и, в связи с этим, в определенной пробирке антител окажется недостаточно для нейтрализации вируса. Процент гибели животных будет нарастать в направлении большего разведения. Все это дает возможность определить титр вируснейтрализующих антител, который рассчитывается по методам Рида и Менча или Кербера.

*За титр антител исследуемой сыворотки* принимают то разведение, которое предотвращает гибель 50% лабораторных животных от действия 100 ЛД<sub>50</sub> вируса (таблица 6).

Таблица 6 Схема постановки реакции нейтрализации  
(определение антител на белых мышах) (Н.А. Ожередова с соавт., 2016)

Компоненты	Номера лунок								Контроли		
	1	2	3	4	5	6	7	8	Вируса	Имунная сыворотка	Нормальная сыворотка
Ф-Б раствор	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		
Исследуемая сыворотка	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5 в дез раствор		0,5	0,5
Получаемые разведения	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256			
Вирус в 100 ЛД <sub>50</sub>	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5 в дез раствор	0,5	0,5	0,5
Экспозиция 20 мин при комнатной температуре											
Заражения мышей	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Экспозиция 30...60 мин при комнатной температуре. Выжило/погибло											
Учет результатов	4/0	4/0	4/0	3/1	3/1	2/2	1/3	0/4	0/4	4/0	0/4

Титр антитела = 1:64

При использовании РКЭ результат РН учитывают по способности вируснейтрализующих антител сыворотки предотвращать гибель эмбрионов, появление фокусов поражения на хорионаллантоисе и снижать титр вирусных гемагглютининов у 50% куриных эмбрионов. Эти методы применимы при определении нейтрализующей активности сывороток по отношению к вирусам гриппа, оспы, болезни Ньюкасла, инфекционного ларинготрахеита и бронхита кур.

Результат РН в культуре клеток оценивают по способности вируснейтрализующих антител исследуемой сыворотки в определенных разведениях предотвращать развитие цитопатогенного эффекта (ЦПЭ), что используется при диагностике болезни Ауески, ринопневмонии лошадей, вирусного гастроэнтерита свиней, болезни Тешена, лейкоза птиц и др. По торможению феномена гемадсорбции к зараженным вирусом клеткам эритроцитов курицы, человека, морской свинки диагностируют грипп и парагрипп.

## РН для идентификации вируса

### *Компоненты:*

- исследуемый вируссодержащий материал,
- диагностическая (известная),
- нормальная (отрицательная),
- тест-объект.

Этот вариант позволяет идентифицировать исследуемый вирус и определить индекс нейтрализации (ИН) специфических и исследуемых сывороток.

Для постановки *РН* готовят постоянные разведения специфической и нормальной сывороток (обычно 1:10) и три ряда 10-кратно убывающих разведений вируса по 0,5 мл.

Последнее разведение вируса, взятого в опыт, должно превышать его биологический титр, так как в противном случае будет невозможно рассчитать индекс нейтрализации: например, если титр вируса  $10^7$  ЕД<sub>50</sub>, то в опыт следует брать вирус до разведения  $10^{-8}$ . В пробирки первого ряда добавляют специфическую сыворотку (1:10) по 0,5 мл, во второй ряд – нормальную сыворотку по 0,5 мл, в третий – физиологический раствор по 0,5 мл. Объем сыворотки и вируса должен быть одинаковым. Пробирки встряхивают и оставляют на контакт. Продолжительность этого периода и температуру варьируют в зависимости от вируса, с которым проводится работа. После инкубации смесь сыворотки с разведениями вируса в объеме по 0,2 мл вводят в чувствительную тест-систему, начиная с разведения  $10^{-8}$ . Затем проводят учет реакции (таблица 7).

*Учет реакции.* Если происходит нейтрализация вируса (нет изменений в чувствительном объекте), значит, антитела диагностической сыворотки специфичны исследуемому вирусу. Все это дает возможность определить вид вируса.

При учете результатов РН по этому варианту пользуются методом определения индекса нейтрализации по Риду и Менчу. Индекс нейтрализации представляет собой отношение дозы вируса в смеси с нормальной сывороткой, вызывающей изменения у 50% чувствительных объектов, к дозе вируса, вызывающей те же изменения в смеси с иммунной сывороткой. Или, другими словами, это число, показывающее, во сколько раз специфическая сыворотка снижает титр вируса по сравнению с нормальной.

В нашем примере

$$\text{ИН} = T_1 / T_2 = 10^7 / 10^2 = 10^5,$$

где  $T_1$  – титр вируса в присутствии нормальной сыворотки;

$T_2$  – титр вируса в присутствии специфической сыворотки.

Индекс нейтрализации до 10 указывает на отсутствие вирус-нейтрализующих антител в сыворотке, от 11 до 49 считается сомнительным, а 50 и выше – положительным.

Таблица 7 Схема реакции нейтрализации для идентификации вируса  
(Н.А. Ожередова с соавт., 2016)

Компоненты	Разведение вируса								Контроль сывороток 1:10	Титр вируса, Ig	Индекс нейтрализации, Ig
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>			
Специфическая сыворотка 1:10	+	+	–	–	–	–	–	–	–	2	5
	+	+	–	–	–	–	–	–	–		
	+	–	–	–	–	–	–	–	–		
	+	–	–	–	–	–	–	–	–		
Нормальная сыворотка 1:10	+	+	+	+	+	+	+	–	–	7	–
	+	+	+	+	+	+	+	–	–		
	+	+	+	+	+	+	–	–	–		
	+	+	+	+	+	+	–	–	–		
Физиологический раствор	+	+	+	+	+	+	+	–	–	7	–
	+	+	+	+	+	+	+	–	–		
	+	+	+	+	+	+	–	–	–		
	+	+	+	+	+	+	–	–	–		

*Микрометод РН.* Применяется при диагностике везикулярного стоматита, гриппа, парагриппа, аденовирусных инфекций. При данном методе используют пластмассовые пластины, в лунках которых выращивают соответствующую культуру клеток (ПЭС, ФЭК, СПЭВ, ТБ). Затем в лунки вносят двукратные разведения испытуемой сыворотки, соединенные с суспензией вируса в концентрации 100 ТКИД<sub>50</sub> (тканевая инфицирующая доза) и через 4–7 суток инкубации оценивают выраженность цитопатического действия вирусов. Данный метод позволяет значительно снизить расходы исследуемых сывороток и вирусного диагностического материала, одновременно исследовать большое количество образцов сывороток.

*Цветная проба.* Суть этой реакции заключается в способности вируса подавлять обменные процессы в зараженных клетках культуры

ткани. Клеточные суспензии с определенной концентрацией клеток добавляют в пробирку или в лунки пластмассовых пластин через час после внесения в них смеси вируса с определенными разведениями сыворотки. Цветная проба основана на том, что клетки, размножаясь в незараженных пробирках или пробирках со смесью вируса и нейтрализовавших его антител, образуют много кислых продуктов обмена, которые снижают рН питательной среды. Это легко обнаруживают благодаря включенному в состав среды индикаторному красителю (например, феноловому красному), цвет которого меняется в зависимости от рН среды. Красный цвет при рН 7,4–7,8 становится оранжевым при рН 7,2, а при снижении рН ниже 7,0 – желтым. При гибели клеток под воздействием вируса не наблюдается выделения достаточного количества кислых продуктов, поэтому среда остается красной.

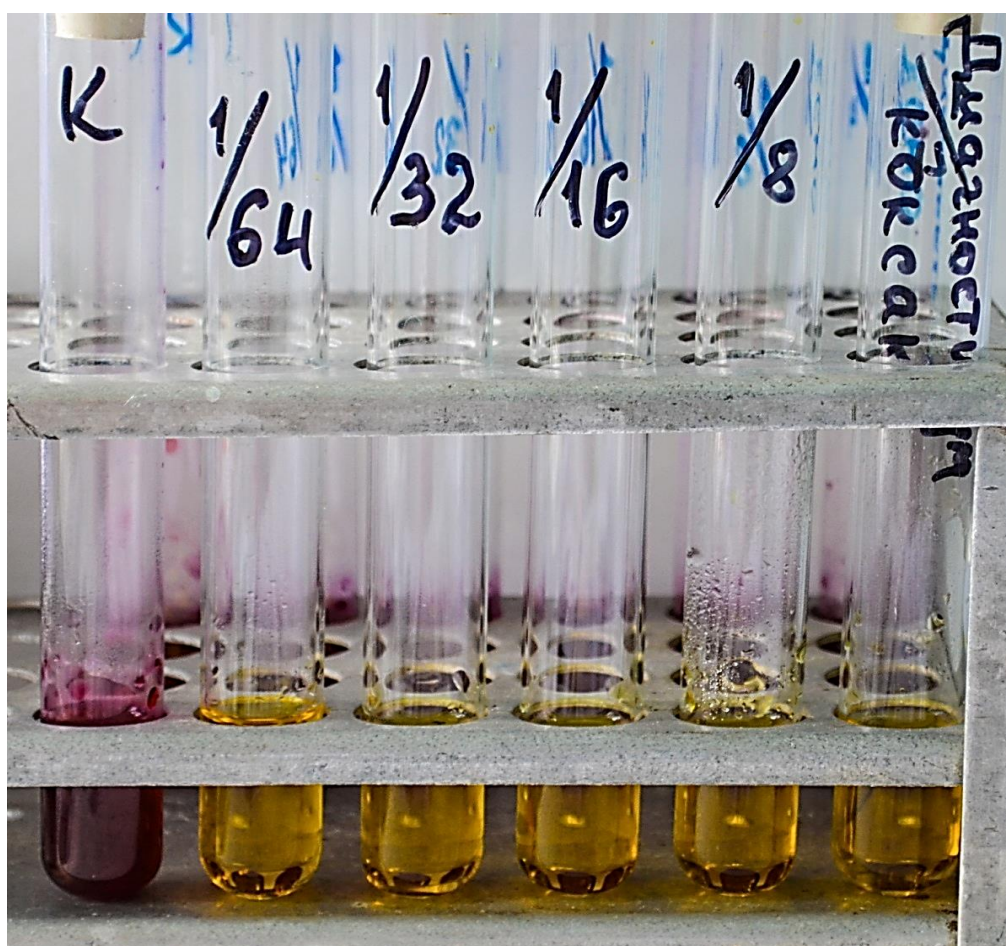


Рисунок 17  
Цветная проба (<http://intranet.tdmu.edu.ua>)

Титр вируснейтрализующих антител определяют как последнее разведение сыворотки, которое в присутствии добавленного вируса позволило клеткам сохранить нормальные обменные процессы, а

следовательно, и снизить рН среди до того же уровня, что и в неза-  
раженной контрольной культуре. Обычно цветную пробу широко  
используют при работе с энтеро- и аденовирусами животных, а также  
вирусами птиц (болезни Ньюкасла, инфекционного бурсита, инфек-  
ционного синовита сухожилий, болезни Марека, инфекционного  
бронхита птиц, герпеса индеек).

*Метод супернейтрализации.* Данный метод используется для  
более точного количественного выявления содержащихся в сыворот-  
ках антител. Он основан на повторном добавлении индикаторного  
вируса, использованного при первоначальной постановке РН, ко всем  
пробам сывороток, нейтрализовавшим вирус на первом этапе. В ре-  
зультате вновь возникает реакция взаимодействия между вирусом и  
избыточным количеством антител. В пробах с более низким содер-  
жанием антител эта нейтрализация не происходит или будет частич-  
ной, в результате чего проявится ЦПД вируса на клетки. В пробах с  
избытком антител ЦПД будет вновь отсутствовать из-за полной  
нейтрализации вируса этими антителами.

Достоинства реакции:

- Универсальность. РН может применяться для лабораторной  
диагностики любых вирусных заболеваний.
- Можно проводить определение не только видов, но и типов  
вирусов.
- РН выявляет даже очень малое количество антител в сыворотке  
крови.
- Проведение ретроспективной диагностики и определение  
напряженности поствакцинального иммунитета.

Недостатки реакции:

- Трудоемкость и дороговизна.
- Длительность опыта.
- Необходимость поддержания живых лабораторных моделей.
- Трудность учета.

**Контрольные вопросы:**

1. Какие практические задачи позволяет решать РН?
2. В чем заключается сущность РН?
3. Каковы компоненты РН?
4. Каким образом проводится постановка РСК?
5. Каким образом проводится учет РСК?
6. Каким образом проводят постановку биопробы по типу РН?

## ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ (ИФА)

Иммуноферментный анализ (ИФА) – иммунологический метод качественного или количественного определения антигена/антитела в основе которого лежит специфическая реакция антиген-антитело. Выявление образовавшегося комплекса проводят с использованием фермента в качестве метки для регистрации сигнала.

Сущность метода. Антиген или антитело присоединяется к твердой фазе, при взаимодействии со специфическим антителом или антигеном образуется иммунный комплекс. Для его визуализации используют ферменты-метки. Эти ферменты расщепляют субстрат и вызывают изменение цвета среды.

ИФА проходит в 3 стадии:

1. стадия узнавания тестируемого соединения специфическим к нему антителом/антигеном, что ведет к образованию иммунного комплекса;

2. стадия формирования связи конъюгата с иммунным комплексом или со свободными местами связывания – это иммунологическая реакция;

3. стадия превращения ферментной метки в регистрируемый сигнал – это ферментативная реакция (рисунок 18).

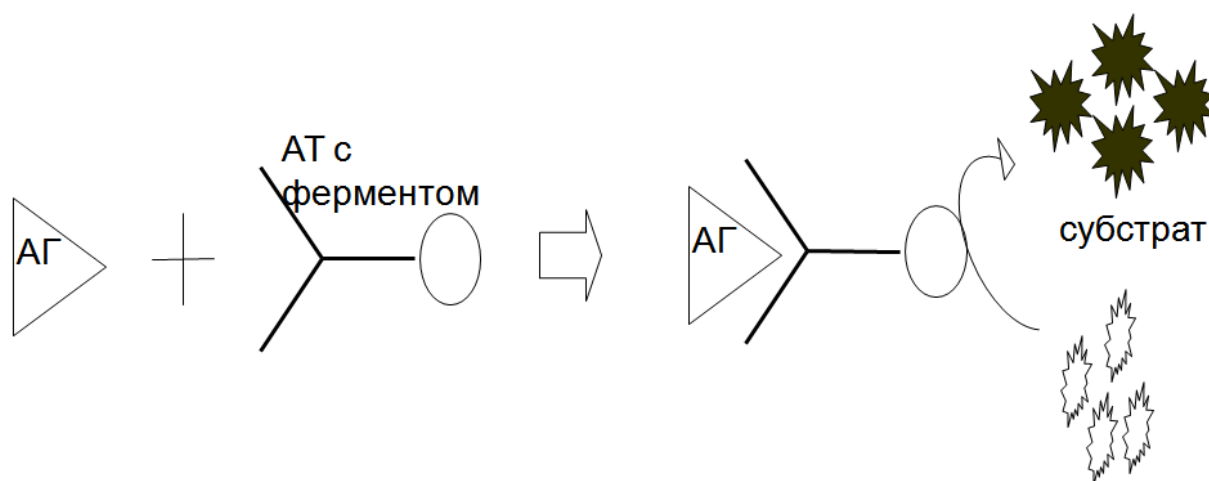


Рисунок 18

Основной принцип ИФА (<http://intranet.tdmu.edu.ua>)

### Классификация методов ИФА

ИФА включает две группы способов постановки реакции:

1. Гетерогенный (твердофазный) – проведение анализа на твердой фазе в виде последовательных стадий. После каждой стадии происходит отмывка твердой фазы и удаление промежуточных продуктов и избытка не прореагировавших компонентов.

2. Гомогенный – вся совокупность иммунологических и ферментативных реакций происходит в единой смеси всех используемых компонентов реакции без их разделения и удаления промежуточных продуктов и не прореагировавших компонентов.

Необходимо отметить, что гомогенные методы анализа очень сложны в отработке оптимальных условий их проведения и используются практически только для определения низкомолекулярных гормонов, метаболитов и лекарственных веществ.

Гетерогенные же методы ИФА более просты и воспроизводимы и поэтому стали широко использоваться для качественного и количественного выявления высокомолекулярных веществ и получили широкое распространение в диагностике инфекционных болезней человека и животных.

Варианты ТИФА по типу реагентов, участвующих в первой стадии реакции

*1. конкурентный* – на первой стадии анализа в системе одновременно присутствуют анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за имеющиеся в относительном недостатке центры специфического связывания.

Необходимым условием конкурентного метода является недостаток центров специфического связывания по отношению к суммарной концентрации анализируемого соединения и его аналога.

Немеченый исследуемый образец и известное количество меченого искомого вносят в лунки, сенсibiliзируют АГ или АТ одновременно, где происходит конкуренция между первым и вторым образцами за связывание с твердофазным иммуносorbентом. В этом случае количество связанной с твердой фазой метки обратно пропорционально количеству искомого образца.

*2. неконкурентный* – на первой стадии в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антиген и специфические антитела).

Реакция АГ-АТ происходит на поверхности твердой фазы, ингредиенты добавляются последовательно и определяется количество метки, связавшейся с носителем. При этом количество связавшейся метки прямо пропорционально количеству искомого АТ или АГ в исследуемом образце.



### 2.1 Прямой твердофазный ИФА

Вирусный антиген адсорбируют в лунках полистироловой микропанели. Вносится конъюгат против антигена. Если антиген и антитело окажутся специфичными образуется иммунный комплекс. Фермент этого комплекса после добавления субстрата вызывает разложение субстрата индикаторного раствора и образование растворимого окрашенного продукта (рисунок 19).

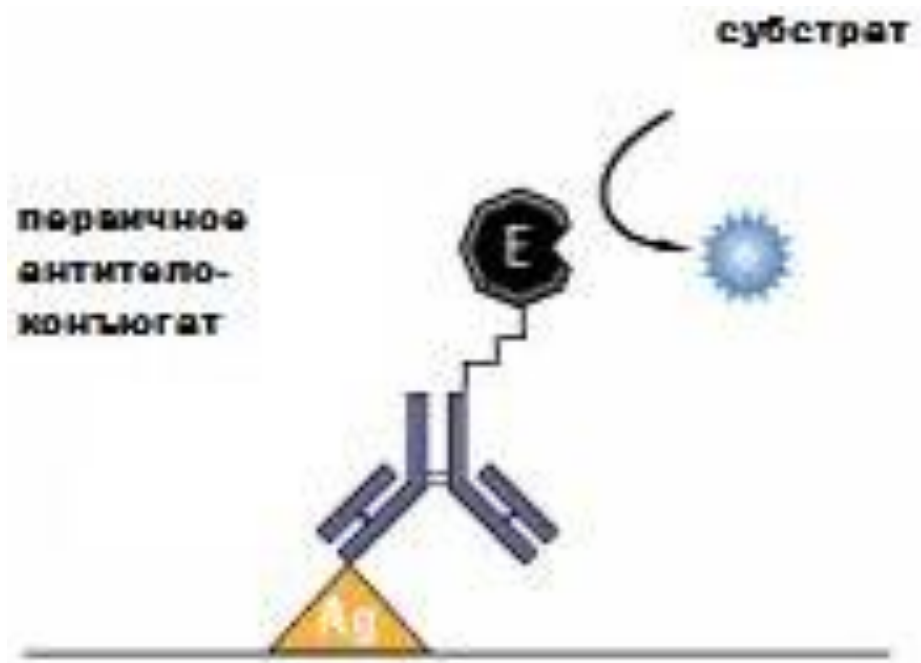


Рисунок 19  
Прямой ТИФА (<https://medach.pro>)

При этом интенсивность окраски раствора в лунке микропанели пропорциональна количественному содержанию антител в исследуемом материале.

### 2.2 Непрямой твердофазный ИФА

Вирусный антиген, адсорбированный в лунках полистироловой микропанели, связывается со специфическими антителами, присутствующими в сыворотке крови, в результате чего формируется комплекс «антиген–антитело». Полученный иммунный комплекс выявляется после взаимодействия с антивидовым конъюгатом, фермент которого после добавления субстрата вызывает разложение субстрата индикаторного раствора и образование растворимого окрашенного продукта.

При этом интенсивность окраски раствора в лунке микропанели пропорциональна количественному содержанию антител в исследуемом материале (рисунок 20).

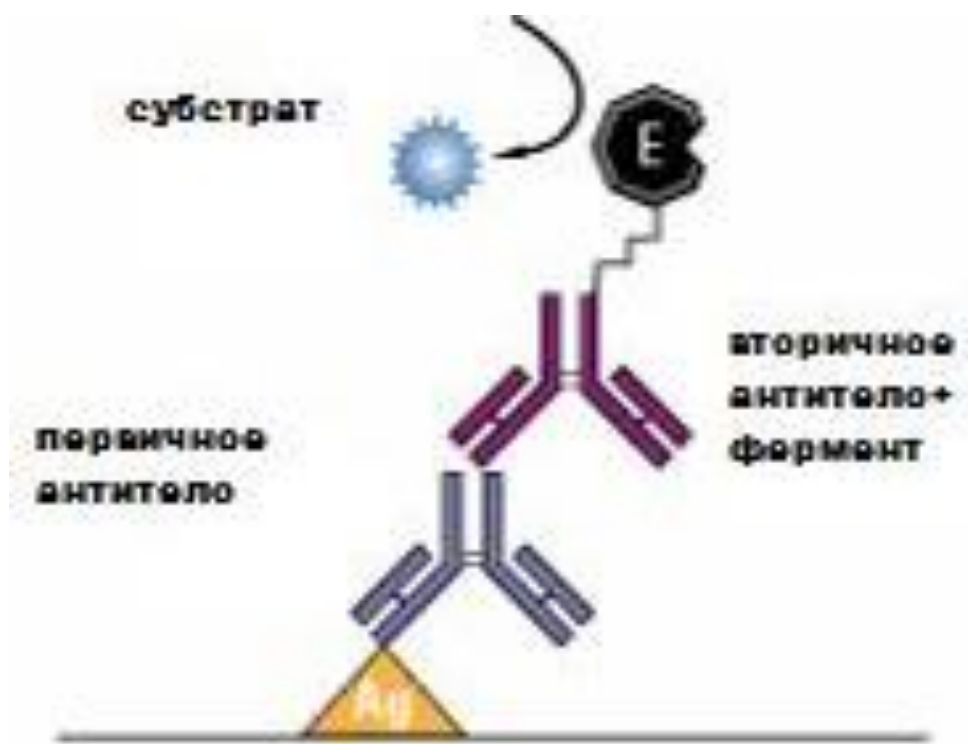


Рисунок 20  
Непрямой ТИФА (<https://medach.pro>)

### 2.3 Сэндвич ИФА

Антитела к антигену, адсорбированные в лунках полистироловой микропанели, связываются с антигеном, присутствующим в исследуемом материале, в результате чего формируется комплекс антиген-антитело. Полученный иммунный комплекс выявляется после взаимодействия с конъюгатом, фермент которого после добавления субстрата вызывает разложение субстрат-индикаторного раствора и образование окрашенного продукта. При этом интенсивность окраски в лунке микропанели пропорциональна содержанию вируса в исследуемом материале (рисунок 21).

#### Цели использования в вирусологии:

1. ранняя диагностика инфекционных болезней;
2. определение иммунологического статуса у животных и изучение эффективности применения вакцин;
3. контроль качества биопрепаратов.

#### Компоненты реакции:

##### *1. Антигены и антитела.*

Должны быть высокоочищенными и высокоактивными. АГ должны обладать высокой антигенностью, оптимальной плотностью расположения и количеством антигенных детерминант, чужеродностью и гомогенностью. Многие синтетические и рекомбинантные АГ

вирусов и бактерий хорошо себя зарекомендовали при использовании в ИФА. Это существенно повысило специфичность и воспроизводимость метода за счет сведения к минимуму перекрестных реакций. Чувствительность ИФА зависит от концентрации, активности и специфичности используемых антител. Используемые антитела могут быть поли- или моноклиальными, различного класса (IgG или IgM) и подкласса (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub>), антиаллотипическими или антиидиотипическими. При низкой аффинности АТ распад комплекса АГ-АТ приводит к удалению связанного АГ из системы. Чувствительность и специфичность метода повышается при использовании моноклональных антител. В этом случае появляется возможность обнаруживать низкие концентрации АГ (АТ) в испытуемых образцах.

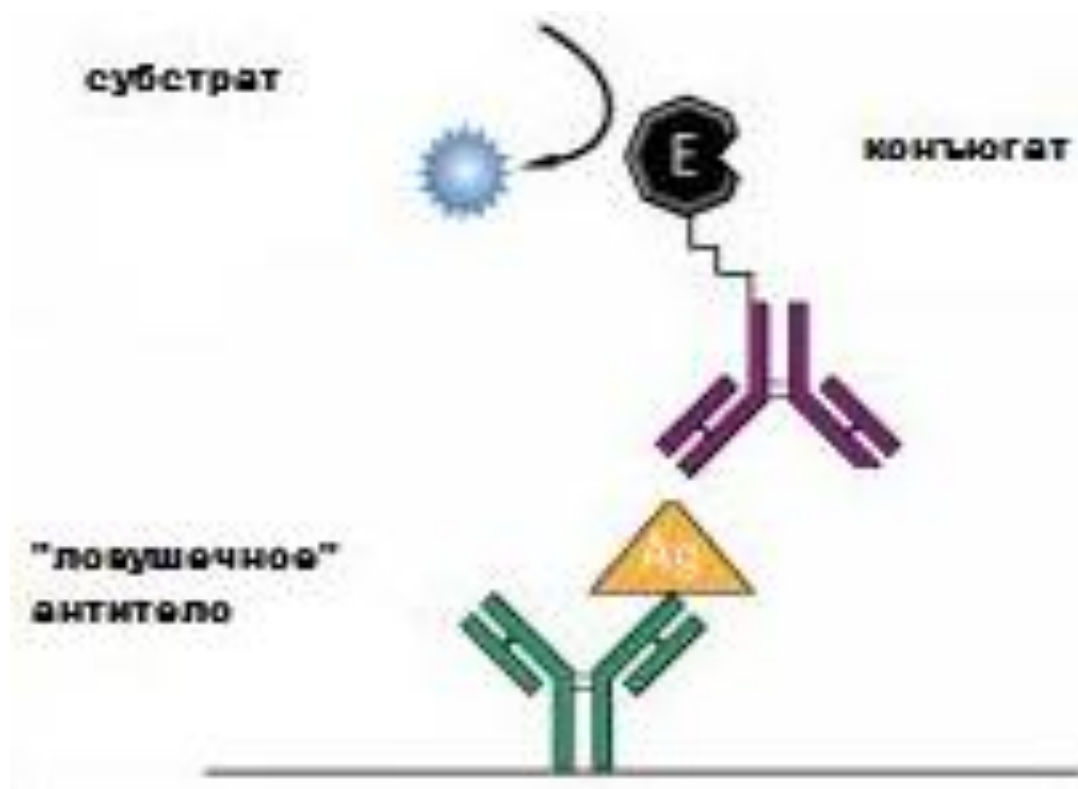


Рисунок 21  
Сэндвия ИФА (<https://medach.pro>)

2. *Конъюгат* – это антивидовое антитело, меченные ферментной меткой. Часто используют иммунопероксидазные конъюгаты против IgG.

3. *Твердая фаза* – полистирольные пластины с 96 лунками с адсорбированными антителами или антигенами. Для твердофазного ИФА используется множество различных носителей, к которым сорбционно или, реже, ковалентно присоединяются соответствующие

антигены и антитела. В ранних работах носителями служили частицы сефарозы, целлюлозы, биогель, латекс, пористое стекло, силохромы и другие. Наиболее широкое распространение получил метод физической адсорбции на поверхности полистирольных пластин. Количество адсорбированного вещества при этом зависит от многих факторов: природы и дозы сенситина, pH, времени сенсибилизации, температуры инкубации. Удобно заранее заготовить панели с адсорбированным на них белком и хранить их в холодильнике до употребления. Можно также длительно сохранять сенсибилизированные панели при  $-70^{\circ}\text{C}$ . На сегодняшний день широко используются полистироловые пластины зарубежных фирм (Cooke, Dynateck; Linbro; Flow и другие), ленинградского завода «Медполимер» и производства ВНИИ мед-техники.

#### *4. Фермент – метка*

Применяют только те, которые расщепляют субстрат с образованием легко определяемых продуктов. Ферменты должны отвечать следующим требованиям:

- содержать в структуре определенные реакционные группы, по которым идет связывание с молекулой иммунореагента, не меняя его специфичности;
- быть чистыми;
- сохранять ферментативную активность в конъюгированном с иммунореагентом виде.

Ферменты представляют собой очень удобные метки потому, что их каталитические свойства позволяют действовать им в качестве усилителей, т.к. одна молекула фермента может способствовать образованию более  $1 \cdot 10^5$  молекул продукта каталитической реакции в минуту. Нельзя рекомендовать какой-либо один фермент; у каждого есть свои недостатки и достоинства, поэтому выбор фермента зависит не только от перечисленных выше качеств, но и конкретных целей и способов исследования.

Наиболее часто используют в ИФА пероксидазу, которая широко доступна и не так дорога, как другие ферменты, стабильна при хранении.

*5. Субстрат.* Выбор субстрата для выявления связанного фермента в системе «антиген-антитело» зависит от вида фермента-метки, так как реакция фермента с субстратом специфична.

Нужно использовать субстраты, позволяющие проводить визуальный и инструментальный учет реакции. С этой точки зрения,

наиболее подходящие, так называемые, хромогенные субстраты, растворы которых, изначально бесцветные, в процессе ферментативной реакции приобретают окраску, интенсивность которой пропорциональна количеству фермента.

Для выявления активности **пероксидазы** в твердофазном ИФА в качестве субстрата чаще всего используют **5-аминосалициловую кислоту**, образующую интенсивное коричневое окрашивание, **орто-фенилендиамин**, дающий оранжево-желтое окрашивание, и **ABTS** (2,2-ази-но-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) аммония), дающий окраску цвета морской волны. Для выявления активности **щелочной фосфатазы** и **β-галактозидазы** используется исключительно **нитрофенилфосфаты** и нитрофенил-галактозиды, соответственно.

#### Постановка распространенных вариантов ИФА.

Основные принципы твердофазного ИФА, независимо от модификации, заключаются в следующем:

1. На первом этапе реакции адсорбируют антигены или антитела на твердой фазе. При этом не связавшиеся с твердой фазой реагенты легко удаляются отмыванием.

2. В сенсibilизированных лунках инкубируют исследуемый образец. В лунках с положительным контролем – стандартные реагенты. При этом на поверхности твердой фазы формируются иммунные комплексы. Несвязавшиеся компоненты удаляют отмыванием.

3. При добавлении конъюгата антитело-фермент или антиген-фермент и связывании его с иммобилизованным иммунным комплексом активный центр фермента остается доступным для последующего взаимодействия с субстратом. Инкубация субстрата в лунках с иммобилизованным конъюгатом приводит к развитию цветной реакции. Эту реакцию можно остановить на нужной стадии, выраженность окрашивания можно оценить визуально или по оптической плотности.

4. Учёт реакции. Реакцию учитывают визуально по разности окраске опытных и контрольных образцов (или на фотоэлектроколориметре калориметрически).

Положительные образцы интенсивно-коричневого цвета, отрицательные – не окрашены или слабожёлтого цвета (рисунок 22).

#### Достоинства реакции:

высокая специфичность и чувствительность;

достоверность и воспроизводимость результатов;



простота постановки и скорость проведения анализа;

получение достоверных количественных данных при анализе единичного разведения сыворотки с использованием стандарта в качестве калибровочной пробы и возможность их автоматизированной обработки.

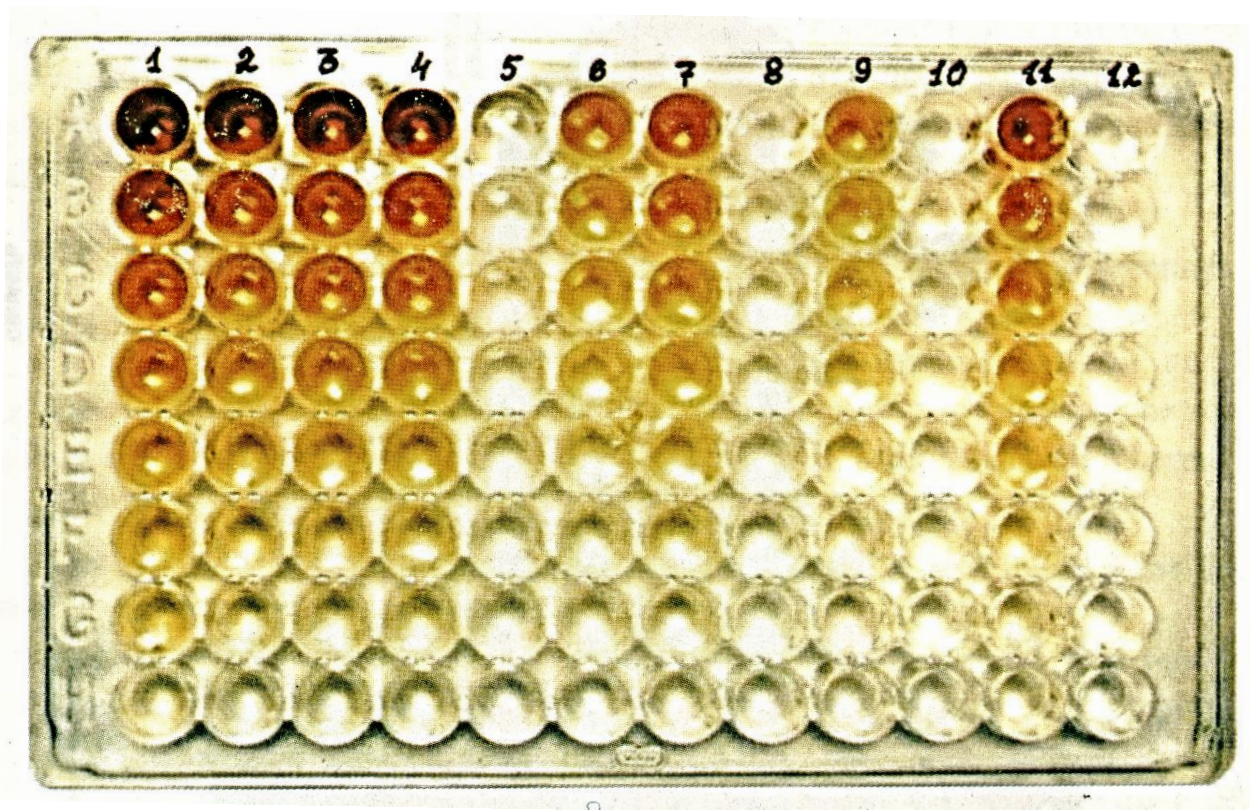


Рисунок 22

Учёт ИФА:

ряды 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9 – положительные пробы;  
ряды 5, 8, 10 – отрицательные пробы (не окрашены);  
ряд 11 – положительный контроль; ряд 12 – отрицательный контроль  
(П.И. Барышников с соавт., 2015)

### Контрольные вопросы:

1. Сущность иммуноферментного анализа и применение при вирусологических исследованиях.
2. Сущность, компоненты, методика, учёт и применение гистохимического прямого метода ИФА.
3. Сущность, компоненты, методика, учёт и применение гистохимического непрямого метода ИФА.
4. Сущность, компоненты, методика, учёт и применение твердофазного метода двойных антител «сэндвич»-варианта.
5. Достоинства и недостатки иммуноферментного анализа.

## ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – это амплификация специфических последовательностей нуклеиновых кислот, с помощью которой в течение нескольких часов можно размножить нужную последовательность в миллионы раз. Амплификация – увеличение числа копий ДНК.

*История открытия метода.* Открытие метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) стало одним из наиболее выдающихся событий в области молекулярной биологии за последние десятилетия. Это позволило поднять медицинскую диагностику на качественно новый уровень.

Основные принципы использования праймеров (коротких искусственно синтезированных молекул ДНК) и состав ингредиентов, входящих в реакционную смесь для получения копий ДНК впервые были описаны *Kleppre* с соавт. в 1971 году. Однако тогда еще не была продемонстрирована основная черта ПЦР – экспоненциальное увеличение количества копий фрагмента исходной ДНК как результат реакции.

В 1983 году сотрудник фирмы «Cetus» *Kary Mullis* предложил метод, ставший в дальнейшем известным как полимеразная цепная реакция. Суть метода заключается в многократном копировании (амплификации) в пробирке определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой. Благодаря этому происходит многократное увеличение количества специфических фрагментов ДНК, что значительно упрощает дальнейший анализ.

Сущность реакции. ПЦР позволяет осуществить амплификацию в пробирке при помощи фермента термостабильной ДНК-полимеразы из 4 дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, являющихся структурными элементами любой ДНК, и коротких олигонуклеотидных 20–30-членных затравок (праймеров), комплементарных 3'-концевым последовательностям антипараллельных цепей ДНК гена.

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо наличие в реакционной смеси ряда компонентов (рисунок 23):

*Праймеры* – короткий фрагмент нуклеиновой кислоты (олигонуклеотид), комплементарный ДНК- или РНК-мишени, служит затравкой для синтеза комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы (при репликации ДНК). Затравка необходима ДНК-полимеразам для инициации синтеза новой цепи, с 3'-конца (гидроксильной груп-

пы) праймера. ДНК-полимераза последовательно добавляет к 3'-концу праймера нуклеотиды, комплементарные матричной цепи.



Рисунок 23

Исходные компоненты ПЦР (<http://www.lytech.ru>)

*Taq-полимераза* – термостабильный фермент, обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности.

*Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ)* – дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) – «строительный материал», используемый *Taq-полимеразой* для синтеза второй цепи ДНК.

*Буфер* – смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH. (Ионы магния).

*Анализируемый образец* – подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфический продукт амплификации не образуется.

*Минеральное масло* – наслаивается на поверхность реакционной смеси для предотвращения испарения.

Каждый цикл амплификации ДНК состоит из трех этапов (рисунок 24).

1. Денатурация. На первой стадии при температуре 94 °С (или выше) происходит денатурация двойной цепи, исследуемой ДНК.

На первом этапе необходимо расплести двойную цепь ДНК, находящуюся в образце. Для этого реакционную смесь нагревают до 92–95 °С, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул.



2. Отжиг – при температуре 56–60 °С два олигонуклеотида-прайма, строго специфичные (гомологичные) к определенным участкам антипараллельных цепей исследуемой ДНК, связываются (образуют гибриды с помощью водородных связей) с этими участками ДНК.

Праймеры подбирают так, что они ограничивают (фланкируют) искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК.

Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина – цитозин. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит.

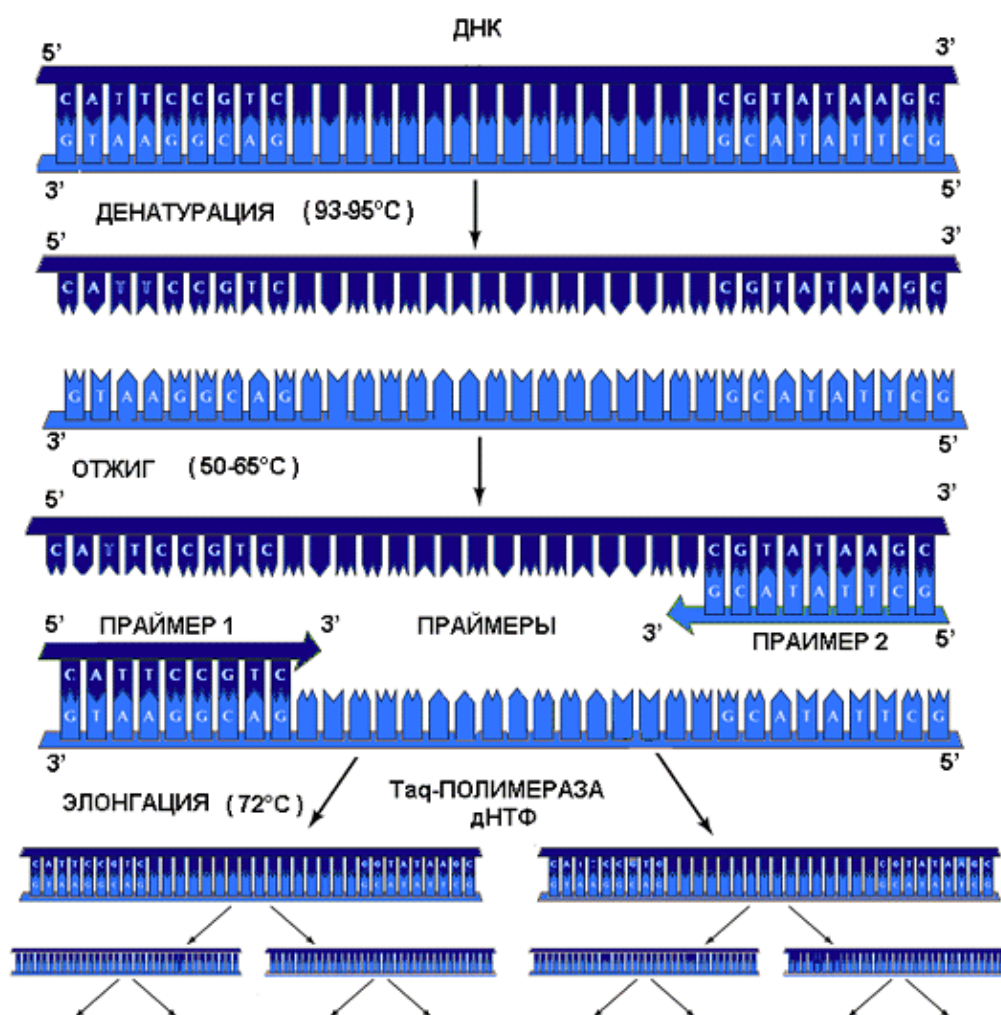


Рисунок 24  
Стадии ПЦР (<http://lages-lab.ru>)

3. Элонгация (синтез). При температуре 70–72 °С с участием термофильной ДНК-полимеразы и дезоксинуклеозидтрифосфатов происходит синтез новых цепей ДНК. Инициация синтеза ДНК про-

исходит в местах связывания олигонуклеотидов-праймеров с исследуемой ДНК, матрицей для синтеза служат исходные цепи ДНК (стадия полимеризации).

Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается. Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК. Таким образом, специфические фрагменты, ограниченные на концах праймерами, впервые появляются в конце второго цикла, накапливаются в геометрической прогрессии и очень скоро начинают доминировать среди продуктов амплификации.

#### Цели использования ПЦР в вирусологии:

1) выявления ДНК (РНК) возбудителей инфекционных болезней в биологическом (патологическом) материале от животных и птиц, в объектах внешней среды, в кормах для животных и пищевых продуктах;

2) эпизоотологического мониторинга инфекционных болезней животных и птиц;

3) определения видовой принадлежности бактериальных культур, а также для обнаружения контаминатов в культуре клеток;

4) идентификации генетически модифицированных источников (ГМИ) растительного происхождения в пищевых продуктах;

5) научных целей при генотипировании штаммов или других видов анализа.

#### Основные этапы ПЦР (постановка реакции).

1. подготовка исследуемой пробы материала, которая в большинстве случаев сводится к выделению ДНК или РНК;

2. собственно ПЦР;

3. детекция продукта ПЦР (амплифицированной нуклеиновой кислоты).

#### 1. Выделение ДНК/РНК

Для экстракции ДНК используют два основных метода.

1. классическая процедура фенольно-хлороформной экстракции. При этом достигается хорошая очистка ДНК и, в первую очередь, от ингибиторов Taq-полимеразы, но неизбежны большие потери нуклеиновой кислоты, особенно заметные при работе с образцами небольшого объема с низкой концентрацией инфекционного агента.

2. использование сорбентов. Подготовка материала с его использованием занимает меньше времени и более проста в исполнении,

хотя не всегда может быть применена, так как не гарантирует удаление возможных ингибиторов.

Процедура подготовки пробы включает 1. лизис микроорганизма и 2. экстракцию нуклеиновой кислоты.

С целью разрушения клетки используют простое кипячение, замораживание-оттаивание в присутствии лизоцима, а также специальные лизирующие буферы, содержащие детергенты и протеиназу. Выбор метода диктуется природой микроорганизма, а точнее – природой его клеточной стенки.

Для подготовки пробы к постановке ПЦР используют различные методики в зависимости от поставленных задач. Их суть заключается в экстракции (извлечении) ДНК из биопрепарата и удалении или нейтрализации посторонних примесей для получения препарата ДНК с чистотой, пригодной для постановки реакции амплификации. Иногда бывает достаточно прокипятить образец в течение 5–10 минут, однако в большинстве случаев требуются более трудоемкие методы.

Стандартной и ставшей уже классической считается методика получения чистого препарата ДНК, предложенная Marmur. Она включает в себя ферментативный протеолиз клеток с последующей депротеинизацией и переосаждением ДНК спиртом. Однако это метод довольно трудоемок и предполагает работу с такими агрессивными и имеющими резкий запах веществами, как фенол и хлороформ.

## 2. Постановка ПЦР

ПЦР проводят в **амплификаторе** – приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок (рисунок 15).

Для проведения ПЦР в реакционный буфер вводят определенное количество коротких (15–30 пар оснований) олигонуклеотидов (праймеров), комплементарных последовательностям участков ДНК, копию которого хотят получить. Праймеры подбирают таким образом, чтобы их 3'-концы были ориентированы навстречу друг другу, т.е. синтезировался фрагмент ДНК, заключенный между праймерами.

ПЦР проводят следующим образом:

- сначала реакционную смесь нагревают до температуры 90–94 °С, вызывая этим денатурацию ДНК;

- затем температуру снижают до 50–65 °С в зависимости от нуклеотидной последовательности праймеров, чтобы отжиг происходил в строго комплементарных участках, и, наконец, в смеси устанавливают температуру, оптимальную для работы ДНК-полимеразы.

При воспроизведении этого цикла количество копий участка ДНК, находящегося между местами отжига праймеров, возрастает в логарифмической зависимости, т.е. от одной двухцепочечной молекулы можно получить  $2^n$  одноцепочечных копий, где "n" равно количеству циклов (рисунок 25).



Рисунок 25

Термоциклер TProfessional Standard 384 (<http://www.ld.ru/PCR>)

### Детекция продукта ПЦР

Присутствие специфического ПЦР-продукта (**ампликона**) детектируют электрофоретическим разделением ПЦР-амплификационной смеси на окрашенном бромистым этидием в агарозном или полиакриламидном гелях или альтернативными технологиями.

Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение, проявляющееся в виде светящихся полос при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290–330 нм. Полосы визуализируют с помощью ультрафиолетового подсвечивания в трансиллюминаторе и последующим фотографированием.

**Положительными считают пробы**, полосы в которых располагаются в геле точно на таком же расстоянии от старта, что и полоса положительного контроля.

В отрицательном контроле не должно выявляться никаких полос.

Исследуемые **пробы считают отрицательными**, если в них не выявлено никаких полос или полосы не соответствуют по размеру фрагменту в контрольной пробе (т.е. располагаются на другом расстоянии от старта).

Присутствие в отрицательном контроле окрашенных фрагментов на уровне полос положительного контроля свидетельствует о перекрестной контаминации в процессе анализа. Результаты аннулируются. Анализ необходимо провести заново. Для документирования полученных результатов используют фотопленку (рисунок 26).

Для получения правильных результатов ПЦР-анализа весьма важна организация забора клинических образцов, их хранения и транспортировки. Неправильный забор образцов, некачественное хранение и доставка может привести как к ложноположительным, так и ложноотрицательным результатам, несмотря на безупречно проведенную процедуру анализа.

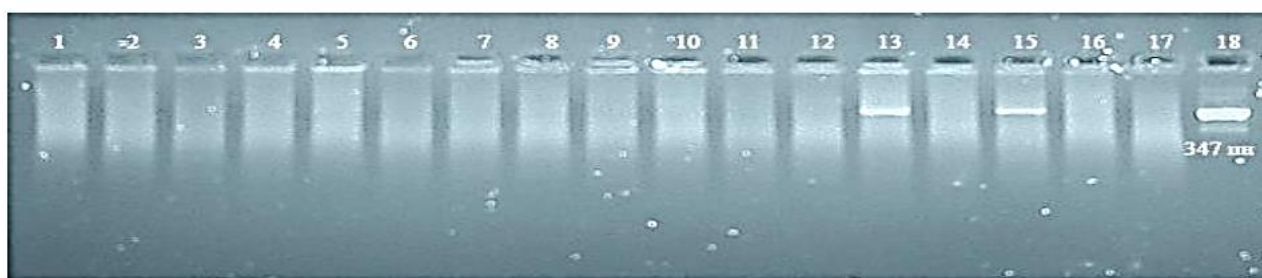


Рисунок 26

Электрофореграмма результатов ПЦР:

18 – К<sup>+</sup> (положительный контроль амплификации);

17 – К<sup>-</sup> (отрицательный контроль амплификации);

1, 3, 15 – положительные пробы (И.С. Пономарёва, 2006)

**Забор проб.** Для ПЦР анализа используют разнообразный клинический материал: кровь, сыворотку крови, форменные элементы крови, мочу, слюну, соскобы и мазки со слизистых, ликвор, слезную жидкость, содержимое везикул, биоптаты органов и тканей. Для исключения контаминации забор проб производят только одноразовым инструментарием (шприцы, соответствующие зонды, прободотборники и пр.). Взятый материал помещают в одноразовые пробирки (например, типа «Эппендорф») или тщательно вымытые (хромовой смесью) стеклянные флаконы, а в некоторых случаях в транспортную среду, предоставляемую ПЦР-лабораторией. При необходимости переноса образца используют автоматические микропипетки со сменными одноразовыми наконечниками. Каждый образец для исключения взаимной контаминации хранят и транспортируют в отдельном полиэтиленовом пакете.

**Хранение образцов.** До транспортировки в ПЦР-лабораторию отобранный биоматериал хранят при температуре 2–4 °С не более

48 ч; для более длительного хранения (до 1 месяца) используют максимально низкую температуру. Необходимо минимизировать время от забора образца до постановки ПЦР-анализа.

**Транспортировка образцов.** Осуществляется в сумках-холодильниках, термоконтейнерах, термосах с термопакетами, льдом или сухим льдом.

## Виды ПЦР

**1. Вложенная ПЦР (Nested PCR)** – применяется для уменьшения числа побочных продуктов реакции. Используют две пары праймеров и проводят две последовательные реакции. Вторая пара праймеров амплифицирует участок ДНК внутри продукта первой реакции.

Одним из способов повысить чувствительность реакции является применение метода «nested» (гнездной) амплификации. Суть его заключается в последовательном использовании двух пар праймеров – внешней и внутренней. После использования первой пары праймеров продукт амплификации переносят в другую пробирку с внутренней парой праймеров. Иногда вместо «nested» амплификации используют процесс реамплификации. В этом случае проводят дополнительный раунд амплификации, в котором используют прежнюю пару праймеров, а в качестве ДНК-мишени – продукт первой реакции амплификации.

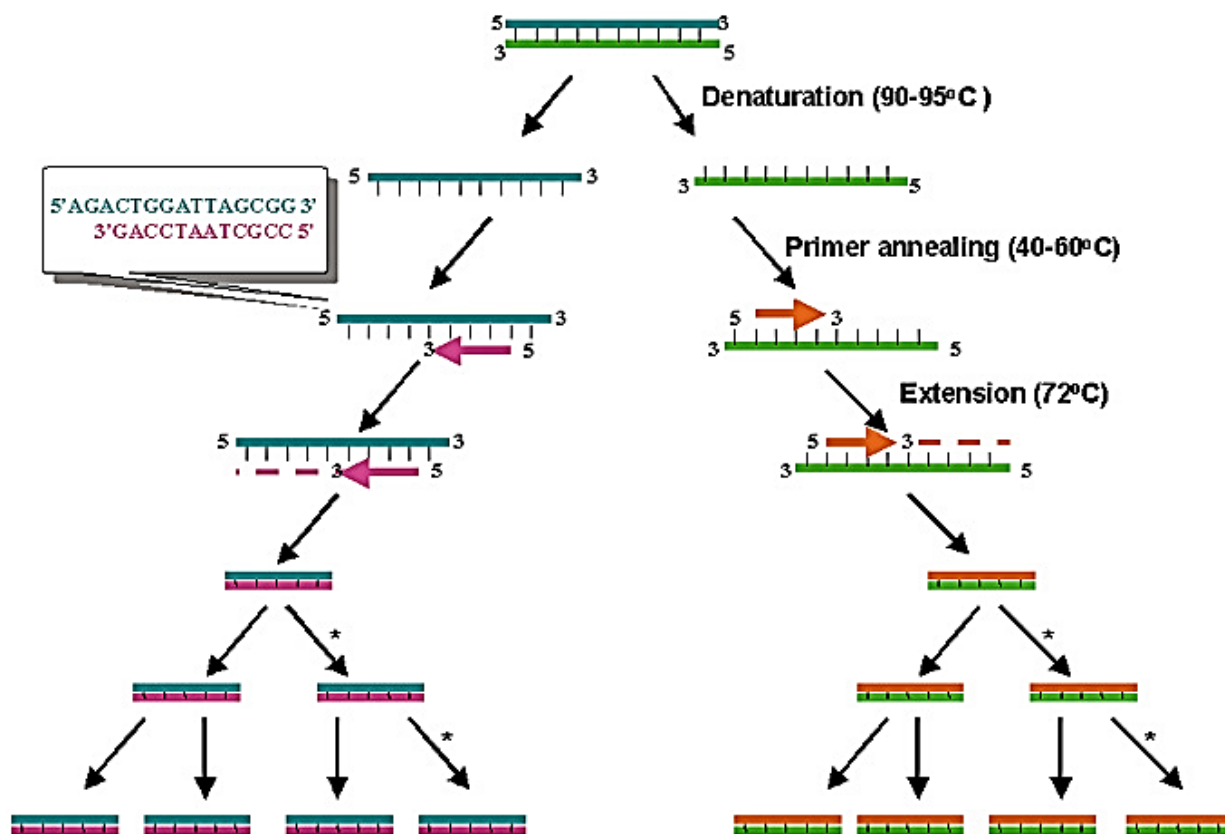


Рисунок 27

Nested PCR (<https://www.abmgood.com>)



Такая схема постановки амплификации более трудоемка, поскольку, как правило, делает необходимым постановку двух реакций амплификации вместо одной и требует особенно тщательного обустройства лабораторных помещений, позволяющих гарантированно избегать контаминации продуктами реакции после использования внешней пары праймеров. К «гнездной» амплификации или реамплификации прибегают лишь в особых случаях, так как современные ПЦР-наборы позволяют добиваться тех же результатов иными средствами (рисунок 27).

**2. ПЦР с обратной транскрипцией (Reverse Transcription PCR, RT-PCR)** – используется для амплификации, выделения или идентификации известной последовательности из библиотеки РНК. Перед обычной ПЦР проводят на матрице мРНК синтез одноцепочечной молекулы ДНК с помощью ревертазы и получают одноцепочечную к ДНК, которая используется в качестве матрицы для ПЦР.

Этим методом часто определяют, где и когда экспрессируются данные гены (рисунок 28).

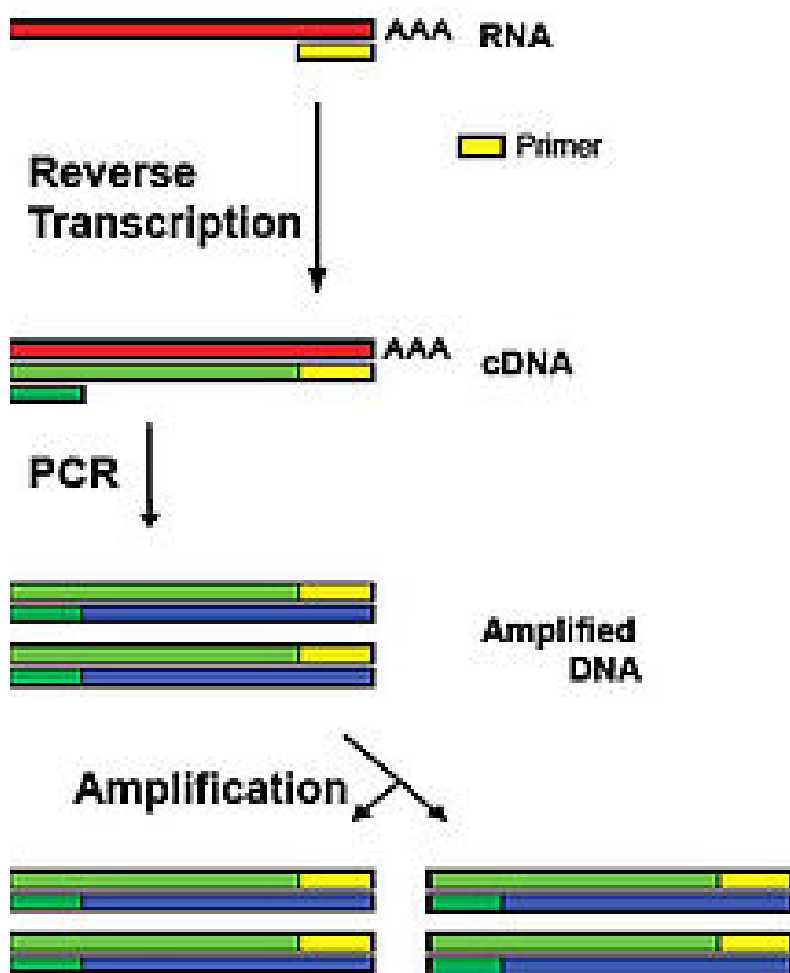


Рисунок 28

ПЦР с обратной транскрипцией (<https://en.wikipedia.org>)

**3. Инвертированная ПЦР (Inverse PCR (англ.))** – используется в том случае, если известен лишь небольшой участок внутри нужной последовательности. Этот метод особенно полезен, когда нужно определить соседние последовательности после вставки ДНК в геном. Для осуществления инвертированной ПЦР проводят ряд разрезов ДНК рестриктазами с последующим соединением фрагментов (лигирование). В результате известные фрагменты оказываются на обоих концах неизвестного участка, после чего можно проводить ПЦР как обычно (рисунок 29).

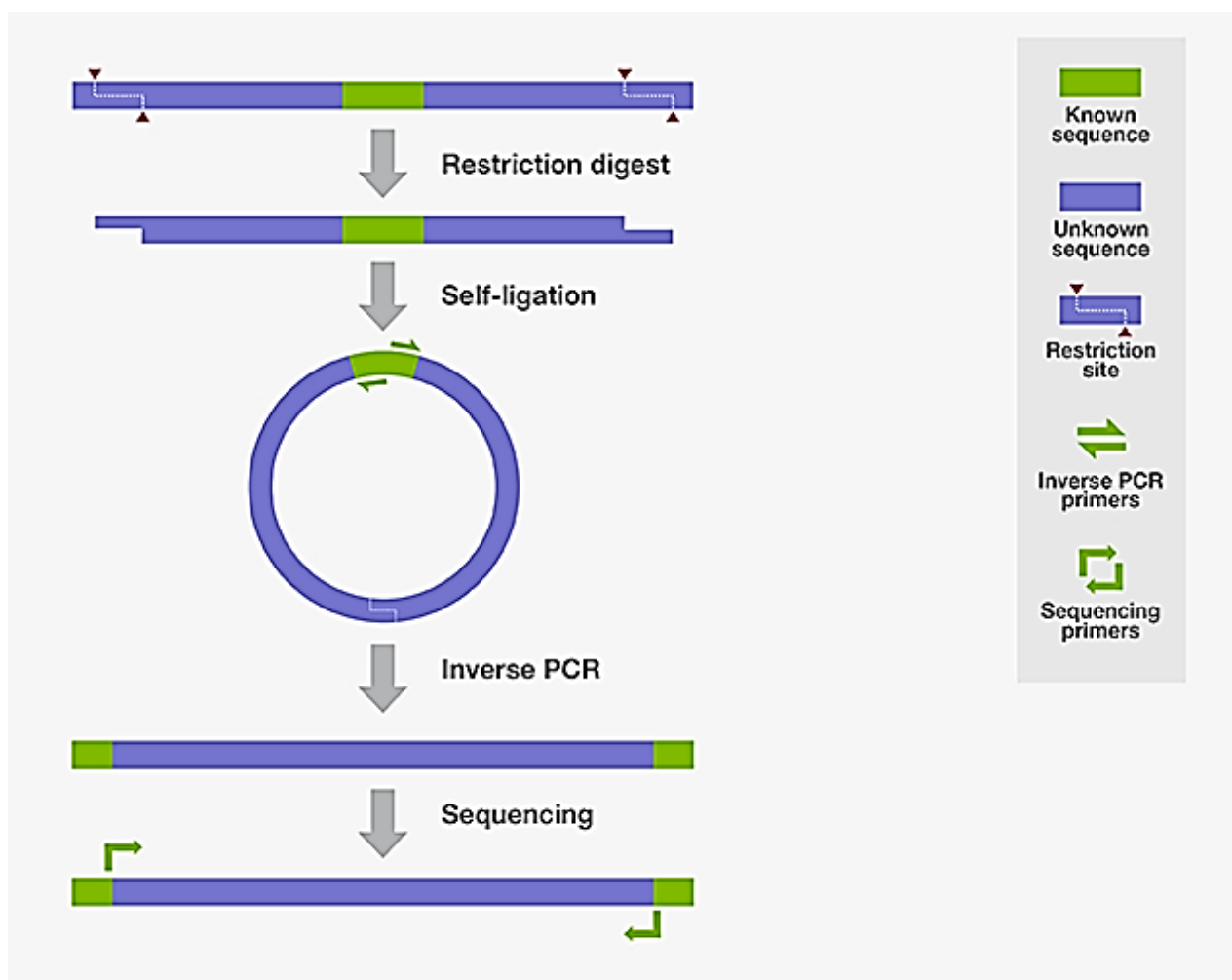


Рисунок 29  
Инвертированная ПЦР (<https://www.thermofisher.com>)

**4. Асимметричная ПЦР (англ. Asymmetric PCR)** – проводится тогда, когда нужно амплифицировать преимущественно одну из цепей исходной ДНК. Используется в некоторых методиках секвенирования и гибридизационного анализа. ПЦР проводится как обычно, за исключением того, что один из праймеров берется в большом избытке. Модификацией этого метода является англ. Linear-After-The-Exponential-PCR (LATE-PCR), в котором используются праймеры с



разной концентрацией, и праймер с низкой концентрацией подбирается с высокой (температурой плавления), чем праймер с высокой концентрацией. ПЦР проводят при высокой температуре отжига, тем самым удаётся поддерживать эффективности реакции на протяжении всех циклов (рисунок 30).

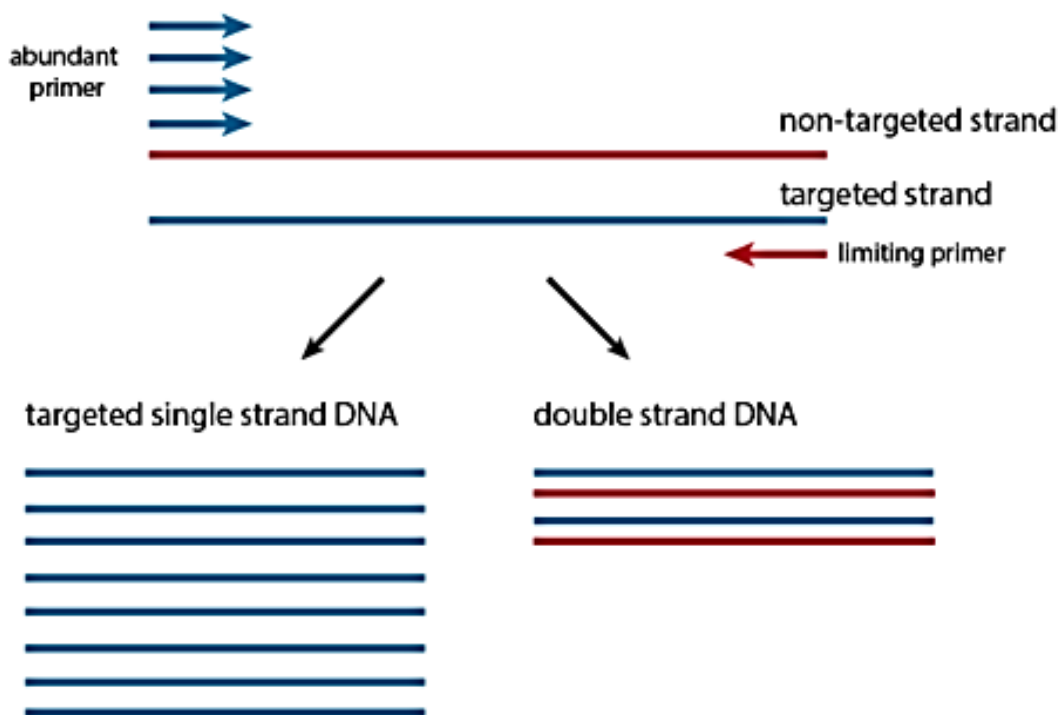


Рисунок 30  
Асимметричная ПЦР (<https://www.abmgood.com>)

**5. Ступенчатая ПЦР** (Touch down PCR (англ.)) – с помощью этого подхода уменьшают влияние неспецифического связывания праймеров. Первые циклы проводят при температуре выше оптимальной температуры отжига, затем каждые несколько циклов температуру отжига постепенно снижают до оптимальной. Это делается для того, чтобы праймер гибридизовался с комплементарной цепью всей своей длиной; тогда как при оптимальной температуре отжига, праймер частично гибридизуется с комплементарной цепью. Частичная гибридизация праймера на геномной ДНК приводит к неспецифической амплификации, если участков связывания для праймера достаточно много. В большинстве случаев, первые десять ПЦР циклов, можно проводить при температуре отжига в 72–75 °С, а затем сразу снизить до оптимальной, например до 60–65 °С (рисунок 31).

**6. Метод молекулярных колоний** (ПЦР в геле, англ. Colony – PCR Colony) – акриламидный гель полимеризуют со всеми компонентами ПЦР на поверхности и проводят ПЦР. В точках, содержащих

анализируемую ДНК, происходит амплификация с образованием молекулярных колоний (рисунок 32).

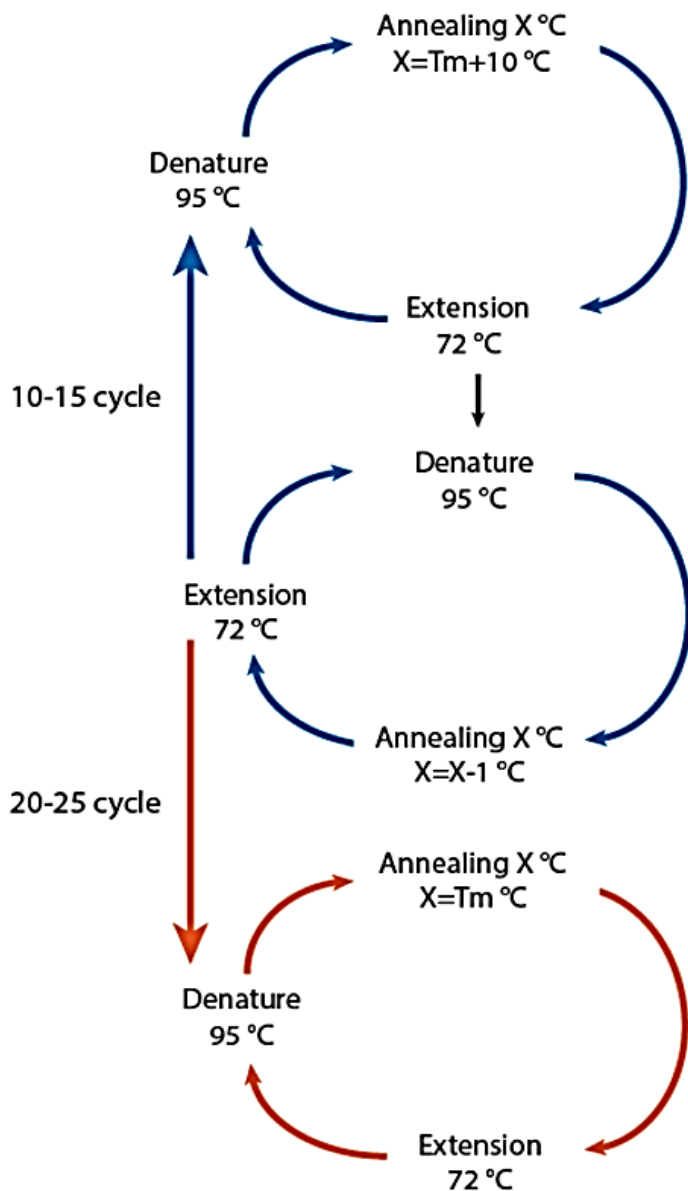


Рисунок 31  
Ступенчатая ПЦР (<https://www.abmgood.com>)

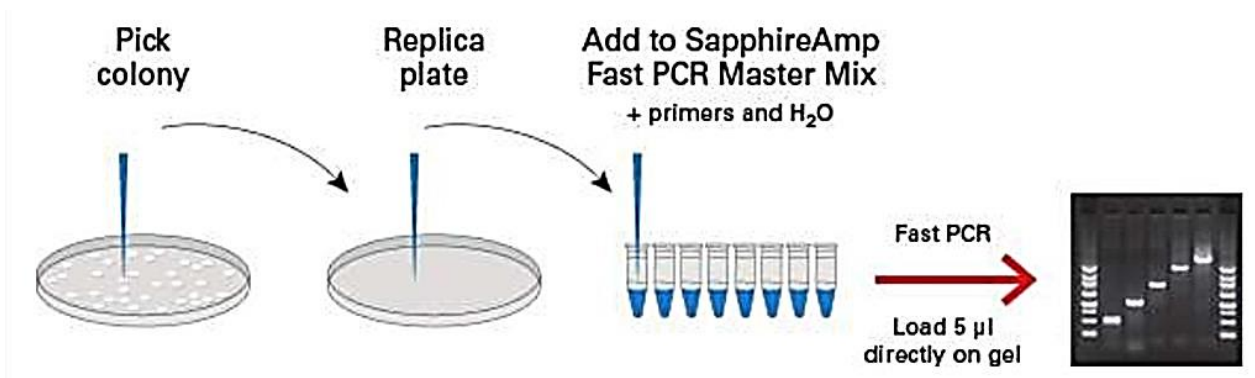


Рисунок 32  
Метод молекулярных колоний (<http://www.clontech.com>)

**7. ПЦР длинных фрагментов** (англ. Long-range PCR) – модификация ПЦР для амплификации протяженных участков ДНК (10 тысяч и более оснований). Используют смесь двух полимераз, одна из которых – Таq-полимераза с высокой процессивностью (то есть, способная за один проход синтезировать длинную цепь ДНК), а вторая – ДНК полимераза с 3'-5' экзонуклеазной активностью, обычно это Pfu полимераза. Вторая полимеразы необходима для того, чтобы корректировать ошибки, внесённые первой, так как Таq-полимераза останавливает синтез ДНК если был добавлен не комплементарный нуклеотид. Этот не комплементарный нуклеотид удаляет Pfu полимераза. Смесь полимераз берётся в отношении 50:1 или даже меньше 100:1, где Таq-полимеразы берётся в 25–100 раз больше по отношению к Pfu-полимеразе (рисунок 33).

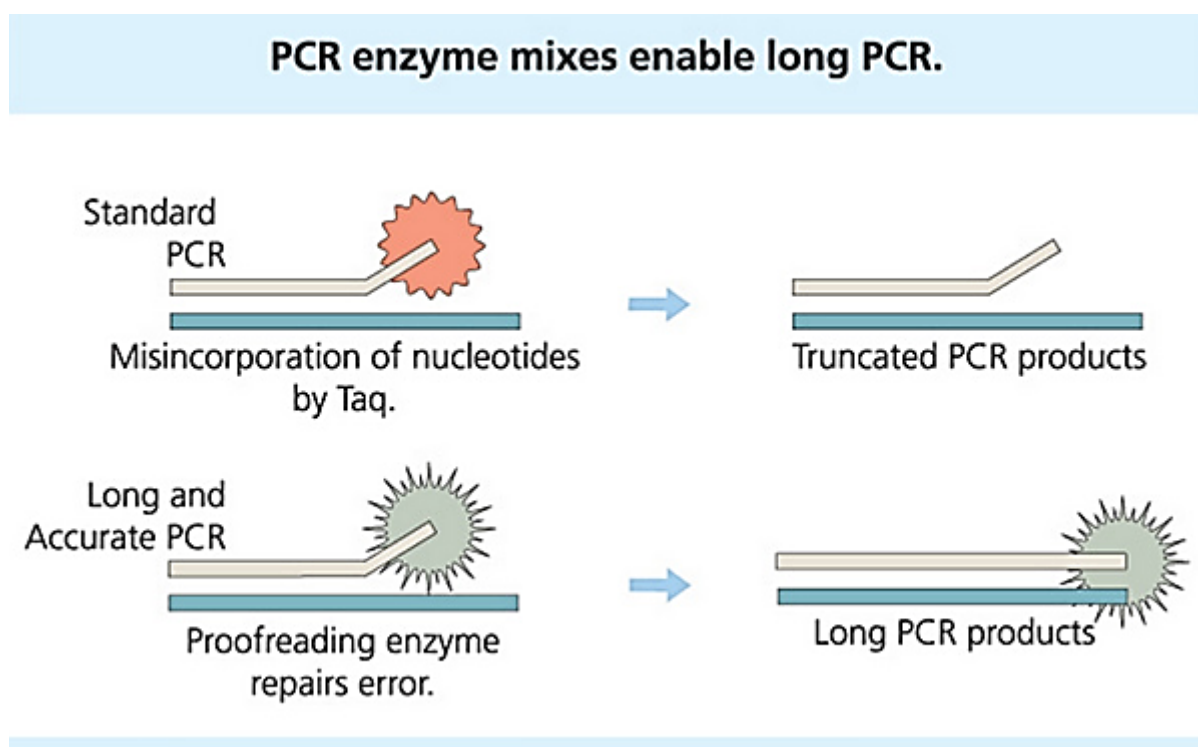


Рисунок 33  
ПЦР длинных фрагментов (<https://www.sigmaaldrich.com>)

**8. RAPD** (англ. Random Amplification of Polymorphic DNA), **ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК** – используется тогда, когда нужно различить близкие по генетической последовательности организмы, например, разные сорта культурных растений, породы собак или близкородственные микроорганизмы. В этом методе обычно используют один праймер небольшого размера (около 10 п.н.). Этот праймер будет частично комплементарен случайным участкам

ДНК исследуемых организмов. Подбирая условия (длину праймера, его состав, температуру и пр.), удаётся добиться удовлетворительного отличия картины ПЦР для двух организмов (рисунок 34).

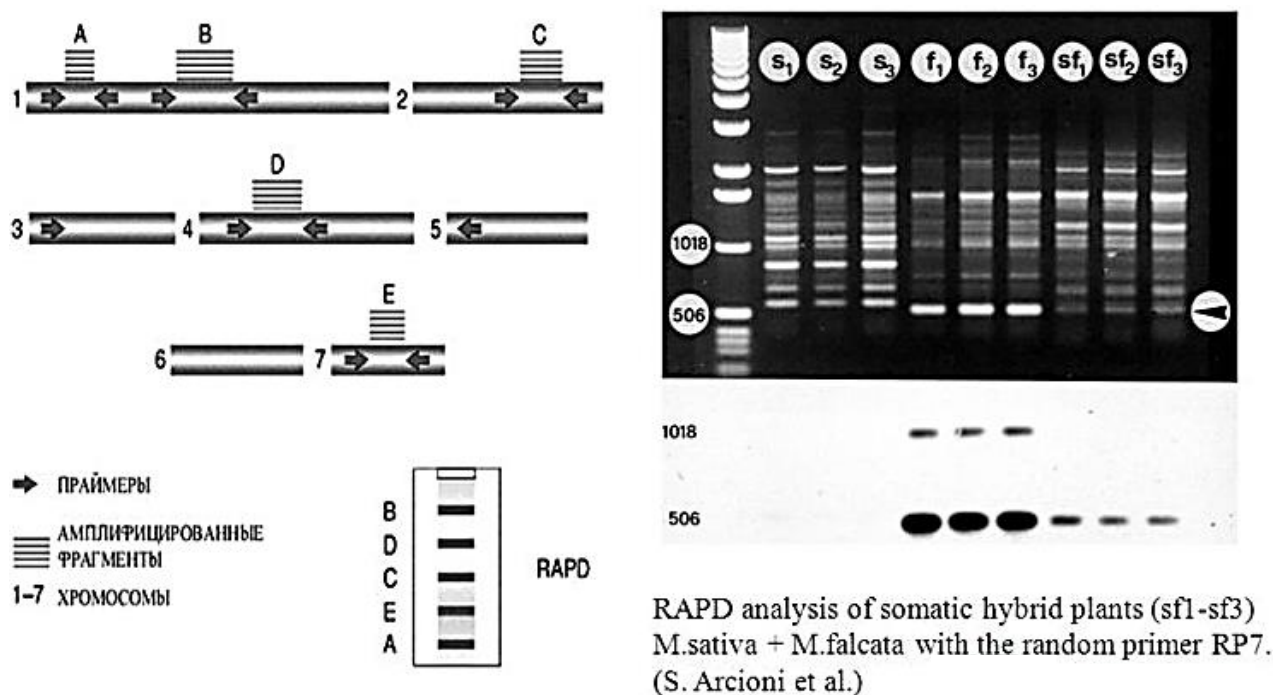


Рисунок 34

ПЦР со случайной амплификацией полиморфной ДНК  
 (<https://www.researchgate.net>)

**9. Групп-специфическая ПЦР** (англ. group-specific PCR) – ПЦР для родственных последовательностях внутри одного или между разными видами, используя консервативные праймеры к этим последовательностям. Например, подбор универсальных праймеров к рибосомальным 18S и 26S генам для амплификации видоспецифического межгенного спейсера: последовательность генов 18S и 26S консервативна между видами, поэтому ПЦР между этими генами будет проходить для всех исследуемых видов. Противоположный этому методу является – уникальная ПЦР (англ. unique PCR), в котором задача состоит в подборе праймеров для амплификации только конкретной последовательности среди родственных последовательностей.

**10. ПЦР с использованием горячего старта** (англ. Hot-start PCR) – модификация ПЦР с использованием ДНК-полимеразы, в которой полимеразная активность блокируется при комнатной температуре антителами или имитирующие антитела небольшими молекулами типа Affibody, то есть в момент постановки реакции до первой денатурации в ПЦР. Обычно первая денатурация проводится при 95 °C в течение 10 минут.

**11. Виртуальная ПЦР** (англ. *insilico* PCR, цифровая ПЦР, электронная ПЦР, е-ПЦР) – математический метод компьютерного анализа теоретической полимеразной цепной реакции с использованием списка последовательностей праймеров (или ДНК-зондов) для предсказания потенциальной амплификации ДНК исследуемого генома, хромосомы, кольцевой ДНК или любого другого участка ДНК.

## 12. ПЦР в реальном времени

Метод использует общие принципы ПЦР. Основное отличие состоит в том, что измеряется количество амплифицированной ДНК в реальном времени после каждого цикла амплификации.

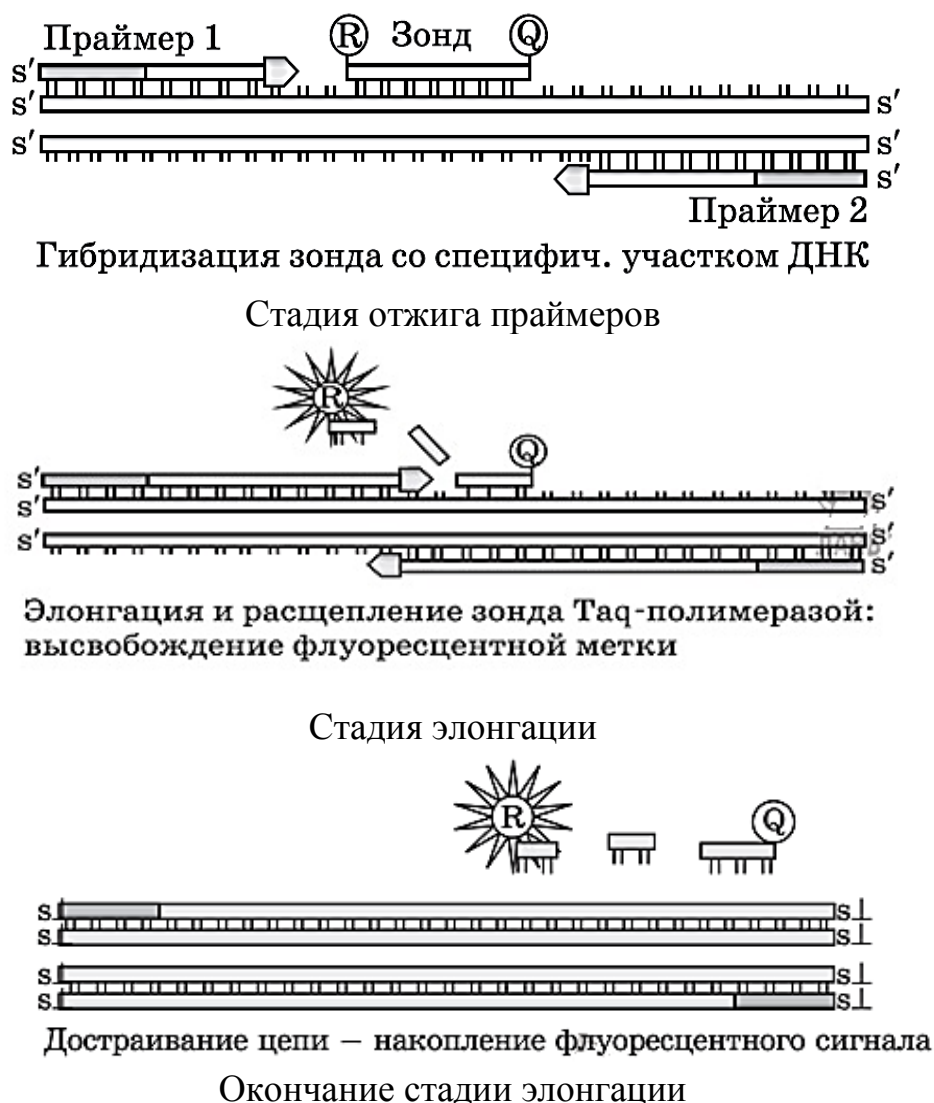


Рисунок 35

ПЦР в режиме реального времени (М.С. Калмыкова с соавт., 2009)

Основные этапы ПЦР сохраняются. Единственным отличием является введение в реакционную смесь кроме праймеров специальных ДНК-зондов, несущих флуорофор и тушитель флуоресценции,

комплементарных средней части амплифицируемого фрагмента, которые гибридизуются со специфическим фрагментом ДНК на этапе отжига праймеров. Когда флуорофор и тушитель связаны с олигонуклеотидным зондом, наблюдается лишь незначительная флуоресцентная эмиссия. Гибридизационный зонд, связываясь с продуктом ПЦР, приобретает способность к флуоресценции, так что информация может быть получена с помощью света, проходящего сквозь стенки полипропиленовой амплификационной пробирки. Интенсивность флуоресценции измеряется, и результат реакции выносится на экран монитора в виде графика зависимости флуоресценции от количества циклов в реакции. Таким образом, за ходом реакции можно следить уже через несколько минут после её начала (рисунок 35).

Особенность полимеразной цепной реакции в реальном времени – определение накопления продуктов амплификации непосредственно во время проведения реакции.

Для постановки ПЦР в реальном времени необходим **специальный амплификатор**, отличительной особенностью которого является возможность детектировать флуоресценцию (рисунок 36).

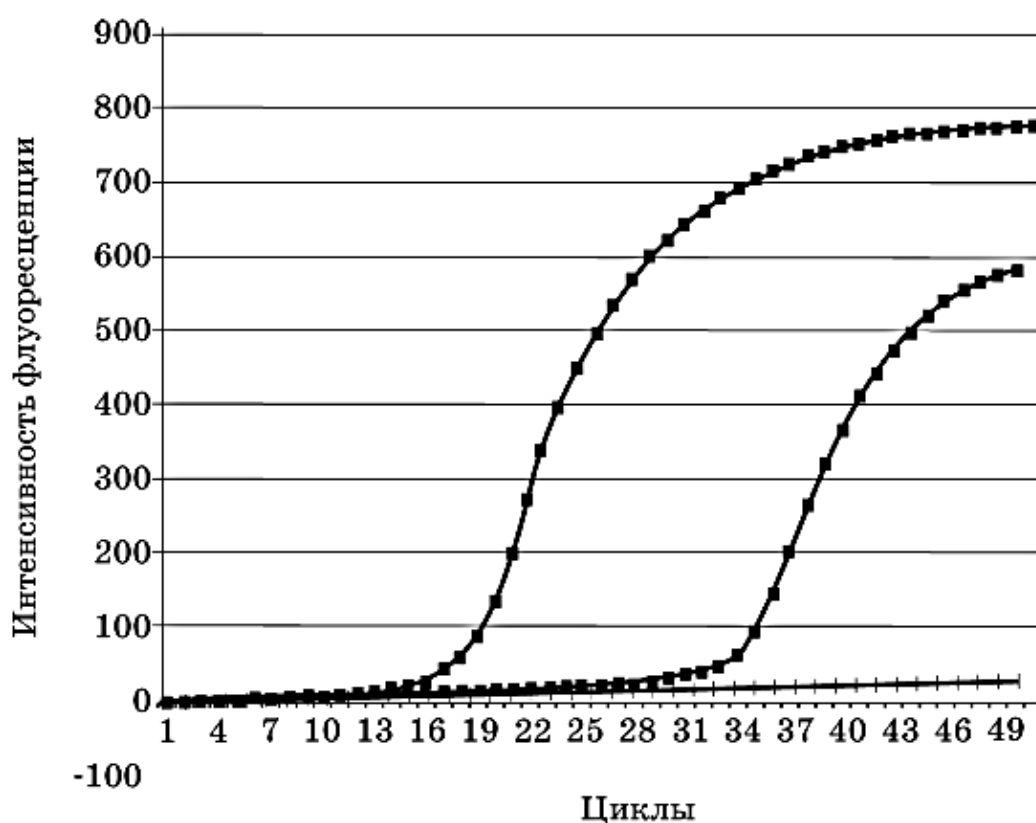


Рисунок 36

Кинетические кривые Real-time PCR.

По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, по оси ординат – циклы  
(М.С. Калмыкова с соавт., 2009)



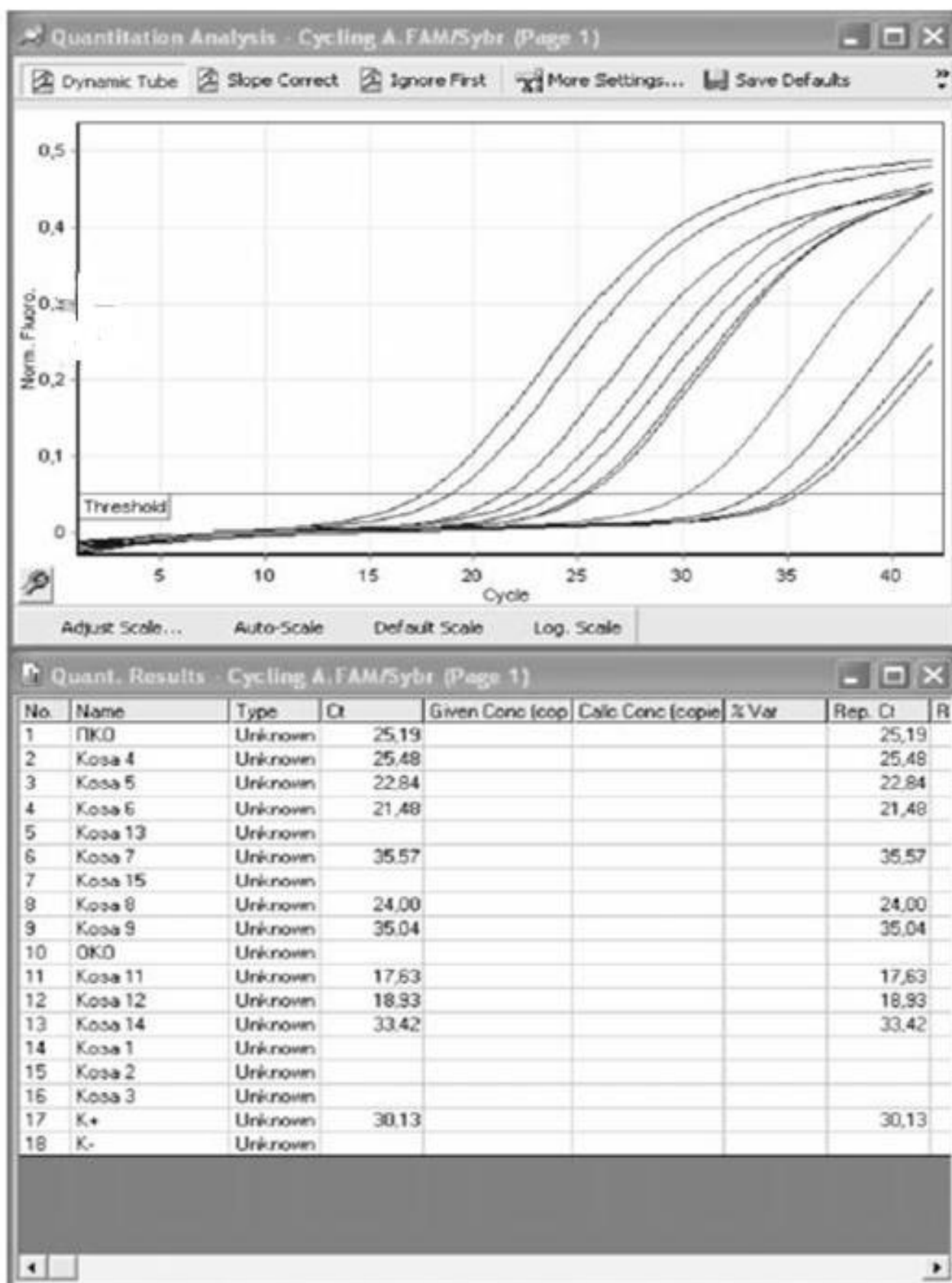


Рисунок 37  
 Результаты исследований, полученные  
 при использовании прибора Rotor-Gene 6000  
 и его программного обеспечения  
 (М.С. Калмыкова с соавт., 2009)



На кривой можно выделить три стадии: инициации (когда ПЦР-продукты еще не детектируются флуоресцентной меткой), экспоненциальную стадию (в которой наблюдается экспоненциальная зависимость количества флуоресценции от цикла ПЦР), плато (стадию насыщения). Пороговым (thresholdcycle,  $C(t)$ ) называется такой цикл амплификации, на котором достигается некий заданный уровень интенсивности флуоресценции – пороговая флуоресценция.

Величина порогового цикла является важной характеристикой и прямо пропорциональна логарифму количества копий исходной матрицы. Именно это позволяет проводить полуколичественную и количественную, а также сравнительную оценку образцов.

Полученные в ходе исследования данные – кривые накопления флуоресцентного сигнала – анализируют по нескольким каналам детекции с помощью программного обеспечения прибора (рисунок 37).

Результаты реакции интерпретируют на основании наличия (или отсутствия) пересечения кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией (Threshold) в виде графика зависимости интенсивности флуоресценции от количества циклов, что соответствует наличию (или отсутствию) значения порогового цикла « $C_t$ » в соответствующей графе в таблице результатов.

#### **Преимущества ПЦР в реальном времени**

Существенное повышение специфичности метода за счет наличия внутреннего зонда;

Возможность количественного определения;

Надежность из-за снижения риска контаминации (за счет проведения всех стадий ПЦР в одной пробирке и отсутствия стадии электрофореза);

Возможность создания мультиплексных систем, позволяющих детектировать несколько возбудителей в одном образце;

Снижение времени проведения реакции.

#### **Достоинства ПЦР**

1. универсальность метода. ПЦР позволяет обнаруживать любые ДНК и РНК, даже когда бессильны другие методы. Оборудование, используемое для ПЦР, стандартно, оно не зависит от того, что именно и где именно мы ищем.

2. высокая специфичность. В материале, направленном на исследование, определяется уникальная последовательность нуклеотидов, характерная только для конкретного возбудителя. Таким образом, можно говорить, что специфичность метода достигает 100%. Кроме

того, это позволяет одновременно, в одном и том же материале, проводить поиск нескольких возбудителей без какого-либо ущерба для качества ответа.

3. чувствительностью – возможно найти всего один фрагмент генетического материала возбудителя.

4. оперативность. Постановка реакции занимает несколько часов, таким образом, вся диагностика, от момента сдачи материала на анализ до получения результата, отнимет всего один день.

5. определяют возбудителя, а не реакцию на его внедрение со стороны организма. Таким образом, появилась возможность точно диагностировать заболевание еще в инкубационном периоде, когда нет никаких клинических или лабораторных признаков болезни.

### Недостатки

1. Амплифицируется ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма. Это налагает определенные требования при использовании ПЦР для контроля эффективности лечения. В общем случае подобный контроль должен проводиться спустя промежуток времени, в течение которого происходит полная элиминация возбудителя.

2. Высокая чувствительность. Ряд микроорганизмов (условно – патогенная флора, УПФ) в норме может существовать у человека в малом количестве. При помощи метода ПЦР определяются даже самые малые количества УПФ, даже при отсутствии патологии. Однако эта проблема решена с появлением метода количественного определения ДНК (Real-time PCR).

3. Различия при использовании разных тест систем. Как говорилось выше, для амплификации можно использовать различные участки генома возбудителя. Однако в случае различных мутаций микроорганизмов возможно изменение или утрата генов. Это приводит к разным результатам при использовании тест систем разных производителей.

### **Контрольные вопросы:**

1. Каково строение нуклеиновых кислот?
2. В чем заключается сущность полимеразной цепной реакции?
3. Назовите компоненты ПЦР.
4. Каковы этапы ПЦР?
5. Каковы требования, предъявляемые при постановке ПЦР?
6. Укажите достоинства и недостатки реакции.
7. При диагностике каких вирусных заболеваний используется ПЦР?

## МЕТОД ДНК-ЗОНДОВ

Данный метод основан на способности одноцепочных молекул нуклеиновых кислот соединяться в двухцепочные, если они взаимосвязано комплементарны.

Он позволяет обнаруживать нуклеиновые кислоты (в том числе и вирусные) в любых материалах, включая патологический материал от больных животных.

Нуклеиновые кислоты представляют собой линейные полимеры, состоящие из цепи нуклеотидов, связанных фосфодиэфирными связями. Нуклеотиды состоят из трех частей: остатка фосфорной кислоты, углеводного остатка (дезоксирибозы для ДНК, рибозы для РНК) и азотистого основания (аденин, гуанин, цитозин, тимин – для ДНК, или аденин, гуанин, цитозин и урацил – для РНК). Структуры нуклеотида схематически изображено на рисунке 38.

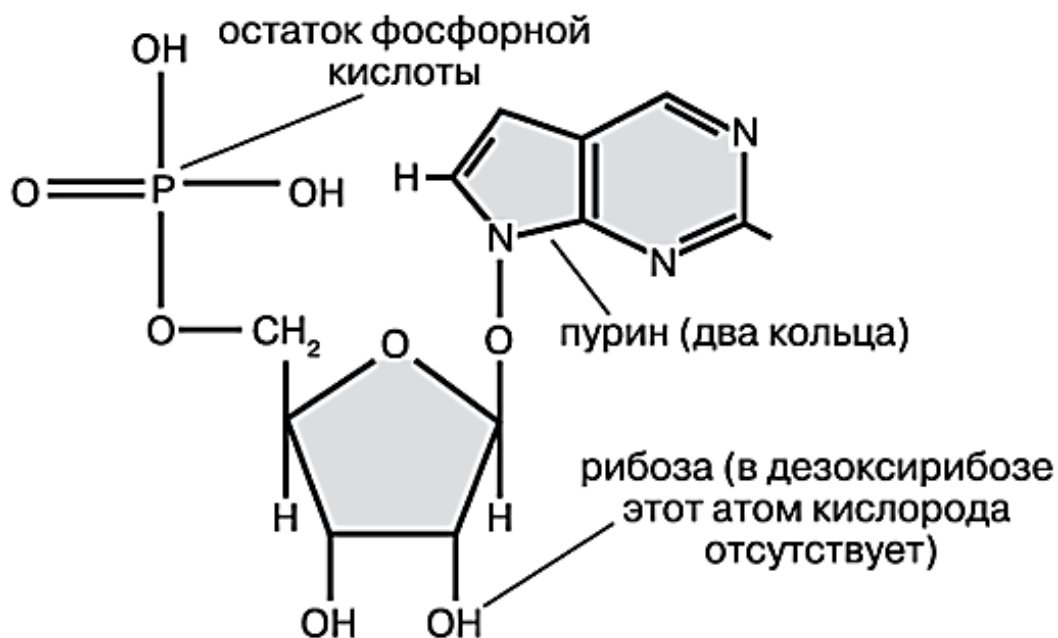


Рисунок 38

Схема строения нуклеотида (<http://licey.net>)

ДНК представляет собой двухцепочную молекулу, а РНК – одноцепочечную. Нуклеиновые кислоты, как и белки – высокополимерные соединения. Их молекулы построены из сотен и тысяч таких нуклеотидов, которые соединяясь друг с другом, образуют длинные, полинуклеотидные цепи или нити.

ДНК обычно построена из двух полинуклеотидных цепочек, закрученных спиралевидно одна вокруг другой. Основной углевод-

но-фосфатный костяк обеих цепочек ДНК расположен снаружи спирали, а органические основания – внутри нее, друг против друга. Обе цепочки ДНК удерживаются водородными связями между парами оснований А-Т и Г-Н, при этом соблюдается одинаковое расстояние между цепями. Такое пространственное соответствие пар оснований называется комплементарностью.

Комплементарными могут быть не только две молекулы ДНК или две молекулы РНК, но и ДНК с РНК (при этом имеется пары А-Т образуется А-Г). Например, две молекулы ДНК, имеющие соединения, следующие последовательности нуклеотидов:

1) ААГЦАТГГЦТ....ЦАААГТ;

2) ТТЦГТАЦЦГА.... ГТТТДА,

являются взаимно комплементарными.

Если смесь таких нуклеиновых кислот подержать при 55 °С, то примерно через 2 ч образуются двухцепочные молекулы ДНК следующего состава:

ААГЦАТГГЦТ.... Ц А АА ГТ

ТТЦГТАЦЦГ А... ГТ ТТЦА

Поскольку исходные одноцепочные молекулы могут происходить из разных источников, этот процесс удвоения молекул называется молекулярной гибридизацией.

Нагрев материала, содержащего двухцепочные ДНК, до 80 °С или обработка его щелочью приводят к разделению двухцепочных молекул на одноцепочные, что называется денатурацией.

Любой вирус заключает одну специфическую для него молекулу ДНК (или РНК) со строго определенной последовательностью нуклеотидов.

При снижении температуры происходит восстановление связей – образование двойной спирали – денатурация. Следовательно, любой вирус заключает одну специфическую для него молекулу ДНК (или РНК) со строго определенной последовательностью нуклеотидов.

Способность к гибридизации двух препаратов нуклеиновых кислот является 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.

ДНК-зонд не каждый вирус готовят заранее, нарабатывают его и хранят до использования.

В качестве ДНК-зонда используют копии ДНК с известной последовательностью нуклеотидов, меченные радиоактивным веществом (например, радиоактивным фосфором (P) или биотином, который дает изменение цвета. ДНК разрезается на фрагменты при помощи рестриктаз. Для исследования берется как свежий патологический материал (ткани, смывы, кровь), так и высушенный, мороженный и даже частично разложившийся.

Исследуемый материал гомогенизируют, суспендируют, центрифугируют и надосадочную жидкость обрабатывают препаратами, разрушающими белки (сначала протеиназой К. затем фенолом с хлороформом). После полного удаления белков осаждают ДНК при минус 70 °С, осадок отмывают спиртом и подвергают денатурации путем кипячения или обработки щелочью.

Полученные пробы из исследуемого материала наносят на специальный фильтр, расчерченный простым карандашом на квадраты (для каждого материала свой номер квадрата). Также наносят положительный и отрицательный контроли. Иммуобилизованную ДНК можно агаридизировать на месте с радиоактивным зондом. Со специфическим зондом будут гибридизоваться только комплементарные ему ферменты. Каждая комплементарная последовательность проявляется в виде радиоактивной полосы, местоположение которой определяется размером фермента ДНК.

Потемнение фотопленки, контролировавшей с определенными квадратами, свидетельствует о наличии в материалах этих квадратов искомой нуклеиновой кислоты вируса.

Учитывать результаты при использовании радиоактивной метки кроме авторадиографии можно и путем просчета импульсов счетчика.

Потемнение фотопленки, контролировавшей с определенными квадратами, свидетельствует о наличии в материалах этих квадратов искомой нуклеиновой кислоты вируса.

Учитывать результаты при использовании радиоактивной метки кроме авторадиографии можно и путем просчета импульсов счетчика.

#### Достоинства метода:

- Универсальность – позволяет обнаруживать нуклеиновые кислоты любых вирусов, для которых получен зонд.
- Высокая чувствительность.
- Специфичность.
- Отсутствием необходимости в стерильной работе.
- Отсутствием необходимости в математической обработке.

Недостатки метода:

- Технически сложен.
- Трудно получить ДНК-зонд.
- Используется радиоактивная метка зонда.

В настоящее время разрабатываются другие методы метки зонда, в том числе присоединенные к зонду метки/изменяющей цвет субстрата.

**Контрольные вопросы:**

1. Каково строение нуклеиновых кислот?
2. В чем заключается принцип метода ДНК-зондов?
3. Каковы достоинства и недостатки метода ДНК-зондов?

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Барышников, П. И. Ветеринарная вирусология [Текст] : учебное пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности 111201 «Ветеринария» / П. И. Барышников. – Москва : ФОРУМ, 2015. – 96 с.
2. Белоусова, Р. В. Вирусология и биотехнология. [Электронный ресурс] / Р. В. Белоусова, Е. И. Ярыгина, И. В. Третьякова, М. С. Калмыкова. – СПб.: Лань, 2016. – 220 с. – Режим доступа: <http://e.lanbook.com/book/88026>.
3. Белоусова, Р. В. Практикум по ветеринарной вирусологии [Текст] : учеб. пособие для студ. вузов по спец. 111201 «Ветеринария» / Р. В. Белоусова, Н. И. Троценко, Э. А. Преображенская. – 3-е изд., перераб. и доп. – М. : КолосС, 2006. – 248 с.
4. Вирусология и биотехнология : лабораторный практикум / Н. А. Ожередова [и др.]. – Ставропольский гос. аграрный университет. – Ставрополь, 2016. – 64 с.
5. Вопросы общей вирусологии [Текст] : учеб. пособие по общей вирусологии / [И. Н. Жилинская [и др.]; под ред. О. И. Киселева, И. Н. Жилинской; Федеральное агентство по здравоохранению и социальному развитию, Санкт-Петербургская гос. мед. акад. им. И. И. Мечникова федер. агенства по здравоохранению и соц. развитию. – СПб. : СПб. ГМА им. И. И. Мечникова, 2007. – 374 с.
6. Госманов, Р. Г. Ветеринарная вирусология [Электронный ресурс] : учебник / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев, В. И. Плешакова. – СПб. : Лань, 2010. – 482 с. – Режим доступа: [http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1\\_id=569](http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=569).
7. Калмыкова, М. С. Основы полимеразной цепной реакции с разными форматами детекции : учебное пособие / М. С. Калмыкова, М. В. Калмыкова, Р. В. Белоусова. – СПб.: изд-во «Лань», 2009. – 80 с.
8. Костенко, Т. С. Практикум ветеринарной микробиологии и иммунологии / Т. С. Костенко, В. Б. Родионова, Д. И. Скородумов. – М.: Колос, 2001. – 344 с: ил. – (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). ISBN 5-10-003507-2.
9. Кудачева, Н. А. Общая ветеринарная вирусология [Текст] : учебное пособие / Н. А. Кудачева; МСХ РФ, Самарская ГСХА. – Самара : РИЦ СГСХА, 2010. – 300 с.
10. Лабораторная диагностика вирусных болезней животных /Сост. П. И. Барышников, В. И. Разумовская : учебное пособие. – 2-е изд., испр. – СПб.: Изд-во «Лань», 2015. – 672 с.



11. Практикум по общей вирусологии [Текст] : учеб. пособие для студ. вузов, обуч. по биол. спец. / [А. А. Аграновский [и др.]]; под ред. И. Г. Атабекова. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : МГУ, 2002. – 182 с.

12. Частная ветеринарно-санитарная микробиология и вирусология [Текст] : учебное пособие для студ. вузов, обучающихся по направлению подготовки (специальности) – Ветеринария (квалификация (степень) «Специалист») : допущено УМО по образованию / Р. Г. Госманов, А. К. Галиуллин, А. Х. Волков, Ф. М. Нургалиев, Г. Г. Идрисов, А. В. Андреева. – Уфа : БашГАУ, 2013. – 251 с.

УЧЕБНОЕ ИЗДАНИЕ

**Николаева Оксана Николаевна**  
**Андреева Альфия Васильевна**

**ВЕТЕРИНАРНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**  
**(методы диагностики вирусных инфекций)**

Учебное пособие

Печатается в авторской редакции

Технический и художественный редактор: *А. Е. Дереева*

---

Подписано в печать 24.04.2018 г. Усл.-печ. л. 4,65. Заказ 274. Тираж 120 экз.  
Формат бумаги 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага офсетная. Печать трафаретная. Гарнитура «Таймс»

---

РИО ФГБОУ ВО БГАУ, 450001, г. Уфа, ул. 50-летия Октября, 34

Дра заметки