



Кафедра инфекционных болезней,  
зоогигиены и ветсанэкспертизы

**Б1.В.ДВ.03.01 ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ  
ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**  
к лабораторным работам

Направление подготовки (специальность)  
36.05.01 Ветеринария

Профиль подготовки (специализация)  
Болезни сельскохозяйственных и домашних животных  
Ветеринарно-санитарная экспертиза  
Ветеринарная фармация  
Финансовый менеджмент в ветеринарном бизнесе

Квалификация (степень) выпускника  
Ветеринарный врач

Форма обучения  
очная, заочная

Уфа 2019

Рекомендовано к изданию методической комиссией факультета биотехнологий и ветеринарной медицины (протокол № 9 от «28» марта 2019 г.)

Составители: д-р биол. наук, профессор А.В. Андреева,  
канд. биол. наук, доцент О.Н. Николаева,  
ассистент О.М. Алтынбеков

Ответственный за выпуск:  
Заведующий кафедрой инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы, д-р биол. наук, профессор Андреева А.В.

г. Уфа, ФГБОУ ВО Башкирский ГАУ, кафедра инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы

## Оглавление

Лабораторная работа №1. Ветеринарная диагностическая лаборатория. Устройство, правила работы	4
Лабораторная работа №2. Требования к взятию и транспортировке биоматериала для диагностических исследований	8
Лабораторная работа № 3. Микроскопический метод исследования	15
Лабораторная работа №4. Вирусологический метод исследования	28
Лабораторная работа №5. Серологические методы диагностики	34
Лабораторная работа №6. Иммунохимический метод диагностики	40
Лабораторная работа №7. Молекулярно-генетический метод диагностики	44

## Лабораторная работа

### Ветеринарная диагностическая лаборатория. Устройство, правила работы

#### Цель занятия:

1. Усвоить правила работы в ветеринарной диагностической лаборатории.
2. Ознакомиться с техникой безопасности и личной профилактикой при работе в лаборатории.

**Оборудование и материалы.** Ламинарный бокс, бокс, мультимедиа-презентация.

**Биологическую опасность**, или риск для здоровья людей и окружающей среды, могут представлять инфицированные организмы или биологический материал, содержащий микроорганизмы или токсины биологического происхождения.

**Биологическая безопасность** – порядок осуществления лабораторных исследований и специальное оснащение микробиологических лабораторий, которые защищают персонал лабораторий и окружающую среду при работе с потенциально инфекционными микроорганизмами.

**Уровень биобезопасности** – уровень мер предосторожности, необходимых при работе с потенциально опасными биологическими агентами. Различают 4 уровня биобезопасности (таблица 1). В зарубежных странах более высокий номер уровня биобезопасности означает возрастающий риск при выполнении лабораторных исследований.

Таблица 1 Характеристика уровней биобезопасности

Уровень биобезопасности	Описание	Оснащение лабораторий	Микроорганизмы
1 (наиболее низкий)	Биологические агенты, которые обладают минимальным риском для персонала и окружающей среды.	Не требуется специального оснащения. Должны быть приспособления для мытья рук, легко обеззараживаемые рабочие поверхности, прочная мебель, окна с противомоскитными сетками, отсутствие автоматической вентиляции, личная защитная одежда (перчатки, халаты), автоматические дозаторы, защита глаз и лица, автоклавы, безопасные центрифуги.	<i>Agrobacterium radiobacter</i> <i>Bacillus thuringiensis</i> <i>Escherichia coli</i> K12 <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Micrococcus leuteus</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Serratia marcescens</i>  <i>Aspergillus niger</i>
2	Биологические агенты, обладающие потенциальным риском для персонала и окружающей среды. Часто вызывают	Оснащение соответствует классу 1. Требуются строгие меры предосторожности при проведении процедур, при которых могут создаваться инфекционный	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Borrelia burgdorferi</i> <i>Clostridium difficile</i> <i>Mycobacterium other than tuberculosis</i> <i>Salmonella</i> <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA и VRSA)

	серьёзные заболевания, эффективное лечение и профилактика которых доступны.	аэрозоль или брызги. Особые меры предосторожности применяют в отношении острых и режущих предметов.	<i>Streptococcus pneumoniae</i> в. гепатитов А, В, С ВИЧ в. гриппа А в. кори в. эпидемического паротита прионы генетически модифицированные организмы
3	Биологические агенты, которые могут вызывать серьёзные или потенциально летальные заболевания в результате ингаляционного заражения, в отношении которых существуют вакцины и способы лечения.	Боксы безопасности 2 класса	<i>Bacillus anthracis</i> <i>Coxiella burnetii</i> <i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Rickettsia rickettsii</i> <i>Salmonella typhi</i> в. атипичной пневмонии (SARS) в. венесуэльского лошадиного энцефаломиелита в. жёлтой лихорадки в. лихорадки долины Рифт в. лихорадки Западного Нила в. лихорадки Пятнистых гор в. натуральной оспы  <i>Plasmodium falciparum</i> <i>Trypanosoma cruzi</i>
4 (наиболее высокий)	Опасные и экзотические агенты, вызывающие тяжёлые заболевания, в отношении которых не разработаны вакцины и способы лечения.	Боксы безопасности 3 класса или «костюмы космонавтов» с автономной системой подачи воздуха.	<i>Y. pestis</i>  вирусы геморрагических лихорадок (в. крымской геморрагической лихорадки (вирус Конго), в. Ласса, в. лихорадки Денге, в. Марбург, в. Мачупо, в. Хунин, в. Эбола, Хантавирусы) в. птичьего гриппа (H5N1)

В России по степени опасности для человека и окружающей среды также выделено **4 группы возбудителей инфекционных заболеваний**, однако, наоборот, более низкий номер группы означает возрастающий риск при выполнении лабораторных исследований.

I группа – возбудители ООИ: чумы, натуральной оспы, геморрагических лихорадок (Ласса, Эбола и др.).

II группа – возбудители высококонтагиозных бактериальных, грибковых и вирусных инфекций: сибирской язвы, бруцеллеза, туляремии, холеры, сыпного тифа, бластомикоза, бешенства, СПИДа, гепатитов В и С и др., ботулотоксины и столбнячный токсин.

III группа – возбудители других инфекций: коклюша, столбняка, ботулизма, туберкулёза, трихомоназа, малярии, лейшманиоза, гриппа, полиомиелита, герпесвирусы и др.

IV группа – условно-патогенные (возбудители газовой гангрены, клебсиеллы, стафилококки, стрептококки, синегнойная палочка, некоторые кандиды и аспергиллы, амёбиоза, аденовирусы, ротавирусы, энтеровирусы и др.) и непатогенные микроорганизмы.

Аттенуированные штаммы возбудителей I–II групп относятся к микроорганизмам III группы патогенности, а аттенуированные штаммы III–IV групп – к IV группе патогенности.

Работа с материалом, содержащим микроорганизмы I–II групп патогенности, требует соблюдения строгих мер безопасности для предупреждения случаев внутрилабораторного заражения, выноса инфекции за пределы лаборатории и предупреждения контаминации окружающей среды, поэтому исследования проводятся в специально оборудованных режимных микробиологических лабораториях специально обученным и вакцинированным персоналом (если существуют вакцины).

В зависимости от выполняемых исследований, микробиологические лаборатории подразделяют на диагностические, производственные и научно-исследовательские. В соответствии с типами микроорганизмов, изучаемых в микробиологических лабораториях, выделяют бактериологические, вирусологические, микологические и протозоологические лаборатории.

В зависимости от уровня безопасности работы с микроорганизмами микробиологические лаборатории подразделяют на четыре группы риска.

I группа – лаборатории особого режима (максимально изолированные) с высоким индивидуальным и общественным риском.

II группа – режимные лаборатории (изолированные) с высоким индивидуальным и низким общественным риском.

III группа – базовые (основные) лаборатории с умеренным индивидуальным и ограниченным общественным риском.

IV группа – базовые (основные) лаборатории с низким индивидуальным и общественным риском.

На практических занятиях студенты работают с микроорганизмами IV группы патогенности. Учебный практикум кафедры микробиологии считается учебной микробиологической лабораторией, где **необходимо соблюдать следующие правила:**

1. В помещение бактериологической лаборатории нельзя входить без специальной одежды - медицинского халата и шапочки, запрещается приносить в практикум верхнюю одежду. Запрещается посещение студентов, работающих в лаборатории, посторонними лицами. Каждый студент должен работать на закреплённом за ним рабочем месте. Во время работы в лаборатории следует соблюдать тишину, порядок и чистоту.

2. В помещении бактериологической лаборатории категорически **запрещается** принимать пищу, курить, использовать косметические средства. Ежедневная тщательная уборка помещения производится влажным путём с применением дезинфицирующих жидкостей.

3. В каждой группе назначается постоянный дежурный студент, который осуществляет контроль за поддержанием чистоты и порядка студентами группы на рабочих местах.

4. Всё необходимое для работы на занятии (чашки, пробирки, пипетки, бактериальные петли) студенты берут на специальном столе, туда же ставится выполненная на занятии работа. Пробирки и чашки с инфицированным материалом обязательно подписывают (характер материала, название культуры, дата, № группы, ф. и. о. исследователя). После окончания работы рабочее место должно быть приведено в полный порядок.

5. Перед выполнением работ и после завершения необходимо вымыть руки с мылом. Весь материал, поступающий в лабораторию, должен рассматриваться как инфицированный.

Работа с биоматериалами проводится в резиновых перчатках. **Запрещается прикасаться к биоматериалу и микробным культурам руками.**

Если контакт с кровью или другими биологическими жидкостями произошел с нарушением целостности кожных покровов (укол, порез), пострадавший должен:

- снять перчатки рабочей поверхностью внутрь;
- выдавить кровь из раны;

- обработать повреждённое место (70% спиртом, или 5% йодом, или 3% раствором перекиси водорода, или другим разрешенным антисептиком);
- руки вымыть под проточной водой с мылом;
- на рану наложить пластырь;
- надеть напальчник;
- при необходимости продолжить работу, надев новые перчатки.

При отсасывании жидкого материала необходимо пользоваться резиновыми грушами, при этом пипетки должны быть закрыты ватными тампонами. ***Пипетирование в этом строго запрещено!***

6. Посевы проводят у спиртовки, фламбируя при этом края пробирок, петли, шпатели!

***Запрещается*** держать вблизи работающих спиртовок легковоспламеняющиеся материалы и вещества, оставлять без присмотра работающие спиртовки. Перед зажиганием спиртовки необходимо удостовериться, что её корпус исправен, фитиль выпущен на нужную высоту и распушен, а горловина и держатель фитиля сухие. Фитиль должен плотно входить в направляющую трубку держателя (иначе возможна вспышка паров внутри спиртовки и взрыв). Зажжённую спиртовку ***нельзя*** переносить с места на место, ***нельзя*** зажигать одну спиртовку от другой. Гасить спиртовку нужно, накрывая пламя фитиля колпачком, если это невозможно – залить водой. Задувать пламя ***запрещается***.

7. При работе с биоматериалами необходимо пользоваться инструментами (петлями, шпателями, пинцетами, иглами). Инструменты, имевшие контакт с инфицированным материалом, фламбируются в пламени спиртовки, или полностью погружаются в емкости с дезраствором.

По окончании работы использованная стеклянная посуда и ватно-марлевые пробки сбрасывается в отдельные биксы. Ежедневно посуда, в которой содержался инфицированный материал, поступает в мойку после предварительной стерилизации автоклавированием.

8. Окрашивание препаратов проводится в специально отведённых местах. Отработанные предметные стёкла помещаются в эксикатор.

9. Микроскоп – точный оптический прибор, требующий строгого соблюдения правил работы с ним:

- поднимают конденсор до уровня предметного столика;
- открывают диафрагму;
- регулируют яркость встроенного осветителя или освещают поле зрения при помощи зеркала (при малой освещенности используют вогнутое зеркало, при достаточной – плоское);
- на предметное стекло с окрашенным препаратом наносят каплю иммерсионного масла, в которую под контролем глаза осторожно погружают объектив;
- поднимая тубус, смотрят в окуляр и вначале макро-, а потом микровинтом устанавливают чёткое изображение объекта;
- по окончании работы поднимают тубус, снимают препарат, марлевой салфеткой удаляют иммерсионное масло с фронтальной линзы объектива;
- микроскоп ставят в шкаф.

9. При аварии с посудой, содержащей инфицированный материал, или проливание жидкого инфицированного материала надо сообщить преподавателю. Немедленно проводится дезинфекция загрязнённых поверхностей и предметов:

- осколки стекла помещают в бикс,
- на место аварии наносят дезраствор, время экспозиции 5–10 мин,
- затем дезраствор вытирают впитывающей тканью.

Проводят антисептическую обработку загрязнённых частей тела – мытьё с мылом.

10. При работе с электрооборудованием и электроприборами запрещается проверять наличие напряжения пальцами, переносить включённые приборы, находящиеся под напряжением, пользоваться неисправным электрооборудованием и электропроводкой. При нарушении правил работы с электрооборудованием и электроприборами возможно поражение людей электрическим током и возникновение пожара.

11. В начале каждого семестра преподаватель проводит инструктаж по технике безопасности при работе с микробными культурами, биоматериалами, спиртовками и электроприборами. Инструктаж фиксируется в журнале личной подписью студента и заверяется подписью преподавателя.

**Задания:**

- 1 Изучить правила техники безопасности при работе в диагностической лаборатории.
- 2 Изучить ПБА.

**Вопросы для самоконтроля знаний**

- 1 Каково устройство лаборатории?
- 2 Что такое ПБА?
- 3 Требования к помещениям и оборудованию лаборатории?
- 4 Правила работы в лаборатории?

**Лабораторная работа**

**Требования к взятию и транспортировке биоматериала для диагностических исследований**

**Цель занятия:**

1. Усвоить правила отбора проб для диагностики бактериальных, вирусных инфекций.
2. Усвоить правила отбора проб для проведения серологических реакций и ПЦР-диагностики.
3. Ознакомиться с правилами транспортировки биоматериала в лаборатории.

**Оборудование и материалы.** Ламинарный бокс, бокс, мультимедиа-презентация.

**Правила отбора проб патматериала и правила его доставки в ветеринарную лабораторию на исключение бактериальных инфекций**

Диагностические исследования проводятся для определения или подтверждения причины заболевания или гибели животных (включая птиц, зверей) при подозрении на инфекционные заболевания. Поступивший материал подвергается патологоанатомическому, биологическому, бактериологическому, микроскопическому биохимическому исследованиям. Материалом для проведения исследований являются трупы животных и птиц, зверей, внутренние органы павших и вынужденно убитых животных, кровь и сыворотка крови животных и птиц, кал, моча, гной, слизь, экссудат, желчь, выделения из различных полостей, молоко, кожа с волосатым покровом, объекты внешней среды (почва, вода).

Патологический материал отбирают не позднее 2 часов после гибели, убоя животного или аборта и направляют в лабораторию в герметичной упаковке. При невозможности скорой доставки пат. материал хранят в холодильнике при 4-6°C не более 6 часов или консервируют 30%-ным стерильным водным раствором глицерина. Трупы мелких животных направлять целыми в непроницаемой таре (целлофане, полиэтиленовой пленке, пластиковой ёмкости).

Фекалии, гной, слизь, экссудат, молоко, желчь, кровь, моча направляют в стерильных пробирках, флаконах, хорошо закрытых стерильными резиновыми пробками, в объёме не менее 5 мл. Весь материал доставляется в лабораторию в сумке – холодильнике с хладагентами (таблица 2).



Таблица 2 Отправляемый биоматериал на исключения бактериальных инфекций.

Название болезни	Исследуемый патматериал
Сибирская язва	От трупов животных ухо, отрезают у основания между двумя лигатурами. Место отреза уха на трупе прижигают. От трупов свиней отбирают участки отечной соединительной ткани, заглоточные, подчелюстные и другие лимфатические узлы, в которых имеются характерные патологоанатомические изменения. Весь патматериал помещают в контейнеры с крышкой (можно использовать 5-ти или 10-ти литровые полиэтиленовые ведра с крышкой) и направляют в лабораторию с нарочным;
Бруцеллез	Целиком аборт плод от животных и кровь для серологических исследований;
Рожа свиней	Сердце, печень, селезенку, почку и трубчатую кость
Паратуберкулез.	Участки тонкого отдела кишечника, брыжеечные лимфоузлы илеоцеркальный клапан с прилегающим лимфатическим узлом. Для прижизненной диагностики отбирают фекалии;
Листерия.	Головной мозг, паренхиматозные органы (печень, селезенку, почку, пораженные участки легких), абортинированный плод и его оболочку;
Колибактериоз и сальмонеллез.	Печень с желчным пузырем, почку, селезенку, лимфатические узлы брыжеечные, пораженные участки тонкого отдела кишечника, трубчатую кость;
Кампилобактериоз.	Аборт плод, если плод крупный, то берут голову, желудок, печень, легкие, плаценту или часть ее, в случае непригодности плода направляют слизь из шейки матки, стерильно взятую в первые 3-4 дня после аборта. - от быков-производителей берут сперму или препуциальную слизь, от быков, используемых для естественного спаривания, берут препуциальную слизь или секрет придаточных половых желез. <b>Смывы с препуция не присылать;</b>
Эмкар и злокачественный отек.	Пораженные мышцы, тканевой экссудат;
Некробактериоз.	Пораженную ткань и часть паренхиматозных органов с некротическими очагами;
Туберкулез.	Лимфатические узлы; заглоточные, подчелюстные, бронхиальные, средостенные, брыжеечные, которые <u>упаковывают отдельно</u> . Портальные, предлопаточные, надвыменные, поверхностные паховые, легкие, печень, почки направляют <u>только при наличии туберкулезных изменений.</u>

#### Правила доставки биоматериала на исключение вирусных болезней животных

Для проведения серологических лабораторных исследований в отделе вирусологии методами ИФА, РТГА, РНГА, РДП необходимо отобрать сыворотку крови в объеме:

от животных 1-3 мл, от птиц- не менее 0,5 мл. Её необходимо доставить в лабораторию не позднее суток со дня взятия крови при условии хранения сыворотки при температуре +4+6°C. Мутные, проросшие, гемолизированные сыворотки исследованию не подлежат. Допускается однократное замораживание сыворотки крови.

Для исследования пат.материала методами ИФА, РИФ, РГА необходимо отобрать пат.материал в период проявления клинических признаков или не позже 2-3 часов после гибели животного .Масса материала должна быть не менее 10-20 г., отрезок кишечника - 10-12 см. Пробу упаковать во влагонепроницаемую тару и положить в термос со льдом. Пробы фекалий помещают в пенициллиновые флаконы, закрывают резиновыми пробками. Смывы со слизистых оболочек берут стерильными тампонами во флаконы с 1-2 мл физ.раствора. Пат. материал необходимо доставить не позднее 1 сут. с момента его взятия. Допускается хранение патологического материала при температуре +4-6 °С 2 суток, при температуре -30 °С - не более 10 дней. Пробы замораживают и доставляют в термосе со льдом.

В сопроводительном документе необходимо указать: наименование и адрес отправителя, вид животного, анамнестические и клинико- эпизоотологические данные, сведения о вакцинации животных (таблица 3).

Таблица 3 Возможности вирусологического отдела на исключение вирусных заболеваний ( исследуемый биоматериал).

Название болезни	Исследуемый биоматериал	Метод исследования
Болезни, общие для всех видов животных		
Болезнь Ауески	Пат.мат. (внутренние органы, головной, спинной мозг)	Биопроба на кролике
	Сыворотка крови	РНГА (напряженность иммунитета)
Бешенство	Пат.материал (головной мозг)	Световая, люминесцентная микроскопия, РДП, ИФА, биопроба на белых мышах
Оспа	Глубокие соскобы с пораженных участков кожи	Световая микроскопия, заражение К.Э.
Хламидиоз	Пат.материал (плацента, влагалищная слизь, сперма, аборт.плод, паренхиматозные органы павших животных)	Световая, люминесцентная микроскопия, заражение К.Э.
Болезни крупного рогатого скота		
Парагрипп-3 (ПГ-3)	Сыворотка крови	РТГА(напряженность иммунитета)
	Пат.мат. (кусочки легкого с трахеей, смывы со слизистых оболочек)	РИФ (выявление антигена вируса)
Инфекционный ринотрахеит (ИРТ)	Сыворотка крови	РНГА(напряженность ИФА иммунитета)
Вирусная диарея (ВД)	Сыворотка крови	РНГА(напряженность иммунитета)
	Пат.мат. (кусочки тонкого кишечника, фекалии)	ИФА (выявление антигена вируса)
Респираторно-синцитиальная инфекция (РСИ)	Сыворотка крови	РДП (напряженность иммунитета)
	Пат.мат. (кусочки легкого с трахеей, смывы со слизистых оболочек)	РИФ(выявление антигена вируса)

Коронавирусный энтерит	Сыворотка крови	РТГА(напряженность иммунитета)
	Пат.мат. (кусочки тонкого и толстого отделов кишечника, фекалии)	РГА (выявление антигена вируса)
Ротавирусный энтерит	Пат.мат. ( тонкий отдел кишечника, фекалии)	ИФА (выявление антигена вируса)
Болезни свиней		
Классическая чума свиней (КЧС)	Сыворотка крови	ИФА (напряженность иммунитета)
Трансмиссивный гастроэнтерит свиней (ВТГС)	Сыворотка крови	ИФА (напряженность иммунитета)
	Пат.мат. (тонкий отдел кишечника, фекалии)	ИФА (выявление антигена вируса)
Ротавирусная инфекция свиней (РВС)	Пат.мат. (тонкий отдел кишечника, фекалии)	ИФА (выявление антигена вируса)
Цирковирусная инфекция свиней (ЦВС-2)	Сыворотка крови	ИФА (напряженность иммунитета)
Репродуктивно-респираторный синдром свиней (РРСС)	Сыворотка крови	ИФА (напряженность иммунитета)
Парвовирусная инфекция	Сыворотка крови	РТГА (напряженность иммунитета)
	Абортированные плоды длиной не более 15 см (до 65-го дня внутриутробного развития)	РГА (выявление антигена вируса)
Болезни лошадей		
Грипп лошадей	Сыворотка крови	РТГА(напряженность иммунитета)
	Пат.мат.(назальные смывы)	Заражение К.Э.
Ринопневмония лошадей	Сыворотка крови	ИФА (напряженность иммунитета)
Болезни плотоядных		
Чума собак	Пат.мат. (смывы со слизистых оболочек, кровь, головной мозг)	ИФА (выявление антигена вируса)
Аденовирусная инфекция плотоядных	Пат.мат. (смывы со слизистых оболочек, кровь, фекалии, моча, печень)	ИФА (выявление антигена вируса)
Парвовирусный энтерит собак, энтерит норок	Пат.мат. ( кровь, фекалии, кусочки тонкого и толстого отделов кишечника)	ИФА (выявление антигена вируса)
Панлейкопения кошек	Пат.мат. ( кровь, фекалии, кусочки тонкого и толстого отделов кишечника)	ИФА (выявление антигена вируса)
Болезни птиц		
Болезнь Ньюкасла (НБ)	Сыворотка крови	РТГА (напряженность иммунитета)

	Пат.мат (головной мозг, трахея, легкие, селезенка, печень, почки)	Заражение К.Э.
Грипп птиц (ВГП)	Сыворотка крови	РТГА ИФА (выявление антител)
Синдром снижения яйценоскости (ССЯ)	Сыворотка крови	РТГА (напряженность иммунитета)
Инфекционная бур-сальная болезнь (ИББ)	Сыворотка крови	ИФА (напряженность иммунитета)
Инфекционный ларинготрахеит (ИЛТ)	Сыворотка крови	ИФА (напряженность иммунитета)
	Пат.мат.(часть слизистой оболочки гортани, трахеи, конъюнктивы, носовых ходов, включая экссудаты, легкие)	Заражение К.Э.
Энцефаломиелит птиц (ИЭМ)	Сыворотка крови	ИФА (напряженность иммунитета)
Инфекционный бронхит кур (ИБК)	Сыворотка крови	ИФА (напряженность иммунитета)
	Пат.мат.( трахея, слизистая оболочка носовой полости легкие, почки, яйца-воды)	Заражение К.Э.
Реовирусная инфекция	Сыворотка крови	ИФА (напряженность иммунитета)
Микоплазмозы птиц (Mycoplasma gallisepticum, Mycoplasma synoviae)	Сыворотка крови	ИФА (напряженность иммунитета)
Болезни кроликов		
Вирусная геморрагическая болезнь кроликов	Пат.мат. (печень или труп цели-ком)	ИФА

### Правила отбора проб на серологические исследования

Кровь берут утром до кормления животных (у жвачных в любое время) в количестве не менее 5-7 мл. Для получения сыворотки кровь выдерживают в течении 20-30 мин при 20-30<sup>0</sup>С для свертывания, сгусток крови от стенок пробирки отделяют стальной спицей, затем пробирки выдерживают при 4-10<sup>0</sup>С (в прохладном месте). Через сутки сыворотку отделяют в сухие стерильные пробирки (лучше - Флоринского). Пробы нумеруют в соответствии с описью животных и направляют для исследования в лабораторию в свежем или консервированном виде (сыворотку собак через 3-4 часа и повторно через 10-12 часов).

#### Консервирование сывороток проводят:

- добавлением 1 капли 5%-ного раствора фенола на каждый мл сыворотки при тщательном перемешивании;
- сухой борной кислотой до получения насыщенного раствора и образования на дне пробирки небольшого осадка;
- путем однократного замораживания.

Неконсервированные сыворотки пригодны для исследования в течение 6 суток со дня взятия крови при условии хранения их при 4-8<sup>0</sup>С.

Сыворотки консервированные фенолом или борной кислотой, пригодны для исследования в течение 30 суток, замороженные сыворотки – в течении 3 суток после однократного оттаивания. **Мутные, проросшие, гемолизированные сыворотки исследованию не подлежат.** В случае доставки крови без сыворотки ее нельзя консервировать или замораживать.

**Кровь от абортировавших животных** должна доставляться дважды- непосредственно сразу после аборта и **через 14-21 день с настоящего момента крововзятия.**

Для **исследования молока на бруцеллез** в кольцевой реакции пробу (10-15 мл) цельного свежего молока берут из одного удоя от коровы в стерильную пробирку. Пробы молока на рынках берут из каждой отдельной посуды (бидон, фляга и прочее) после тщательного его перемешивания. Пробирки нумеруют и составляют опись проб.

При направлении молока на исследование в лабораторию каждую пробу консервируют добавлением одной капли 10%-ного формалина на 5-10 мл молока. Консервированное молоко пригодно для исследования в течении 2-3 суток. Перед исследованием его необходимо перемешать для равномерного распределения сливок. При массовом исследовании молока постановку КР следует проводить на ферме в специально отведенном помещении.

**Не разрешается** исследовать в КР молоко от коров, страдающих маститом или болезнями, сопровождающимися повышением температуры тела, а также молоко животных в первые 2 недели после родов.

**На лептоспироз** пробы крови берутся не ранее чем через 5-7 суток после проявления клинических признаков болезни или не ранее чем через 90 суток после вакцинации крупного рогатого скота, для свиней после вакцинации через 60 суток и других видов животных, а также не ранее, чем через 10-12 дней после проведенного лечения.

#### **Правила отбора и доставки био-/патматериала в отдел ПЦР-диагностики**

##### **Правила отбора и доставки био-/патматериала в лабораторию:**

Отбор проб производит ветспециалист. Образцы на исследование доставляют в опечатанном виде нарочным, в возможно кратчайший срок, не позднее 24 часов с момента отбора. Транспортировка биоматериала и патматериала производится при температуре от 2 до 8 С. Пробы мочи и крови нужно доставлять в тот же день.

Сыворотки доставляют в лабораторию в замороженном состоянии в сумке-холодильнике, либо в термоконтейнере с заложенными хладоэлементами. В том случае, если сыворотки могут быть доставлены в термоконтейнере с замороженными хладоэлементами в течение 24-48 часов, их замораживание необязательно.

**Гемолизированные сыворотки крови для исследований не пригодны!!!**

Таблица 4. Перечень исследований (вид биоматериала), проводимых отделом ПЦР-диагностики

Инфекция	Материал
Бруцеллез	Кровь, синовиальная жидкость, околоплодная жидкость, абортированный плод
Сибирская язва	Патматериал (сердце, легкие, почки, печень, селезенка), цельная кровь; жидкие пробы (вода, смывы, суспензии бактерий).
Лептоспироз	Цельная кровь, моча, паренхиматозные органы, абортплод.
Микоплазмоз	Смывы со слизистых, синовиальная жидкость, мокрота, выделения из носа и глаз
Туберкулез	Мокрота, выделения из носоглотки, участки пораженных органов

Хламидиоз	Смывы со слизистых оболочек (конъюнктивы, урогенитального тракта), патматериал (сердце, легкие, селезенка, печень, почки), сперма, околоплодные воды, кусочки плодных оболочек, аборт-плодов.
Грипп птиц	Патматериал (трахея, легкие, селезенка, печень), содержимое кишечника и клоаки, соскобы со слизистой оболочки носа, гортани и подглазничных синусов, сыворотка крови.
Классическая чума свиней	Цельная кровь, патматериал (сердце, легкие, селезенка, печень, почки), абортплод.
Африканская чума свиней	Цельная кровь, сыворотка крови, патматериал (сердце, легкие, селезенка, печень, почки, лимфоузлы), абортплод.
Репродуктивный респираторный синдром свиней	Цельная кровь, сыворотка крови, сперма, носовые и конъюнктивальные смывы, патматериал (сердце, легкие, почки, печень, селезенка), абортплод.
Цирковироз свиней // типа	Цельная кровь, сыворотка крови, сперма, (сердце, легкие, почки, печень, селезенка)
Вирусная диарея	Цельная кровь, сыворотка крови, сперма, патматериал (сердце, легкие, почки, печень, селезенка), абортплод
Инфекционный ринотрахеит	Цельная кровь, сыворотка крови, сперма, патматериал (сердце, легкие, почки, печень, селезенка), абортплод
Орнитоз	Соскобы со слизистых оболочек ( клоаки), помет птиц, патматериал (сердце, легкие, почки, печень, селезенка).
ГМО (генетически модифицированные организмы)	Продукты питания и корма для животных

**Задания:**

- 1 Изучить правила отбора проб для доставки в лабораторию.
- 2 Изучить правила транспортировки биоматериала в лабораторию.
- 3 Изучить правила оформления сопроводительного документа

**Вопросы для самоконтроля знаний**

- 1 Назовите правила отбора проб для микробиологического исследования?
- 2 Что отправляют в лабораторию для вирусологического исследования?
- 3 Каковы правила взятия крови для серологического исследования?
- 4 Назовите правила взятия материала для ПЦР-диагностики?

## Лабораторная работа Микроскопический метод исследования

### Цель занятия:

1. Усвоить правила проведения световой микроскопии для лабораторной диагностики инфекционных болезней.
2. Усвоить правила проведения люминисцентной микроскопии для лабораторной диагностики инфекционных болезней.
3. Усвоить правила проведения электронной микроскопии для лабораторной диагностики инфекционных болезней.

**Оборудование и материалы.** Световой микроскоп, препараты-мазки для световой микроскопии, таблицы, плакаты, мультимедиа-презентация.

В лабораторной практике используют следующие типы микроскопических микро-препаратов:

#### ***1) препараты, позволяющие изучать микроорганизмы в убитом состоянии:***

- *бактериологический мазок* используется наиболее часто.

В пламени горелки прокаливают (фламбируют) бактериальную петлю и верхнюю часть петледержателя (петлю держат в правой руке как пишущее перо, левши - наоборот).

1. Пробирку с культурой берут большим и указательным пальцами левой руки. Пробку зажимают мизинцем правой руки и извлекают её из пробирки.

2. Край горлышка пробирки фламбируют в пламени горелки и почти одновременно ещё раз обжигают петлю.

3. Петлю быстро вводят внутрь пробирки, охлаждают и погружают в бульонную культуру или прикасаются к налёту на скошенном питательном агаре.

4. Петлю извлекают, быстро фламбируют край пробирки, пробирку закрывают и ставят в штатив. Петлю стерилизуют: в горизонтальном положении вносят в нижнюю, наиболее холодную часть пламени горелки, чтобы не произошло разбрызгивание сжигаемого патогенного материала. После того как он сгорит, петлю переводят в вертикальное положение, накаливают докрасна вначале нижнюю, затем верхнюю часть проволоки и прожигают петледержатель. Прокаливание в целом занимает 5–7 сек.

5. Приготовление мазка: материал из жидкой питательной среды распределяют по площади диаметром примерно 1 см; материал из плотной питательной среды эмульгируют в капле физиологического раствора. Хорошо приготовленный мазок тонкий, быстро высыхает на воздухе. Мазок можно подсушить над пламенем спиртовки, контролируя температуру рукой.

6. Высушенный мазок фиксируют 3 раза, медленно проводя его в верхней части пламени спиртовки, мазком вверх (физический способ фиксации). При этом происходит денатурация белка бактерий, они закрепляются на предметном стекле, лучше воспринимают анилиновые красители и не смываются при окрашивании.

- *мазки из жидкого материала* (ликвор, моча) готовят аналогично мазку из жидкой питательной среды;

- *мазки из вязкого материала* (мокрота, гной) готовят, помещая каплю материала между двумя стёклами и разводя их в противоположных направлениях, получают два мазка;

- *тонкий мазок крови:* на предметное стекло, ближе к одному из его концов, наносят каплю крови. Шлифованное стекло (уже предметного) ставят на первое под углом 45° подводят к капле крови (3–4 мкл) до соприкосновения с ней. После того, как кровь растечётся по шлифованному краю, стеклом делают скользящее движение справа налево, равномерно распределяя кровь тонким слоем по поверхности стекла. Толщина мазка зависит

от величины угла между стёклами: чем острее угол, тем тоньше мазок. После приготовления мазки сушат на воздухе и фиксируют химическим способом: погружением в метанол (5 мин) или этанол (10–15 мин) или смесь Никифорова (10–15 мин). Фиксация цитологического материала позволяет сохранить структуру клеточных элементов, поэтому её следует применять как можно раньше.

Правильно приготовленный мазок должен быть равномерно тонким, желтоватого цвета, достаточной величины, т. е. располагаться на 1–1,5 см от краёв, занимать 2/3 длины стекла и заканчиваться «метёлочкой». Толстые, густо-розовые мазки не следует использовать, т. к. в них морфология клеток плохо различима.

Для получения качественных мазков крови следует учитывать следующие моменты:

а) предметные стёкла и стекла, которыми готовят мазки должны быть безупречно вымыты и обезжирены в смеси Никифорова.

б) кровь с антикоагулянтом может сохраняться при +4<sup>0</sup>С в течение 24 часов без существенных изменений числа и морфологии клеток. Тем не менее, гематологические исследования рекомендуется проводить как можно раньше, так как патологические клетки часто менее устойчивы к хранению. При использовании антикоагулянта, нужно помнить, что несоответствие концентрации антикоагулянта к объёму взятой крови, недостаточно тщательное смешивание могут привести к значительным ошибкам (неточному определению концентрации клеточных элементов, искажению морфологической структуры клеток).

- *толстая капля крови:* на середину предметного стекла пастеровской пипеткой наносят каплю крови или прикладывают предметное стекло непосредственно ко второй капле крови, выступающей из пальца (первую удаляют ватой). Нанесённую на стекло кровь бактериальной петлёй распределяют по площади диаметром примерно 1 см; стекло оставляют в горизонтальном положении до подсыхания; кровь в «толстой капле» распределяется неравномерно, образуя неровный край;

- *препарат-отпечаток:* вырезанный из середины органа небольшой кусочек ткани захватывают пинцетом и прикладывают поверхностью среза к предметному стеклу последовательно несколько раз;

- *препарат-соскоб:* поверхность органа с целью обеззараживания прижигают накаливаемыми браншами пинцета, делают по этому месту надрез и из глубины остроконечными ножницами вырезают небольшой кусочек ткани, который помещают между двумя предметными стёклами; далее поступают, как при приготовлении мазка из вязкого материала. Если ткань органа плотная, из глубины разреза делают скальпелем соскоб; полученный материал распределяют тонким слоем по поверхности стекла скальпелем или бактериальной петлёй;

- *препарат для электронной микроскопии:* исследуемый материал тончайшим слоем наносят на тонкую плёнку-подложку (вместо предметного стекла), незначительно поглощающую электроны; плёнка крепится на опорную сетку; препарат контрастируют с помощью электронно-плотных (задерживающих электроны) веществ.

## **2) препараты, позволяющие изучать микроорганизмы в живом состоянии:**

- *висячая капля:* на середину не обезжиренного покровного стекла помещают каплю бульонной микробной культуры. Каплю покрывают предметным стеклом с лункой, края которой предварительно смазывают вазелином. Предметное стекло с прилипшим к нему покровным переворачивают; капля оказывается висячей в герметически закрытой влажной камере, из которой жидкость испаряется очень медленно, поэтому препарат долгое время пригоден для наблюдения. Висячую каплю микроскопируют с плоским зеркалом и суженной диафрагмой. Найденный край капли устанавливают в центре поля зрения, переходят на увеличение  $\times 40$  или иммерсионную систему, слегка расширив диафрагму;

- *придавленная капля* – препарат для микроскопии живых объектов (клеток культуры тканей, бактерий). Ее готовят путём помещения между предметным и покровным



стёклами (толщина предметного стекла < 1,2 мм, покровного – < 0,2 мм) капли взвеси исследуемого материала, избегая образования пузырьков воздуха. На предметное стекло наносят каплю материала, покровное стекло ставят на ребро у края капли и опускают постепенно вытесняя воздух, чтобы избежать образования в ней пузырьков воздуха. В правильно приготовленном препарате стёкла плотно склеиваются и жидкость тончайшим слоем заполняет пространство между ними, не выступая за края предметного стекла. Для лучшей видимости неокрашенных микроорганизмов используют темнопольную или фазово-контрастную микроскопию.

**Методы окраски мазков** бывают двух типов:

**1) простые** – используется один краситель, чаще водный фуксин (время экспозиции 1–2 мин) или 1% спиртово-водный раствор метиленовой синьки (время экспозиции 3–5 мин). Время экспозиции определяется толщиной мазка: чем он толще, тем время больше. По истечении времени экспозиции краситель сливают, препарат промывают водой, высушивают, микроскопируют.

**2) сложные** – применяют 2–3 контрастных по цвету красителя, что позволяет дифференцировать микроорганизмы и выявить некоторые особенности их строения или дифференцировать клетки макроорганизма (таблица 5).

*Таблица 5* Сложные методы окраски клеточных структур бактерий

Структура бактерий	Метод окраски	Вид препарата
Споры	по Ожешко	споры – красные, вегетативные клетки – синие
Капсула	по Бурри-Гинсу	бесцветная капсула вокруг красного микроба, фон окрашивается в цвет туши
Клеточная стенка	у неокислостойчивых – по Граму	грам+ – фиолетовые, грам- – красные
	у кислостойчивых (микобактерий) – по Цилю-Нильсену	кислостойчивые – красные, неокислостойчивые – синие
Жгутики	по Морозову	клетки – тёмно-коричневые, жгутики – светло-жёлтые
Нуклеоид	по Романовскому-Гимзе	нуклеоид – фиолетовый, цитоплазма – бледно-розовая
Включения	по Нейссеру	палочки – желтые, зерна волютина – синие

Сложный метод окраски *по Романовскому-Гимза* используют для окрашивания простейших, спирохет, ядерных элементов.

Сухие мазки фиксируют в метиловом спирте (5 мин) или в смеси Никифорова (15 мин), погружают в рабочий раствор (разведение 1:4) краски Романовского-Гимза (состоит из азура, эозина и метиленовой синьки) на 5-7 мин, промывают дистиллированной водой и высушивают. Каждая новая партия красителя требует отработки своего режима окраски, даже если они применяются для одного и того же биоматериала. Краситель можно использовать неоднократно, соблюдая условия хранения.

При окраске *по Романовскому-Гимза* цитоплазма простейших голубая, ядра красные. Боррелии сине-фиолетовые, трепонемы и лептоспиры слабо-розовые.

Правильно окрашенный *по Романовскому-Гимза* мазок крови имеет светло-розовую окраску; эритроциты розовые; ядра лейкоцитов фиолетово-красного цвета с хорошо видимой структурой хроматина, хорошо выделяются ядрышки; цитоплазма нейтрофилов светло-розовая; базофильная зернистость синяя, эозинофильная – красная, нейтрофильная – сиреневая, зернистость моноцитов – нежная азурофильная.

**Микроскопия** с оценкой формы, размеров, взаимного расположения микробов. Микроскоп (греч. *skopeo* – смотрю) – оптический прибор для получения увеличенных изображений объектов, не видимых невооружённым глазом. Различают световую (светлопольную, иммерсионную, темнопольную, фазово-контрастную, люминесцентную) и электронную микроскопию.

**Светлопольная микроскопия** – основной метод исследования клеток и тканей, в котором для освещения объекта используют лучи видимого спектра.



Рисунок 1 Устройство светового микроскопа

Световой микроскоп (рисунок 1) имеет механическую систему и оптическую систему (объектив, окуляр, осветительное устройство). Объективы по способу использования и степени увеличения делятся на *сухие* – между объективом и рассматриваемым предметом находится воздух и *иммерсионные* (лат. *immersio* – погружение) – между объективом и рассматриваемым предметом находится жидкость.

Светлопольная микроскопия предназначена для изучения окрашенных препаратов. Изображение создается за счёт различий в степени поглощения света разными участками исследуемого окрашенного объекта. При прохождении пучка света через окрашенный препарат происходит изменение интенсивности света, т. е. меняется амплитуда световой волны. Такие амплитудные изменения легко улавливаются человеческим глазом.

Возможно применение светлопольной микроскопии и при наблюдении неокрашенных нативных препаратов, но лишь в том случае, если они рассеивают освещающий пучок настолько сильно, что значительная часть его не попадает в объектив.

При использовании сухого объектива с большим фокусным расстоянием световые лучи, идущие от зеркала через конденсор в объектив, проходят через неоднородные среды, различающиеся показателями преломления. Часть лучей отклоняется и не попадает в объектив. В результате поле зрения освещено недостаточно. Обычная световая микроскопия с сухим объективом, имеющим слабое увеличение, в микробиологии используется редко – для изучения микроорганизмов, имеющих крупные размеры (более 10 мкм).

Чтобы увеличить разрешающую способность микроскопа и исследовать более мелкие микроорганизмы, используют иммерсионную микроскопию. Иммерсионный объектив с фокусным расстоянием 1,5–3 мм (маркирован «ОИ» («ИО») или «МИ» («ИМ»)), имеет кольцевую чёрную или белую черту) погружают в каплю масла (кедрового, персикового,

при их отсутствии – вазелинового), показатель преломления которого близок к показателю преломления стекла.

Иммерсионное масло устраняет потери попадающих в объектив лучей света вследствие своего одинакового со стеклом коэффициента преломления (рисунок 2). В этом случае падающий на препарат пучок света не рассеивается и, не меняя направления, попадает в иммерсионный объектив; разрешающая способность микроскопа увеличивается.

Иногда вторую каплю иммерсионной жидкости помещают на верхнюю линзу конденсора. В редких случаях используют водную иммерсию, в этом случае устанавливают объектив «ВИ».

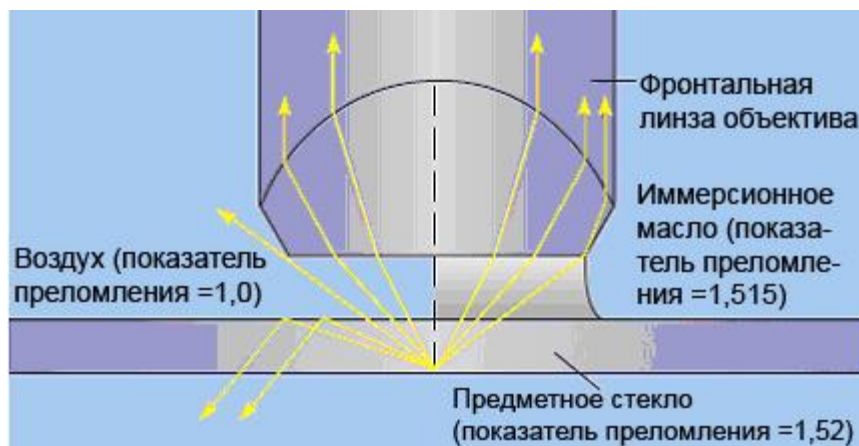


Рисунок 2 Схема хода лучей в сухой и иммерсионной системах

Увеличение микроскопа равно произведению увеличения объектива на увеличение окуляра. Сухие объективы могут иметь увеличение 8, 10, 20, 40, иммерсионные – 90, 100. Окуляры могут иметь увеличение 7, 10, 12, 15. Обычный световой микроскоп даёт увеличение в 100–400 раз, иммерсионный – в 1000 раз.

Качество микроскопа зависит не от степени увеличения, а от его разрешающей способности – минимального расстояния между двумя точками, которое ещё можно различить. Невооружённый человеческий глаз имеет разрешающую способность около 100 мкм. Разрешающая способность светового микроскопа ограничена длиной световых волн. В световых микроскопах с иммерсионной системой при использовании видимой части дневного света можно рассмотреть объекты около 0,2 мкм. Размеры микроорганизмов, имеющих клеточное строение, составляют 0,2–20 мкм (чаще 0,5–10 мкм) и они легко обнаруживаются в иммерсионном микроскопе.

Структуру препарата можно различить лишь тогда, когда разные его частицы по-разному поглощают или отражают свет либо отличаются одна от другой (или от окружающей среды) показателем преломления. Эти свойства обуславливают контрастность изображения – различие яркостей изображения и фона. Если это различие составляет менее 3–4 %, то его невозможно уловить.

Другие методы световой микроскопии выбираются в зависимости от характера и свойств изучаемых объектов.

**Темнопольная микроскопия (ТПМ)** – микроскопия с боковым освещением (ультрамикроскопия), позволяет обнаружить частицы размером в несколько миллимикронов, которые не видны в светлопольном микроскопе.

**Принцип ТПМ.** Микроскопия в тёмном поле зрения основана на явлении дифракции света при сильном боковом освещении взвешенных в жидкости мельчайших частиц (эффект Тиндаля).

Эффект тёмного поля создаётся с помощью специального темнопольного конденсора, имеющего боковую зеркальную поверхность или обычного конденсора, между линзами которого вкладывают кружок чёрной фотобумаги так, чтобы незначительная периферическая часть линзы оставалась свободной.

При выходе из темнопольного конденсора основная часть лучей света не попадает в объектив. Изображение в микроскопе формируется при помощи небольшой части лучей, рассеянных микрочастицами находящегося на предметном стекле препарата и прошедшими через объектив (рисунок 3).

При микроскопии препарата в тёмном поле зрения на верхнюю линзу конденсора наносят каплю масла, помещают препарат с предметным стеклом, на которое наносят каплю масла. Наносить масло на обе поверхности необходимо, чтобы при иммерсионной микроскопии проходящие лучи света не преломлялись. Можно использовать и сухую систему (объектив х40) и помещать каплю масла только на верхнюю линзу конденсора. Так как для бокового освещения необходим параллельный пучок света, применяется только плоское зеркало. Вместо масла можно использовать дистиллированную воду.

В темнопольном микроскопе в нативных препаратах изучают живых неокрашенных микроорганизмов, напр., спирохет.

Прямые лучи освещают объект не снизу, а сбоку и не попадают в глаза наблюдателя. В объектив попадают лучи, отражённые исследуемым объектом. Неосвещённое поле зрения остаётся совершенно тёмным, а микроорганизмы, отражающие лучи света, выглядят ярко светящимися

**Фазовоконтрастная (ФКМ) микроскопия** позволяет исследовать нативные препараты: бесцветные, прозрачные объекты, детали строения которых оптически мало различаются (живые клетки, срезы тканей, микоплазмы).

При ФКМ используют дополнительное фазово-контрастное устройство, состоящее из фазового объектива и фазового конденсора.

*Фазовый объектив* внутри имеет фазовую пластинку с нанесенным кольцом, которое изменяет фазу и уменьшает амплитуду световой волны. Середина кольца составляет  $1/2$ – $2/3$  от диаметра выходного зрачка объектива, светопропускание кольца – 10–30% в зависимости от типа фазового контраста.

*Фазовый конденсор* имеет кольцевую диафрагму с прозрачным световым кольцом. Размер светового кольца подбирается так, чтобы он соответствовал (или был чуть меньше) размеру фазового кольца объектива.

Изображение кольцевой диафрагмы совпадает с кольцом фазовой пластинки соответствующего объектива.

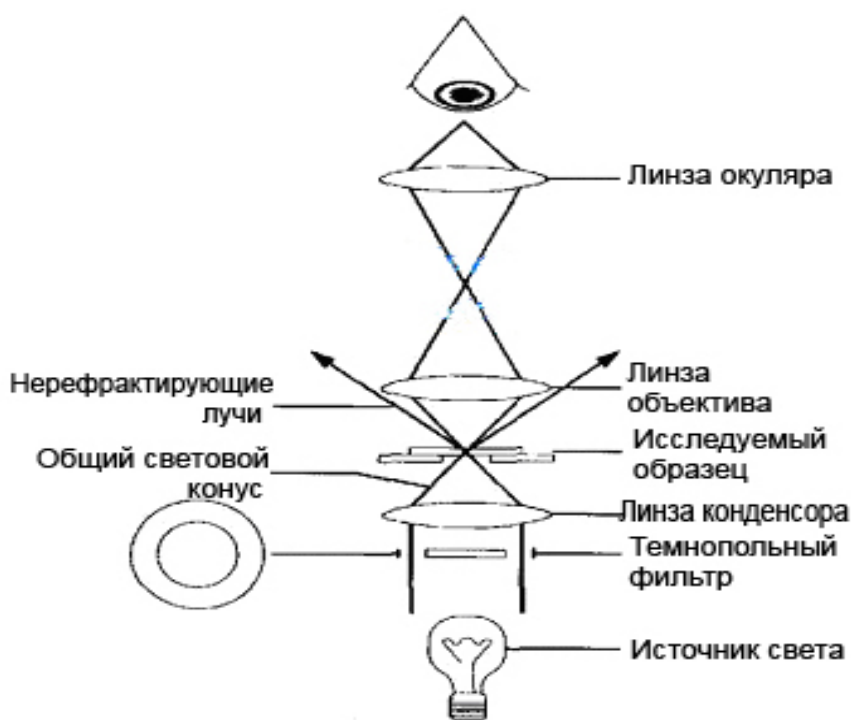


Рисунок 3 Ход лучей в темнопольном микроскопе

**Принцип ФКМ.** Человеческий глаз хорошо определяет изменения интенсивности света, наступающие при прохождении через окрашенные препараты, когда меняется амплитуда колебаний света. Распространение же световых волн в прозрачных однородных объектах не сопровождается потерей интенсивности света. Меняется только скорость прохождения света через объект по сравнению со скоростью его распространения в окружающей среде. Эти изменения называются фазовыми, так как при этом изменяется фаза колебаний прошедшего света. Фазовые колебания света глаз не воспринимает, а наблюдаемые объекты выглядят малоконтрастными, прозрачными.

Пучок света, проходя через кольцевую щель диафрагмы и объект, попадает в кольцо фазовой пластинки объектива. Лучи света отклоняются от фазовой пластинки (рис. 6). В результате между лучами, прошедшими через объект, и лучами светового фона возникает разность длины волны.

Таким образом, при использовании фазово-контрастного устройства невидимые фазовые изменения преобразуются в изменения амплитуды световой волны, т. е. в изменения интенсивности (яркости) света, которые различимы глазом.

Получаемое изображение называется фазово-контрастным.

*В зависимости от способа получения фазовых колец различают 2 типа фазового контраста:*

*а) позитивный фазовый контраст*, когда фазовое кольцо в объективе технологически получается путем травления, что вносит «опережение» в прямо прошедший свет.

При этом изображение объекта с показателем преломления большим, чем у среды, получается темнее на более светлом фоне (рисунок 4). Лучшие результаты наблюдаются при позитивном фазовом контрасте.

*б) негативный (аноптральный) фазовый контраст*, когда фазовое кольцо в объективе технологически получается путем нанесения на поверхность стекла тонкой пленки из копоти или меди, поглощающей не менее 10% света. Это вносит «запаздывание» в прямо прошедший свет. При этом изображение объекта с показателем преломления большим, чем

у среды, выглядит светлее окружающего темного фона. Аноптальная микроскопия позволяет достичь большей чёткости изображения малоконтрастных живых микроорганизмов.



Рисунок 4 Фазово-контрастная микроскопия *Bacillus cereus* (позитивный фазовый контраст)

ФКМ позволяет получить изображения малых прозрачных и бесцветных живых объектов (микроорганизмов, клеток).

Крупные прозрачные объекты рассеивают лучи света на небольшие углы, эти лучи проходят вместе с не отклонёнными через фазовое кольцо. Для крупных объектов фазово-контрастный эффект имеет место только вблизи их контуров, где происходит сильное рассеяние.

**Люминесцентная микроскопия.** Ее **принцип** основан на использовании явления люминесценции (флюоресценции, холодного свечения) – способности некоторых веществ флюоресцировать, т. е. на доли секунд поглощать падающие на них УФ или коротковолновые (сине-фиолетовые) лучи, а затем снова испускать свет. Испускаемый свет имеет длину волны, превышающую длину волны поглощаемого света на 20–50 нм, т. е. смещен по длине волны в сторону длинноволновой области спектра. Так, например, если поглощается синий свет, то испускается зеленый свет. Зеленый свет преобразуется в желтый, желтый – в красно-оранжевый, а невидимое УФ-излучение – в видимый свет. Такое явление носит название «эффект Стокса».

Первичная (собственная) люминесценция наблюдается без предварительного окрашивания объекта. Вторичная (наведенная) возникает после окраски препаратов специальными люминесцирующими красителями – флюорохромами (*акридиновым оранжевым* – используют для обнаружения гонококков, *аурамином* – микобактерий, *корифосфином* – коринебактерий, *ФИТЦ* (флюоресцеина изотиоцианатом) – для метки антител).

Основной частью люминесцентного микроскопа является осветитель, имеющий лампу ультрафиолетового цвета, и систему фильтров (рисунок 5).



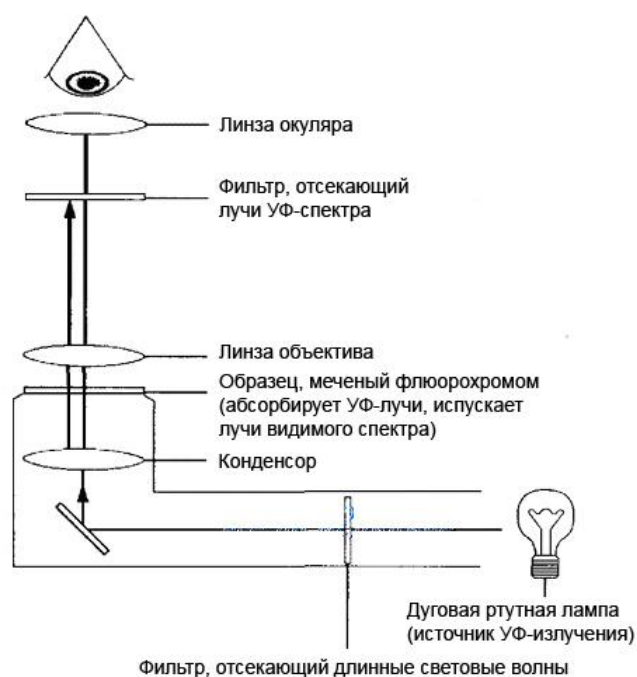


Рисунок 5 Схематическое изображение люминесцентного микроскопа

Галогенные лампы непригодны в качестве источника света для люминесцентных исследований, так как металлическая нить накаливания преобразует большую часть потребленной электроэнергии в красный или невидимый инфракрасный свет. При этом лампа имеет непрерывный спектр излучения в широком спектральном диапазоне, непригодный для наблюдения слабосветящихся объектов.

Для работы в свете люминесценции необходим источник света с линейчатым спектром, интенсивным в коротковолновой части. Таким спектром излучения обладают ртутные лампы, работающие по принципу газового разряда. Лампы имеют специфичное светящееся тело. В кварцевую колбу вплавлены два электрода. В зоне горения содержится небольшое количество ртути. За счет разрядов определенной мощности высокого напряжения между электродами возникает электрическая световая дуга, которая поддерживается в «горящем» состоянии.

Ртутная лампа излучает интенсивный свет, содержащий значительную долю УФ-излучения, которое необходимо для наблюдения в свете люминесценции.

В оптическую схему люминесцентного микроскопа вводят два светофильтра. Между зеркалом микроскопа и источником света устанавливают сине-фиолетовый светофильтр. Он пропускает от источника-осветителя только сине-зелёный свет, возбуждающий люминесценцию. Вещества-флюорохромы поглощают падающие на них коротковолновые лучи, переходят в возбуждённое состояние и приобретают иной цвет. Обратный переход в нормальное состояние происходит с испусканием света с большей длиной волны. Сине-зелёный свет мешает видеть возбуждаемое им свечение препарата, поэтому по пути к глазу наблюдателя отсекается жёлтым светофильтром.

Люминесцирующие объекты светятся ярким светом в тёмном поле зрения (рисунок 6,7). Сила их света чаще невелика, поэтому люминесцентную микроскопию проводят в затемнённом помещении.

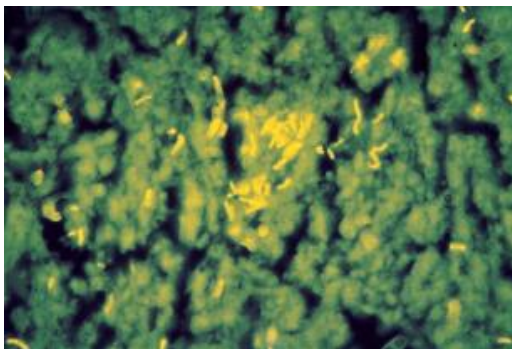


Рисунок 6 *Mycobacterium tuberculosis* (желтые) в люминесцентном микроскопе

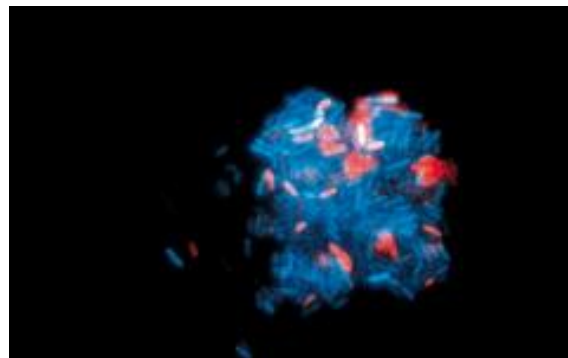


Рисунок 7 *Escherichia coli* (синие – живые, красные – погибшие) в люминесцентном микроскопе

***Преимущества люминесцентной микроскопии:***

- цветное светящееся изображение микроорганизмов на чёрном фоне;
- обнаружение и установление локализации и концентрации живых и погибших микроорганизмов;
- возможность обнаружения микроорганизмов в исследуемом материале в небольших концентрациях вследствие высокой степени контрастности изображения;
- при использовании коротких УФ лучей разрешающая способность люминесцентного микроскопа увеличивается до 0,1 мкм;
- экспресс-идентификация антигенов микроорганизмов в РИФ;
- возможность исследования прозрачных и непрозрачных объектов;
- возможность исследования жизненных процессов в динамике;
- использование люминесцентной микроскопии при цитологических и гистохимических исследованиях, так как флюорохромы могут распределяться в клетке диффузно либо избирательно окрашивать отдельные клеточные структуры или определенные химические соединения биологического объекта.

Возможности оптических микроскопов ограничены слишком большой длиной волны видимого света (6000 Å). Объекты, размеры которых меньше этой величины, находятся за пределами разрешающей способности светового микроскопа и могут быть обнаружены только при электронной микроскопии.

**Электронная микроскопия (ЭМ)** предполагает использование электронного микроскопа (рисунок 8), в котором для освещения объектов вместо светового пучка используются электронные лучи (поток электронов).

Целые клетки из-за своей большой толщины непрозрачны для пучка электронов. Поэтому ЭМ требует специальной подготовки объектов исследования. Материал после фиксации обезвоживают, заливают в эпоксидные смолы, режут стеклянными или алмазными ножами на специальных ультратомах, позволяющих получать ультратонкие срезы толщиной 30–50 нм.

Биологические объекты состоят из веществ, построенных из лёгких элементов (С, N, O, H, P, S), поэтому их изображение в электронном микроскопе слабо контрастно и в клетках можно увидеть очень мало структурных деталей. Чтобы сделать изображение более контрастным, клетки обрабатывают электронными красителями – солями тяжёлых металлов (свинца, ртути, хрома, урана, вольфрама). Так как атомы тяжёлых металлов очень сильно рассеивают электроны, то структуры клетки, поглотившие эти металлы, будут выглядеть тёмными и контрастными. В качестве индикаторов для окислительно-восстановительных ферментов в ЭМ используют теллурид калия или соли тетразолия. Эти соединения, проникая в клетки, акцептируют электроны, которые они получают от дегидрогеназ. В результате реакции эти соединения восстанавливаются и выпадают в осадок, имеющий вид электронно-плотных (тёмных на экране микроскопа) зёрнышек, глыбок, слоёв.



Таблица 3 Сравнение электронного и светового микроскопов

Параметр	Электронный микроскоп	Световой микроскоп
Источник излучения	электроны	свет
Длина волны	0,005 нм	400-700 нм
Максимальное полезное увеличение	x2500	x1500
Максимальное разрешение	0,2 нм	200 нм
Линзы	электромагниты	стеклянные
Объект	не живой, обезвоженный, маленький или тонкий	живой или неживой
Красители	содержат цветные металлы, которые отражают электроны	цветные



Рисунок 8 Электронный микроскоп

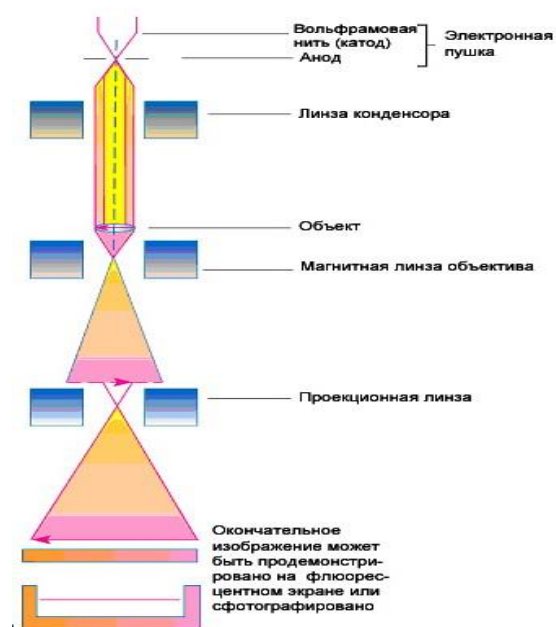


Рисунок 9 Схема электронного микроскопа

**Принцип ЭМ.** В качестве источника электронных лучей применяют электронную пушку, основой которой служит вольфрамовая нить, нагретая электрическим током (рисунок 9). Электронные лучи обладают малой длиной волны. Прохождение электронных лучей в вакууме через электромагнитные поля, создаваемые электромагнитными линзами, концентрирует и направляет электронный поток. Это обеспечивает резкое повышение разрешающей способности электронного микроскопа до 0,2 нм и увеличение до  $10^9$ .

В *трансмиссионных (просвечивающих)* электронных микроскопах электроны проходят через образец, затем собираются и фокусируются электромагнитными линзами. Электроны невидимы для глаза, поэтому они направляются на флюоресцентный экран, который воспроизводит видимое плоскостное изображение, или на фотоплёнку, чтобы получить постоянный снимок (электронную микрофотографию).

Проходя через объект, части которого имеют различную толщину, электроны больше или меньше задерживаются, а объект приобретает контрастность. Создаёт изображение только та часть электронов, которая проходит через объект и попадает на экран микроскопа. Участки клеток, слабо рассеивающие электроны, выглядят на экране светлыми, а участки, сильно рассеивающие электроны, – тёмными.

В *сканирующих* электронных микроскопах пучок электронов фокусируется в тонком зонде и им сканируют образец, а отраженные от поверхности образца электроны собираются и формируют на экране объемное изображение. При сканирующей электронной микроскопии изучают поверхность различных объектов, напыляя на них в вакуумной камере электронно-плотные вещества, и исследуют реплики, повторяющие контуры образца.

#### ***Преимущества электронной микроскопии:***

- высокая разрешающая способность электронного микроскопа позволяет наблюдать объекты, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности светового микроскопа. Поэтому ЭМ применяется для изучения ультраструктур микроорганизмов и макромолекулярных структур;
- сочетание ЭМ с другими методами позволяет проводить электронно-радиоавтографические, электронно-гистохимические, электронно-иммунологические исследования. ЭМ нашла широкое применение в морфологии, микробиологии, вирусологии, иммунологии, генетике, биохимии, онкологии.

#### ***Достоинства:***

- простой;
- доступный;
- быстрый;
- экономичный.

#### ***Недостатки:***

- низкая чувствительность световых микроскопов (около  $10^4$ - $10^5$  микроорганизмов в мл), поэтому информативность БСМИ невелика;
- низкая специфичность из-за схожести морфологии микроорганизмов разных видов, поэтому результаты его могут использоваться как ориентировочные при индикации высоких таксонов;
- обычно, как самостоятельный метод, БСМИ – поздний метод исследования, так как для накопления концентрации микроорганизмов, улавливаемой БСМИ, необходимо время; в то же время БСМИ используется на всех этапах БЛМИ для контроля чистоты выделяемой культуры.

Таблица 7 Схема микроскопического метода исследования

Цели	1. Установление этиологии заболевания.				
	2. Определение чистоты выделенной культуры.				
Этапы	1 - взятие, хранение и транспортировка материала				
	2 - приготовление микропрепаратов	для изучения убитых микроорганизмов: ✓ бактериологический мазок ✓ мазки из жидкого материала ✓ мазки из вязкого материала ✓ тонкий мазок крови ✓ толстая капля крови ✓ препарат-отпечаток ✓ препарат-соскоб ✓ препарат для ЭМ	окрашивание микропрепаратов	простые методы	
				сложные методы	
		для изучения живых микроорганизмов: ✓ висючая капля ✓ придавленная капля			
		3 - микроскопия: ✓ световая (сухая или иммерсионная система) ✓ темнопольная ✓ фазово-контрастная ✓ люминесцентная ✓ электронная			
	4 - заключение				
Оценка	достоинства	✓ простой ✓ доступный ✓ быстрый ✓ экономичный			
	недостатки	✓ низкая чувствительность ✓ низкая специфичность ✓ обычно поздний метод исследования, используется на всех этапах БЛМИ для контроля чистоты выделяемой культуры			

### Задания:

- 1 Изучить правила работы со световым микроскопом.
- 2 Изучить правила работы люминесцентного микроскопа и его применение в лабораторной диагностике.
- 3 Зарисовать устройство электронного микроскопа

### Вопросы для самоконтроля знаний

- 1 Для чего используется метод световой микроскопии в лабораторной диагностике?
- 2 Правила работы с люминесцентным микроскопом?
- 3 Требования к электронному микроскопу для проведения лабораторных исследований?

## **Лабораторная работа**

### **Вирусологический метод исследования**

#### **Цель занятия:**

**1. Изучить** комплексный метод диагностики вирусных инфекций.

**Оборудование и материалы.** Ламинарный бокс, бокс, мультимедиа-презентация.

**Диагноз** на вирусную болезнь ставится на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений (предварительный диагноз) и лабораторных исследований (окончательный диагноз).

**Предварительный диагноз** на вирусную болезнь ставят на основании следующей «триады»:

эпизоотологические данные,  
клинические признаки и  
патологоанатомические изменения.

**К эпизоотологическим данным относятся**

эпизоотическая ситуация в хозяйстве,  
вид и возраст животных,  
широта охвата болезнью,  
скорость и территориальное распространение болезни,  
процент летальности, сезонность,  
вакцинопрофилактика и другие показатели эпизоотического процесса.

**К клиническим признакам относят** видимые проявления болезненного процесса в различных системах организма животных (по сравнению с нормой), такие как, температура тела, частота пульса, нарушение аппетита, поведения, состояние кожных покровов и слизистых оболочек, функционировании органов пищеварения, выделения, репродуктивных и т.д.

**К патологоанатомическим изменениям** относят изменения в органах, обнаруженные при патологоанатомическом вскрытии павших и вынужденного убитых животных и присущие данной болезни. Различают макроскопические изменения (по сравнению с нормой) формы, размера, цвета, консистенции органов, наличие кровоизлияний, папул, везикул и других образований и микроскопические изменения, обнаруживаемые только при гистологическом исследовании.

**Окончательный диагноз** на вирусную болезнь в большинстве случаев может быть поставлен только с учетом результатов лабораторных исследований.

Обычно лабораторным исследованиям подвергают патологический материал, собранный от больных или павших животных. Задача исследования патматериала сводится к обнаружению в нем вирусных агентов и установлению их вида. Активные формы вирусов удастся обнаружить путем биопробы на чувствительных к данному вирусу лабораторных объектах и в очень редких случаях - в реакции гемагглютинации. О нахождении вируса в организме животного могут свидетельствовать противовирусные антитела в сыворотке крови и вирусные антигены в патматериале. Их обнаружение и идентификация осуществляются с помощью серологических реакций. В ряде случаев о наличии в организме вирусов удастся судить по обнаружению в патматериале вирусных телец-включений или вирионов. Те и другие обнаруживаются с помощью микроскопических методов.

**Все методы лабораторной диагностики вирусных инфекций** можно разделить на четыре группы:

1. обнаружение вируса в патматериале (экспресс-методы)
2. выделение (изоляция вируса из патматериала (вирусологические методы)
3. серологические методы идентификация выделенного вируса
4. ретроспективные методы

**Экспресс-методы.** Наиболее быстро удастся найти в патматериале вирусные антигены (белки вирусов), вирусные геномы (нуклеиновые кислоты вирусов), тельца-включения и вирионы. Методы их обнаружения объединяются в группу экспресс-методов, а постановка диагноза с их помощью называется экспресс-диагностикой.

**Обнаружение вирионов (элементарных телец в и р у с о в).** Вирионы можно обнаружить в патматериале с помощью электронной микроскопии. Только вирусы оспы млекопитающих и птиц, имеющие вирионы размером более 250 нм, могут быть обнаружены в патматериале с помощью световой микроскопии. Этот метод, получивший название вирусоскопии, сводится к тому, что у большого животного срезают папулу (или везикулу) и делают мазки на предметном стекле. Высохшие мазки окрашивают аммиачным серебром по Морозову и исследуют под микроскопом с масляной иммерсией. Метод вирусоскопии на оспе очень прост, но требует значительного опыта по распознаванию элементарных телец. Положительная вирусоскопия в сочетании с положительной биопробой достаточны для постановки диагноза на оспу.

**Обнаружение вирусных антигенов.** Для обнаружения в патматериале вирусных антигенов можно воспользоваться любой серологической реакцией, используя в качестве антигена патматериал (непосредственно или после соответствующей обработки), а в качестве антител - гипериммунные сыворотки с заведомо известными антителами (готовятся заблаговременно). Это можно сделать лучше всего с помощью реакций иммунофлуоресценции (РИФ), связывания комплемента (РСК) или диффузионной преципитации (РДП) в агаровом геле, а также методом иммуноферментного анализа, или реакцией непрямой гемагглютинации (РНГА).

Метод иммунофлуоресценции позволяет уже через 2-4 ч получить ответ на вопрос, имеется ли в патматериале антиген определенного вида вируса. Достоинства метода кроме быстроты получения ответа: простота техники, минимальная потребность в компонентах, нетребовательность к чистоте исследуемого материала, высокая чувствительность, универсальность. Недостатки РИФ: возможность случаев неспецифического свечения и перекрестных реакций между родственными антигенами.

Вирусный антиген в патматериале может быть обнаружен и с помощью РСК. Однако эта реакция менее чувствительна, чем РИФ. Для ее постановки необходимо иметь определенный минимум патматериала с достаточной концентрацией (титром) в нем вирусного антигена. Кроме того, из патматериала необходимо получить суспензию, осветлить ее и подвергнуть обработке по освобождению от антикомплемментарности (выбор метода обработки зависит от вида и состояния патматериала, а также от имеющихся в лаборатории возможностей). РСК - довольно трудоемкая реакция и требует точного предварительного титрования компонентов. Несмотря на это, она находит довольно широкое применение в практике.

Еще менее чувствительна РДП.

Названные серологические реакции позволяют относительно быстро (не более чем за 2 - 3 дня) обнаружить в патматериале антигены вирусов и одновременно установить их видовую принадлежность. Лучшей из них следует признать РИФ.

**Обнаружение телец-включений.** О присутствии некоторых вирусов в организме животного можно судить по обнаружению в патматериале вирусных телец-включений. Последние представляют собой скопления (колонии) зрелых вирионов в клетках, где шла их репродукция, или массы клеточного материала, измененного под влиянием репродукции вируса. Часто тельца-включения представляют собой комбинацию того и другого. Тельца-включения, образуемые разными вирусами, различаются между собой, и это позволяет по их обнаружению судить о присутствии определенного вируса. Известно около 100 видов вирусов, которые при репродукции в клетках образуют тельца-включения, но практическое значение имеют весьма немногие из них.

Наибольшее диагностическое значение имеют тельца-включения, образуемые вирусом бешенства в цитоплазме нервных клеток - млекопитающих и называемые тельцами Бабеша-Негри. Тельца-включения образуются вирусами оспы овец (тельца Борреля), оспы птиц (тельца Боллингера), чумы собак (тельца Лектуа), инфекционного ларинготрахеита кур (тельца Зейфрида) и многими другими вирусами. Однако вследствие непостоянства их нахождения и отсутствия специфических методов выявления (применяют общие обзорные окраски) тельца-включения практически имеют лишь вспомогательное диагностическое значение (за исключением телец Бабеша-Негри).

**Обнаружение вирусных нуклеиновых кислот.** Обнаружить в патматериале вирусные нуклеиновые кислоты можно с помощью ДНК-зондов или методом полимеразной цепной реакции. ДНК-зонд - это одноцепочный участок вирусной ДНК, нарабатываемый путем встраивания в бактериальную плазмиду и содержащий радиоактивную (или другую) метку. Будучи приведен в кон-

такт с патологическим материалом, содержащим предварительно денатурированные молекулы вирусной ДНК, образует с ними двойные цепи по принципу комплементарности. После удаления всех одноцепочных молекул ДНК вновь образовавшиеся двухцепочные молекулы обнаруживаются по радиоактивной (или другой) метке. Их обнаружение указывает на наличие в патологическом материале нуклеиновой кислоты (генов) того вируса, на который был получен зонд. В случае применения полимеразной цепной реакции наработка одноцепочных участков вирусной ДНК осуществляется методом амплификации.

**Биопроба иммунологическая проба а.** К методам экспресс-диагностики ПРИМЫкает и биопроба, хотя отнести ее к экспресс-методам можно только условно (тоже иммунологическая проба). Биопроба - это экспериментальное заражение материалом от больных животных лабораторных или естественно восприимчивых животных (хотя в более широком толковании это заражение любых живых объектов). Ставить биопробу имеет смысл только в тех случаях, когда можно надеяться на получение характерной клинической картины болезни или характерных патологоанатомических изменений. Таких болезней совсем немного. В частности, при подозрении на болезнь Ауески ставят биопробу на кроликах, на бешенство - на мышатах, на везикулярный стоматит - на морских свинках или белых мышах, на ящур - на новорожденных мышатах и морских свинках, на чуму крупного рогатого скота - на телятах, на контагиозную эктиму и оспу овец - на ягнятах, на инфекционный ларинготрахеит и инфекционный бронхит - на цыплятах. Иммунологическая проба включает биопробу на иммунных и неиммунных животных, что позволяет идентифицировать и дифференцировать болезнь. Так, на чуму крупного рогатого скота иммунологическую пробу ставят на телятах, на африканскую чуму свиней - на подсвинках. Биопроба и особенно иммунологическая проба на естественно восприимчивых животных - дорогостоящие и часто трудно выполнимые, поэтому их ставят редко. Биопробу на лабораторных животных при меняют чаще, но и она не всегда гарантирует точный ответ.

Оценивая методы экспресс-диагностики в целом, следует отметить, что все они позволяют сравнительно быстро получить ответ на вопрос о наличии и виде вируса в патологическом материале, а значит, и в организме животного, от которого взят материал. В этом и состоит их главное достоинство. Однако степень достоверности полученного ответа, как правило, не очень высока, поэтому экспресс-диагноз НУЖдается в подтверждении другими методами. В этой связи полученный на исследование патматериал только частично расходуют на исследование экспресс-методами, с тем, чтобы другую его часть исследовать иными, в основном вирусологическими методами. Практически оба направления исследования начинают одновременно, но ответ получают вначале от экспресс-методов, а затем от других методов, которые должны подтвердить правильность экспресс-диагноза или уточнить его.

**Вирусологические методы.** Сюда относятся методы, предполагающие обнаружение (индикацию) в патматериале активных форм вирусов. Индикация вирусов обычно осуществляется путем биопробы на чувствительных живых лабораторных объектах, а идентификация - в серологических реакциях. Вирусологическими эти методы можно назвать только условно в связи с поисками активного вируса (истинно вирусологическая задача), так как задачи других методов лабораторной диагностики - также обнаружение и идентификация вирусов, но в неактивной форме, или только «следов» их пребывания в организме.

Для исследования вирусологическими методами патматериал должен быть взят стерильно, а вирус в нем хорошо законсервирован. В лаборатории из него готовят взвесь (суспензию), которую последовательно освобождают от частиц материала (центрифугированием) и от бактерий и грибов (антибиотиками или фильтрацией). Полученной суспензией, которая предположительно должна содержать вирус, заражают чувствительные лабораторные объекты, в качестве которых используют лабораторных животных, куриные эмбрионы, культуры клеток. Пути и методы заражения определяются тропизмом предполагаемого вируса (или вирусов), выбор объекта зависит от происхождения патматериала и чувствительности объектов к предположительно находящемуся в материале вирусу.

При выборе лабораторного объекта, на котором предполагается произвести индикацию вируса, руководствуются данными клинико-эпизоотологического диагноза, видом животного, от которого получен патматериал, и видом самого патматериала. Совокупность этих данных в огромном

большинстве случаев позволяет выбрать необходимую лабораторную систему и метод ее заражения. Так, в патматериале, полученном от больных птиц, целесообразно искать вирус путем заражения куриных эмбрионов. При этом исходят из того простого рассуждения, что коль скоро вирус размножался в организме взрослой курицы, то и в менее защищенном курином эмбрионе он должен, безусловно, размножаться (бывают и исключения). Если патматериал получен от млекопитающих, то имеет смысл пытаться обнаружить в нем вирус путем заражения культур клеток, полученных из органов того же вида животного, от которого был взят патматериал. При этом исходят из того же предположения, что вирус в патматериале уже адаптирован к клеткам определенного вида животных и можно надеяться получить ЦПД относительно быстро.

Наиболее трудно подобрать вид лабораторных животных для индикации вируса в патматериале. Здесь остается ориентироваться только на предварительный диагноз, который должен определять наиболее вероятный вид (или виды) возбудителя инфекции, и, основываясь на свойствах таковых, подобрать чувствительный к возбудителю вид лабораторных животных. Что касается пути экспериментального заражения лабораторных животных, то надо стремиться, чтобы вирус попадал в тот же тип клеток, в каком он присутствовал в патматериале (т. е. суспензией мозга надо заражать в мозг, суспензией печени - внутрибрюшинно, суспензией легких или смывом верхних дыхательных путей - в нос и т. д.), учитывая тропизм вирусов.

Все же, несмотря на вышесказанное, при обнаружении вирусов в патматериале довольно часто случается, что в первом пассаже лабораторные системы не дают видимой реакции на вирус. Это происходит потому, что вирус оказался недостаточно адаптированным к лабораторной системе или его количество недостаточно для проявления специфической реакции. В таком случае первый пассаж считают «слепым,>. Из зараженных лабораторных систем собирают вируссодержащий материал и им заражают новую партию тех же лабораторных систем, т. е. производят второй пассаж вируса. Если и второй пассаж не покажет реакции на вирус, его тоже считают «слепым,> и проводят третий. Иногда только на 10-м пассаже вирус начинает проявлять специфическое действие, так как он к этому моменту уже достаточно адаптировался к лабораторной системе и накопился в количестве, обеспечивающем характерную для данной системы реакцию на вирус. Обычно же ведут 3-4 «слепых» пассажа.

Материал, полученный от характерно реагирующей на заражение лабораторной системы, считается выделенным вирусом и может быть использован для изучения его свойств.

Окончательно идентифицировать обнаруженный вирус можно только с помощью одной из подходящих **серологических реакций**. Изучаемый вирус в этом случае служит антигеном, а в качестве специфических сывороток используют заранее подготовленные и хранимые в лаборатории (в законсервированном виде) антисыворотки к различным, но часто встречающимся вирусам.

Естественно, что для изучения свойств обнаруженного вируса и использования его в качестве антигена необходимо получить достаточное количество суспензии этого вируса. Поэтому перед идентификацией обнаруженный вирус размножают путем нескольких пассажей на той же лабораторной системе, на которой он был обнаружен.

Выбор серологической реакции для окончательной идентификации вируса определяется в основном свойствами самого вируса и в меньшей степени наличием возможностей поставить ту или иную серологическую реакцию. Так, если вирус проявил гемагглютинирующие свойства, его идентификацию проще всего и вполне надежно можно осуществить в реакции торможения гемагглютинации. Если вирус выделяли на культуре клеток и он проявил гемадсорбирующие свойства, есть смысл идентифицировать его в реакции торможения гемадсорбции.

При отсутствии же названных свойств у выделенного вируса надежно идентифицировать его можно в реакции нейтрализации на том лабораторном объекте, на котором он был обнаружен. Однако при этом учитывается, что РН довольно трудоемкая, длительная и подчас дорогостоящая. Поэтому можно воспользоваться реакцией диффузионной преципитации в агаровом геле. Эта реакция проста по технике, быстро дает ответ, требует крайне малого количества ингредиентов, но она отличается низкой чувствительностью и поэтому может быть использована только в том случае, когда и антиген, и сыворотка взяты в высоких титрах (а это не часто удается получить).

Можно также воспользоваться РСК. Однако она достаточно трудоемка и требовательна к компонентам, для нее пригодны только растворимые антигены и к тому же свободные (или освобожденные) от антикомплементарных свойств. Поэтому РСК пригодна не для каждого вируса.

**Ретроспективная диагностика.** Серологическим исследованиям подлежат сыворотки крови больных животных. Обычно используют парные сыворотки, для получения которых от каждого животного кровь берут дважды с интервалом в 2-3 нед. Для получения парных сывороток кровь необходимо брать в начале и в конце болезни, но практически уловить эти сроки удается редко. Брать кровь и получать из нее сыворотки необходимо в асептических условиях, чтобы сыворотки были стерильными. Хранить их до исследования необходимо под пробками в холодильнике или в замороженном (минус 25 ос и ниже) состоянии.

Задача сводится к установлению в парных сыворотках титра антител к вирусам, которые предположительно могли быть возбудителями болезней животных, от которых получены сыворотки. Основанием для предположения, к каким вирусам искать антитела, служит предварительный диагноз, поставленный по данным эпизоотологических наблюдений, клинических симптомов и патологоанатомических изменений. Наличие в сыворотках антител и их титры определяют в серологических реакциях с использованием антигенов предполагаемых вирусов (таковые должны быть в лаборатории, их готовят заблаговременно на биофабриках). Такие биопрепараты называют специфическими антигенами, а иногда - стандартными, эталонными вирусами.

Выбор серологической реакции определяется тем, какая из них наиболее пригодна для работы с данным вирусом, а также с возможностями лаборатории и квалификацией персонала. При этом также учитываются быстрота получения ответа и трудоемкость работы. Проще всего задача решается, если вирус, к которому ищут в сыворотках антитела, обладает гемагглютинирующими свойствами. В этом случае поиск и титрование антител имеют смысл производить в реакции торможения гемагглютинации (РТГ А) как наиболее простой по технике и быстро дающей ответ.

Простотой техники использования и быстротой отличается также реакция диффузной преципитации в агаровом геле (РДП). Но она требует, чтобы антиген и антитело были в высоком титре, так как в противном случае полосы преципитации получаются неяркие или совсем не получаются. К тому же в этой реакции затруднительно произвести уверенное титрование антител. Все это заставляет использовать РДП только в случаях, когда необходимо получить быстрый ответ о наличии антител к неагглютинирующему вирусу и не требуется точного определения титра антител в сыворотках, т. е. только для предварительной ориентировки.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГ А) является высокочувствительным и универсальным тестом для определения титра антител к различным вирусам в сыворотках крови. Ответ она дает быстро. Но для ее постановки необходимо иметь резерв консервированных эритроцитов, sensibilized разными вирусами.

Иммуноферментный анализ (ИФА) позволяет определять титр антител и с учетом воспроизведения его микрометодом с использованием современного лабораторного оборудования дает возможность проводить широкомасштабные эпизоотологические обследования.

Реакция связывания комплемента (РСК) может быть использована для определения титра антител ко многим вирусам, если этап связывания комплемента вести длительно на холоде. Однако РСК требует наличия соответствующим образом подготовленных антигенов, отличается трудоемкостью и требовательностью к точности дозировки компонентов. Тем не менее подавляющее большинство практических работников владеет техникой постановки РСК и широко ее использует в диагностической работе.

Наиболее достоверные результаты по титрованию антител практически к любым вирусам (кроме бешенства и чумы свиней) дает реакция нейтрализации (РН). К тому же она позволяет обнаруживать вируснейтрализующие антитела, которые непосредственно создают в организме защиту против вирусов. Но эта реакция требует для постановки значительного времени, она трудоемка, требует стерильных условий.

После установления титра антител в парных сыворотках результаты интерпретируют, исходя из динамики титра. Считается, что нарастание в 4 раза и более титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой уверенно свидетельствует об активном инфекционном процессе, протекающем в организме животного. В период взятия у него крови. При этом болезнь была вызваема работой. Проще всего задача решается, если вирус, к которому ищут в сыворотках антитела, обладает гемагглютинирующими свойствами. В этом случае поиск и титрование антител имеют смысл производить в реакции торможения гемагглютинации (РТГ А) как наиболее простой по технике и быстро дающей ответ.



Простотой техники использования и быстротой отличается также реакция диффузной преципитации в агаровом геле (РДП). Но она требует, чтобы антиген и антитело были в высоком титре, так как в противном случае полосы преципитации получаются неярко или совсем не получаются. К тому же в этой реакции затруднительно произвести уверенное титрование антител. Все это заставляет использовать РДП только в случаях, когда необходимо получить быстрый ответ о наличии антител к неагглютинирующему вирусу и не требуется точного определения титра антител в сыворотках, т. е. только для предварительной ориентировки.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) является высокочувствительным и универсальным тестом для определения титра антител к различным вирусам в сыворотках крови. Ответ она дает быстро. Но для ее постановки необходимо иметь резерв консервированных эритроцитов, sensibilized разными вирусами.

Иммуноферментный анализ (ИФА) позволяет определять титр антител и с учетом воспроизведения его микрометодом с использованием современного лабораторного оборудования дает возможность проводить широкомасштабные эпизоотологические обследования.

Реакция связывания комплемента (РСК) может быть использована для определения титра антител ко многим вирусам, если этап связывания комплемента вести длительно на холоде. Однако РСК требует наличия соответствующим образом подготовленных антигенов, отличается трудоемкостью и требовательностью к точности дозировки компонентов. Тем не менее подавляющее большинство практических работников владеет техникой постановки РСК и широко ее использует в диагностической работе.

Наиболее достоверные результаты по титрованию антител практически к любым вирусам (кроме бешенства и чумы свиней) дает реакция нейтрализации (РН). К тому же она позволяет обнаруживать вируснейтрализующие антитела, которые непосредственно создают в организме защиту против вирусов. Но эта реакция требует для постановки значительного времени, она трудоемка, требует стерильных условий.

После установления титра антител в парных сыворотках результаты интерпретируют, исходя из динамики титра. Считается, что нарастание в 4 раза и более титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой уверенно свидетельствует об активном инфекционном процессе, протекающем в организме животного. В период взятия у него крови. При этом болезнь была вызвана тем возбудителем, к которому было найдено повышение титра антител в парных сыворотках.

Недостаток метода серологической диагностики - его ретроспективность, так как к моменту постановки диагноза животное, от которого получены парные сыворотки, уже или выздоровело, или пало. Однако поставленный серологическими методами диагноз дает уверенные представления о болезни и имеет важное значение для мероприятий по ликвидации вспышки вирусной болезни или ее эпизоотии. (Хотя для самих животных, от которых получены парные сыворотки, диагноз уже и потерял значение.)

Последовательность этапов лабораторной диагностики вирусных болезней животных, их целевое назначение и методическое решение отражены в схеме, представленной на первом развороте практикума.

Однако в каждом конкретном случае методы выполнения отдельных этапов различны, что зависит от таких факторов, как вид животного, тропизм и другие биологические свойства вируса, вызвавшего заболевание, обеспеченность лаборатории необходимыми диагностическими - препаратами.

Врач-вирусолог лаборатории изучает изложенные в сопроводительном письме клинико-эпизоотологические данные, знакомится с предварительным диагнозом, поставленным ветеринарным врачом хозяйства.

### **Задания:**

- 1 Изучить комплексный метод диагностики вирусных инфекций

### **Вопросы для самоконтроля знаний**

- 1 Что такое экспресс-диагностика вирусных инфекций?
- 2 Ретроспективная диагностика вирусных инфекций?
- 3 Схема вирусологической диагностики?

## Лабораторная работа

### Серологические методы диагностики

#### Цель занятия:

1. Изучить принцип серологического метода исследований.
2. Ознакомиться с техникой постановки РГА, РНГА, РТГА, РИД, РП.
- 3.

**Оборудование и материалы.** Эритроцитарный антигенный диагностикум для диагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота; исследуемые сыворотки крови крупного рогатого скота; разбавитель для РНГА; пипетки на 1 мл; пробирки; автоматические пипетки; сыворотки крови; физиологический раствор; фильтровальная бумага; плексиглазовые панели с лунками; аппарат Такачи для постановки РНГА, исследуемая позитивная и нормальная сыворотки крови; суспензия гемагглютинирующего вирусного диагностикума; 1%-я взвесь эритроцитов кур; физиологический раствор NaCl; плексиглазовые пластинки; стерильные градуированные пипетки на 1 и 5 мл; сосуды с дезраствором.

**Серологический** (от лат. *serum* - сыворотка, *logos* – учение) **метод исследования** – метод, в основе которого лежит реакция специфического взаимодействия антигенов (Аг) и антител (Ат).

Используя этот метод, можно определить неизвестное Ат при взаимодействии с известным Аг, и наоборот.

#### Основные понятия.

**Диагностическая сыворотка** (известное Ат) – иммунная сыворотка, содержащая Ат известной специфичности в известном титре. Диагностические сыворотки получают путём иммунизации животных соответствующим Аг. В последнее время в этом качестве всё чаще используют моноклональные Ат.

**Диагностикум** (известный Аг) - взвесь в физрастворе известных микроорганизмов или извлечённых из них Аг. В качестве неспецифического диагностикума могут быть использованы перекрёстно реагирующие Аг.

**Титр сыворотки** – максимальное разведение сыворотки (или минимальное её количество), в котором обнаруживаются Ат.

**Диагностический титр** – разведение сыворотки, в котором реакция положительна только у больных и отрицательна у здоровых. Для одной инфекции диагностический титр каждой серологической реакции свой.

**Парные сыворотки** – сыворотки одного обследуемого, взятые с определённым интервалом для изучения динамики титра Ат. Первую сыворотку берут в начале заболевания, в острую стадию, вторую – при острых инфекциях – через 7–14 дней, при хронических инфекциях – через месяц.

**Серонегативный период** – стадия заболевания, в которой специфические Ат ещё не обнаруживаются, несмотря на наличие возбудителя («серологическое окно»).

**Серопозитивный период** – стадия заболевания, в которой специфические Ат обнаруживаются.

**Сероконверсия** – переход серонегативности в серопозитивность.

#### Задачи:

1) **серодиагностика инфекционных заболеваний**, основанная на обнаружении в сыворотке Ат; **диагностическое значение имеют:**

а) *обнаружение Ат в диагностическом титре;*

б) *оценка динамики титра Ат.* При установлении свежего случая заболевания диагностическое значение имеет 4-кратное нарастание титра Ат в парных сыворотках. Однако при наличии дополнительных клинических и эпидемиологических данных для установления диагноза достаточно 2-кратного нарастания титра Ат.

в) *определение классоспецифичности антител* чётко характеризует этапы инфекционного процесса, а также может служить косвенным прогностическим критерием. Так, выявление специфических IgM свидетельствует о свежем случае заболевания (инфекционная реакция). Выявление специфических IgG – анамнестическая реакция: постинфекционная (титр антител выше) или поствакцинальная (титр антител ниже).

2) **серодиагностика аутоиммунных заболеваний и аллергических реакции немедленного типа**, основанная на обнаружении в сыворотке Ат;

3) **серодиагностика заболеваний**, основанная на обнаружении Аг в биологических жидкостях или тканях:

а) *экспресс-диагностика инфекционных заболеваний при обнаружении Аг микроорганизмов* (например, диагностика хламидиозов, микоплазмозов, уреаплазмозов методом РИФ).

Количественное определение Аг микроорганизмов в динамике инфекционного процесса служит критерием эффективности проводимой антимикробной терапии.

б) *диагностика опухолей при обнаружении в сыворотке опухолеассоциированных Аг* (например, ПСА (простатспецифического Аг) при раке простаты).

4) **определение активности гуморального поствакцинального индивидуального или коллективного иммунитета;**

5) **определение титров диагностических, лечебных и профилактических сывороток;**

6) **определение групп крови, подбор доноров при пересадке органов, определение гормонов** (щитовидной железы, половых);

7) **определение фальсификации пищевых продуктов, судмедэкспертиза** на основании определения видовой принадлежности антигенов.

#### **Материал для серологического исследования:**

1) сыворотки, полученные из венозной крови, взятой в утреннее время, натощак (между последним приемом пищи и взятием крови должно пройти не менее 12 часов). За сутки до взятия крови необходимо исключить жирную пищу и прием алкоголя, за 1 час – курение. Необходимо исключить повышенные психоэмоциональные и физические нагрузки;

2) чистые культуры микроорганизмов, выделенные от больных или из объектов внешней среды;

3) патологический материал от больных (например, соскобы эпителия, пунктаты, биоптаты, секционный материал) для экспресс-обнаружения Аг микроорганизмов.

#### **I. Достоинства:**

1) **высокая специфичность** определяется способностью Аг взаимодействовать только с гомологичными Ат. Самая низкая специфичность – у РА.

2) **чувствительность** – минимальное количество Аг или Ат, которое выявляет реакция; хотя чувствительность зависит от метода исследования: минимальная – у РА (выявляет 100 мг Ат в 1 л), максимальная – у ИФА и РИА (выявляют до 0,00001 мг Ат в 1 л). В целом чувствительность достаточно высокая, но не абсолютная (95–98% в самых чувствительных реакциях).

3) **ранний метод исследования при выявлении Аг**, как микробных (обычно в РИФ), так и опухолеассоциированных (обычно в ИФА).

4) **возможность проведения ретроспективных эпидемиологических исследований на основании обнаружения Ат**. Ат циркулируют в организме относительно долго после контакта организма с возбудителем. Это особенно важно при ретроспективной диагностике субклинических форм заболеваний.

5) **быстрота получения результатов**. Скорость получения результатов зависит от используемой реакции. Так, при постановке РА на стекле результат может быть получен через 5 минут, при постановке РПГА – через 2 часа, РСК, ИФА, РИА – через 4 часа, РП в геле – через 24 часа.

#### **II. Недостатки:**

1) **поздний метод исследования при выявлении Ат**: при острых инфекционных заболеваниях обнаружение Ат часто бывает ретроспективным потому, что Ат обычно появляются не ранее 7 дня от начала заболевания, а к этому времени острое заболевание может закончиться.

2) **наличие ложных результатов:**

**А. Ложноположительных (ЛПР):** острых (сохраняются до 6 месяцев) или хронических (наблюдаются постоянно).

*Причины ЛПР:*

а) низкое качество используемой тест-системы, её недостаточная специфичность;

б) наличие сопутствующих заболеваний и состояний:

для острых ЛПР:

– изменение гормонального фона (во время менстуации, за 2 недели до родов, в течение 3 недель после родов);

– другие острые инфекции;

– изменения липидного обмена при отравлениях, приёме алкоголя, жирной пищи, некоторых лекарств;

– при обширных травмах (открытые переломы, сотрясение мозга);

– при инфаркте миокарда (лёгкого).

для хронических ЛПР:

– нарушение обмена веществ;

– другие хронические инфекции;

– аллергические и аутоиммунные заболевания;

– хронические интоксикации;

– злокачественные опухоли.

в) технические погрешности в работе лаборанта (перепутывание образцов).

**Б. Ложноотрицательных (ЛОР).**

*Причины ЛОР:*

а) ранняя стадия заболевания, когда Ат не вырабатываются (серонегативный период) или титр их низкий, неулавливаемый данной тест-системой;

б) особенности течения заболевания:

– снижение реактивности организма при тяжёлом течении заболевания;

– раннее назначение этиотропного или специфического лечения (любое лечение мешает естеству);

– физиологическое иммунодефицитное состояние: у престарелых людей, а также на этапе становления иммунной системы у детей до 2 лет;

– при микробоносительстве;

в) низкая чувствительность используемой тест-системы;

г) технические погрешности в работе лаборанта (перепутывание образцов).

**3) *потенциальная опасность инфицирования*** всегда существует при работе с биологическим материалом.

**Серологический метод** – совокупность реакций, основанных на *взаимодействии антиген–антитело* (Аг–Ат) и направленных на выявление в сыворотке крови и других жидкостях организма антител к антигенам возбудителей инфекционных болезней, либо собственно микробных антигенов. Серологический метод характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью. Большинство реакций этого метода просты в проведении и учете, доступны широкому кругу лабораторий, безопасны, экономичны, поддаются стандартизации. К его недостаткам можно отнести: 1) косвенный характер результата, когда об этиологии болезни судят не по выделению возбудителя, а по ответу (иммунному) организма на возбудитель; 2) необходимость парентерального вмешательства в организм больного; 3) в большинстве случаев поздняя постановка диагноза, что объясняется природной динамикой гуморального иммунного ответа; 4) возможность принятия анамнестических Ат (как результат ранее перенесенного заболевания или вакцинации) за Ат к текущей инфекции. При определении микробных антигенов 3-й и 4-й недостатки отсутствуют, но необходимо учитывать особенности циркуляции антигенов разных микробов и соотносить эти особенности с возможностью взятия материала для исследования.

**Этапы серологического метода:**

1) *взятие материалов для исследования.* В большинстве случаев материалом является *сыворотка крови*. Ее получают после образования сгустка крови, кровь следует забирать в строго асептических условиях по стандартной методике;

2) выбор серологической реакции для данного случая зависит от цели исследования, предполагаемого заболевания, фазы болезни, материала для исследования, чувствительности реакции, возможностей конкретной лаборатории. Для выявления Ат, а также Аг используют реакции агглютинации (РА), пассивной гемагглютинации (РПГА), иммунофлюоресценции (РИФ), торможения гемагглютинации (РТГА), *преципитации, флоккуляции*, реакцию связывания комплемента (РСК) и др.;

3) постановка серологической реакции;

4) регистрация серологической реакции с целью определения присутствия серологических маркеров инфекции.

Разнообразным серологическим реакциям свойственно несколько общих характеристик:

1) любые серологические реакции являются реакциями взаимодействия Ат и Аг, поэтому во всех случаях для установления присутствия Ат в исследуемом субстрате необходим набор известных стандартных корпускулярных или растворимых Аг, называемых *диагностикумами*. В свою очередь, для установления присутствия Аг нужен набор *иммунных диагностических сывороток*;

2) взаимодействие Аг и Ат осуществляется только в присутствии электролита, в качестве которого обычно используют изотонический раствор хлорида натрия или буферные смеси, рН системы должен быть около 7;

3) для образования комплекса Аг–Ат требуется период инкубации при особых температурных условиях (от +4 °С до +37 °С). Образование специфического иммунного комплекса происходит быстро; видимого простым глазом феномена (агглютинации, лизиса и др.) – медленно, через несколько часов или даже суток;

4) оба компонента серологической реакции (антиген и антитела) должны присутствовать в эквивалентном соотношении. Избыток какого-либо из компонентов блокирует образование комплекса Аг–Ат и способствует ложно отрицательным результатам.

Учет серологических реакций осуществляют визуально, иногда с помощью лупы. Его суть учета сводится к определению феномена связывания Аг и Ат по образованию комплекса Аг–Ат. Визуально образование этого комплекса сопровождается двумя основным феноменами: агглютинацией и преципитацией. Различия между ними определяются особенностями антигенов и антител, специфичных к ним. В то же время среди микробных антигенов присутствуют и такие, которые индуцируют синтез непреципитирующих. Образование комплекса Аг–Ат в данном случае не сопровождается ни феноменом агглютинации, ни феноменом преципитации. Выявление факта образования комплекса Аг–Ат требует маркирования диагностического компонента реакции специальными метками либо перевода диагностического антигена в другое агрегатное состояние.

При оценке реакции применяют 3 главных критерия: наличие и интенсивность реакции (в плюсах и др.); диагностический титр; нарастание титра Ат в течение болезни в 4 и более раза. Наличие реакции устанавливают по визуальным феноменам или по связыванию иммунохимического маркера. Для оценки интенсивности серологической реакции используют принцип 4 «+» (таблица 11).

Таблица 8 Система оценки серологических реакций по 4 «+» для реакций агглютинации и преципитации

Показатели	Результат реакции			
	++++	+++	++	+ / –
1. Связывание антигена	полное, 100 %	75 %	50 %	менее 25 %
2. Образование белковых конгломератов	массивное, конгломераты не распадаются при встряхивании пробирок	массивное, конгломераты распадаются при встряхивании пробирок	умеренное, конгломераты распадаются при встряхивании пробирок	конгломераты отсутствуют

3. Состояние жидкой фракции системы	совершенно прозрачный супернатант	легкая опалесценция	выраженная опалесценция	мутная жидкость
4. Характеристика результатов	реакция высокоположительная	реакция умеренно положительная	реакция положительная	реакция сомнительная

Для количественного представления результатов серологической реакции применяют понятие титра антител или антигенов. Для определения титра Ат (либо титра Аг) необходимо поставить серологическую реакцию, приготовив ряд разведений сыворотки крови или иного материала (раститровать). При приготовлении разведений сыворотки крови используют раствор электролита (чаще всего изотонического раствора хлорида натрия). Шаг разведения (титрования) задается соотношением объема раствора электролита и объема сыворотки крови. Например, при последовательных разведениях с шагом в 2 раза в 1-й пробирке смешиваются равные объемы раствора электролита и сыворотки крови, при шаге в 5 раз к 4-м объемным частям раствора электролита добавляют 1 объем сыворотки, при шаге в 10 раз – к 9 объемам раствора электролита добавляют 1 объем сыворотки крови (таблица 12).

Таблица 9 Схема раститровки исследуемого материала при постановке серологической реакции

Компоненты реакции (в 1мл)	Номера опытных пробирок					
	1	2	3	4	5	6
1. Раствор электролита	–	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
2. Иссл. сыв-ка	0,1	0,1				
Компоненты реакции (в 1мл)	Номера опытных пробирок					
	1	2	3	4	5	6
Манипуляция		перемешать и перенести 0,1 мл →	перемешать и перенести 0,1 мл →	перемешать и перенести 0,1 мл →	перемешать и перенести 0,1 мл →	перемешать и вылить 0,1
Полученное разведение	цельная	в 2 раза	в 4 раза	в 8 раз	в 16 раз	в 32 раза

Соответственно, **титр Ат** – это максимальное разведение исследуемого материала, дающее положительный (не менее ++) результат серологической реакции. Титр Ат (Аг) выражается разведением исследуемого материала, например, 1 : 16, 1 : 250 и т. п. Диагностический титр – это титр антител, характерный для большинства случаев конкретного инфекционного заболевания, определяемый на пике гуморального иммунного ответа. Диагностический титр определяется путем многочисленных исследований, выполняемых на базах различных лабораторий.

Однако есть ряд ситуаций, когда подтверждение диагноза инфекционного заболевания с помощью диагностического титра невозможно: определение титра антител осуществляется ранее, чем развивается гуморальный иммунный ответ; перенесение заболевания или период после вакцинации в прошлом (в анамнезе); инфекция, вызванная агентом, обладающим кросс-реактивными антигенами с другим возбудителем. В этих случаях для подтверждения диагноза инфекционной болезни используется понятие «нарастание титра антител», т. е. оценивается динамика гуморального иммунного ответа. Критерием развития гуморального иммунного ответа является нарастание титра антител за 10–14 дней в 4 и более раз. Для определения нарастания титра антител исследованию подвергаются 2 образца сыворотки крови, взятых с указанным интервалом.

### 1.2. Основные серологические реакции

**Реакция агглютинации (РА)** представляет собой один из способов выявления антигена / антител по принципу нахождения известного по неизвестному. В случае нерастворимости антигена (его корпускулярности) при добавлении к нему специфичных антител происходит формирование комплекса «антиген–антитело» в виде белкового агломерата. Этот феномен получил название агглютинация. Основное преимущество реакции агглютинации – возможность визуального учета и

простота постановки. Однако в сравнении с более современными способами выявления антиген / антитела чувствительность реакции агглютинации невысока.

Существуют различные варианты РА:

- 1) пробирочные и на стекле;
- 2) объемные и капельные;
- 3) количественные и качественные;
- 4) обычные, ускоренные и экспресс-реакции.

Основные области применения РА связаны с необходимостью идентификации микробных культур, антигенов клеток крови (А, В, 0), а также с определением наличия титра антител или антигенов в сыворотке крови в практике инфекционных болезней.

#### **Компоненты РА:**

1) диагностический компонент – антиген в виде суспензии в случае поиска антител, т. е. **диагностический**, или раствор антител при необходимости идентификации антигена, т. е. **диагностическая сыворотка**. В случае РА чаще диагностикум называют **агглютиногеном**, а диагностическую сыворотку – **агглютинином**;

2) исследуемый материал – микробная культура в виде суспензии или выросшей на скошенном агаре, клетки крови (эритроциты при определении антигенов по системе А, В, 0), сыворотка крови пациента при диагностике инфекционного заболевания или сыворотка крови лабораторного животного при постановке биологического / иммунологического эксперимента;

3) раствор электролита в качестве среды для разведения ингредиентов реакции и постановки реакции. Обычно используют 0,15 М (0,85 %) раствор хлорида натрия, реже – другие прописи.

Лабораторная посуда и необходимое оборудование. Для постановки РА необходим ограниченный перечень оборудования: 1) пробирки или предметные стекла для самой реакции (иногда нужны особые блюда либо другие предметы, например, для определения группы крови); 2) пипетки стеклянные или автоматические дозаторы с наконечниками, 3) термостат или холодильник, поскольку разные варианты РА проводятся при разных температурных режимах; 3) источник света и черная поверхность для лучшей визуализации результата РА.

Схема постановки РА: приготовление разведений исследуемого образца; внесение разведений в пробирки или нанесение их на стекло, 3) добавление диагностического компонента; инкубация при необходимых температурных условиях; регистрация результатов.

Регистрация результатов РА проводится по системе 4 «+» в процессе визуального осмотра.

**Реакция пассивной (непрямой) гемагглютинации (РПГА)**. Название реакции означает, что феномен агглютинации формируется при участии вспомогательных частиц, т. е. пассивно или косвенным способом. Реакция пассивной (непрямой) агглютинации проводится для регистрации взаимодействия антиген–антитело в случае, когда антиген водорастворим и при его связывании со специфическими антителами не происходит образования крупных видимых глазом агрегатов. Но если такой водорастворимый антиген неспецифически сорбировать на каких-либо частицах, то проводимая реакция приобретает все характерные для реакции агглютинации черты. Чаще всего для постановки РПА (РНА) применяют эритроциты барана или частицы латекса диаметром 3–5 мкм. При использовании эритроцитов барана в качестве носителя диагностического компонента реакцию называют реакцией пассивной гемагглютинации (РПГА) или реакцией непрямой гемагглютинации (РНГА). При использовании частиц латекса реакцию пассивной агглютинации называют реакцией латекс агглютинации (РЛА).

Основные области применения РПА: определение эффективности поствакцинального иммунитета (уровня специфических антител после вакцинации), диагностика инфекционных болезней (определение титра антител или присутствия в биологических средах пациента антигенов микроорганизма, являющегося причиной заболевания), диагностика аутоиммунных заболеваний (определение ревматоидного фактора).

#### **Компоненты РПА:**

1) диагностический компонент. Диагностикум, представляющий собой антиген, сорбированный на эритроцитах барана, в этом случае называется **эритроцитарным диагностикумом**. А если для сорбции антигена используют частицы латекса, то диагностикум называют **латексным**. При определении антигена по известным антителам на частицах (эритроциты или латекс) необходимо

сорбировать диагностические антитела, тогда диагностическая сыворотка называется **эритроцитарным (латексным) антигальным диагностиком**;

2) исследуемый материал – сыворотка крови пациента при диагностике инфекционных, аутоиммунных заболеваний или сыворотка крови лабораторного животного при постановке биологического / иммунологического эксперимента;

3) раствор электролита в качестве среды для разведения ингредиентов реакции и постановки реакции. Обычно используют 0,15 М (0,85 %) раствор хлорида натрия, реже – другие прописи.

Для постановки РПА необходимо то же оборудование, что и для постановки РА.

Схемы постановки и учета РПА аналогичны РА.

#### **Задания:**

1. Освоить методику титрования исследуемого материала для получения ряда разведений.
2. Поставить реакцию агглютинации (качественную) для определения антигенной структуры культуры бактерий. Провести инкубацию и учет результатов.
3. Поставить реакцию пассивной гемагглютинации, определить титр антител и сделать вывод о наблюдаемой у пациента реакции.

#### **Вопросы для самоконтроля знаний**

- 1 Серологические реакции, сущность, компоненты?
- 2 РНГА, компоненты, схема постановки?
- 3 РТГА, компоненты, схема постановки?
- 4 РИД, компоненты, схема постановки?
5. РП, компоненты, схема постановки

### **Лабораторная работа Иммунохимический метод диагностики**

#### **Цель занятия:**

1. Изучить диагностические возможности иммунохимических методов анализа

**Оборудование и материалы.** Набор для серологической диагностики вирусной инфекции иммуноферментным методом, сыворотка крови здоровых животных (отрицательный контроль), сыворотка крови иммунизированных животных (положительный контроль и испытываемая сыворотка), дистиллированная вода, многоканальные пипетки, градуированные пипетки на 1-10 мл, резиновые груши, мерные цилиндры, колбы, фотометр.

**Иммуноферментный метод (иммуноферментный анализ, ИФА)** – определение Аг (Ат) с помощью Ат (Аг), ковалентно соединенных с ферментом (чаще пероксидазой хрена, реже –  $\beta$ -глюкуронидазой, щелочной и кислой фосфатазами). Иммунный комплекс выявляют с помощью фотометрического измерения оптической плотности окрашенных продуктов, которые образуются в результате ферментативного расщепления субстрата ферментом. Из-за разнообразия объектов исследования – от низкомолекулярных соединений до вирусов и бактерий, и многообразия условий проведения ИФА существует большое количество вариантов этого метода.

Возможна классификация по типу иммунохимического взаимодействия на первой стадии анализа (в которой происходит связывание определяемого вещества). Если в системе присутствуют только анализируемое соединение и соответствующие ему центры связывания (антиген и специфические антитела), то **метод является неконкурентным**. Если же на первой стадии в системе одновременно присутствует анализируемое соединение и его аналог (меченное ферментом анализируемое соединение или анализируемое соединение, иммобилизованное на твердой фазе), конкурирующие за ограниченное количество центров специфического связывания, то **метод является конкурентным**.

Примером неконкурентного формата ИФА является «сэндвич»-метод. К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор, содержащий анализируемый антиген. В процессе



инкубации на первой стадии на твердой фазе образуется комплекс антиген-антитело. Затем носитель отмывают от несвязавшихся компонентов и добавляют меченные ферментом специфические антитела. После вторичной инкубации и удаления избытка конъюгата антител с ферментом определяют ферментативную активность носителя, которая пропорциональна начальной концентрации исследуемого антигена. На стадии выявления специфического иммунного комплекса антиген оказывается как бы зажатым между молекулами иммобилизованных и меченных антител, что послужило поводом для широкого распространения названия «сэндвич»-метод. Ферментативная реакция (цветная реакция) проходит в присутствии перекиси водорода и субстрата, представленного неокрашенным соединением, которое в процессе пероксидазной реакции окисляется до окрашенного продукта реакции на заключительном этапе проведения исследования. Интенсивность окрашивания зависит от количества выявленных специфических антител. Результат оценивается спектрофотометрически или визуально.

«Сэндвич»-метод может быть использован для анализа только тех антигенов, на поверхности которых существуют, по крайней мере, две антигенные детерминанты. На этом формате основано большое количество тест-систем для иммуноферментной диагностики различных инфекций: ВИЧ-инфекция, вирусные гепатиты, цитомегаловирусная, герпесная, токсоплазменная и другие инфекции.

Среди конкурентных схем твердофазного ИФА существует два основных формата:

Прямой конкурентный формат ИФА использует иммобилизованные на твердой фазе специфические антитела, а меченый ферментом и немеченый антиген конкурируют за связь с иммобилизованным антителом.

К иммобилизованным антителам добавляют раствор, содержащий определяемое вещество и фиксированную концентрацию меченого антигена, инкубируют и после отмывки носителя от несвязавшихся компонентов регистрируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов. Величина детектируемого сигнала находится в обратной зависимости от концентрации антигена.

Преимуществом прямой схемы является небольшое число стадий, что позволяет легко автоматизировать анализ. К недостаткам схемы относятся сложность методов синтеза ферментных конъюгатов, а также возможное влияние компонентов образца на активность фермента.

В непрямом конкурентном формате ИФА используются меченные ферментом антитела (специфические или вторичные) и иммобилизованный на твердой фазе конъюгат антиген-белок-носитель.

Непрямая схема с использованием меченых антивидовых антител является одной из наиболее распространенных схем ИФА. На поверхности носителя иммобилизуют конъюгат антиген-белок, к которому добавляют раствор, содержащий определяемый антиген и фиксированную концентрацию немеченых специфических антител, инкубируют и после удаления несвязавшихся компонентов добавляют фиксированную концентрацию меченых антивидовых антител. После инкубации и отмывки носителя детектируют ферментативную активность образовавшихся на твердой фазе специфических иммунных комплексов, причем величина сигнала находится в обратно-пропорциональной зависимости от концентрации определяемого антигена.

Применение универсального реагента – меченых антивидовых антител – даёт возможность выявлять антитела к разным антигенам. Кроме того, анализируемый образец и меченый реагент вводятся в систему на разных стадиях, что устраняет влияние различных эффекторов, содержащихся в образце, на каталитические свойства ферментной метки. Однако такая схема анализа усложняет его проведение из-за введения дополнительных стадий.

Как любые иммунохимические методы анализа, ИФА может давать ложноположительные и ложноотрицательные результаты. Например, ложноположительные результаты при определении антител к различным инфекциям могут возникнуть за счёт ревматоидного фактора, представляющего собой иммуноглобулин М против собственных иммуноглобулинов G человека; за счёт антител, образующихся при различных системных заболеваниях, нарушениях обмена или приёме лекарственных препаратов; у новорождённых такие ложноположительные реакции могут возникать за счёт образования в организме ребёнка М-антител к иммуноглобулину G матери. Помимо этого, причиной ложноположительных результатов может быть синдром поликлональной активации. При

этом, особые вещества – суперантигены – неспецифически стимулируют выработку В-лимфоцитами антител к различным инфекциям. Практически это выражается в неспецифическом нарастании титра антител сразу ко многим возбудителям.[1] Ложноотрицательные результаты при определении антител могут быть обусловлены состояниями иммунодефицита, а также техническими ошибками при постановке реакции.

Таким образом, за счёт несомненных преимуществ иммуноферментного анализа: удобства в работе, быстроты, объективности за счёт автоматизации учёта результатов, возможности исследования иммуноглобулинов различных классов (что важно для ранней диагностики заболеваний и их прогноза) в настоящее время является одним из основных методов лабораторной диагностики.

В последнее время в диагностике вирусных болезней человека и животных стали применять методы, основанные на использовании в качестве метки антигенов и антител ферментов. Эта группа методов носит название иммуноферментного анализа (ИФА).

Накопилось много примеров, свидетельствующих о широких возможностях использования ИФА в различных областях медицины, сельского хозяйства, промышленности и контроля окружающей среды. Однако основные направления применения ИФА: ранняя диагностика инфекционных, онкологических и других болезней, проведение массовых эпидемиологических и эпизоотологических исследований, контроль качества продукции и соблюдение санитарных норм на предприятиях медицинской, микробиологической и пищевой промышленности.

ИФА используется для выявления и идентификации вируса и антител к нему (у животных – реконвалесцентов) или исследования уровня поствакцинальных антител.

Иммуноферментный метод основан на взаимодействии антигена и антител, где в качестве метки в конъюгате (комплекс антитела или антигена с ферментом) используется фермент пероксидаза или другие и соответствующая им субстратная смесь (5-аминосалициловая кислота и пероксид водорода или ортофенилендиамин и пероксид водорода). По чувствительности этот метод в 100 раз и более превышает РНГА, РДП и др. Предел чувствительности иммуноферментного метода достигает 10 нг/мл специфического белка.

Различают две разновидности иммуноферментного метода: гомогенный и гетерогенный. Гетерогенный метод в литературе описан под названием иммуносорбентного – ELISA-теста и РЭМА – реакции энзиммеченых антител (или антигенов), адсорбированных на поверхности водонерастворимых полимерных материалов. При гомогенном иммуноферментном методе не используется твёрдая фаза. Гомогенный иммуноферментный метод в основном предназначен для определения низкомолекулярных антигенов (гормонов, лекарственных препаратов).

Для выполнения твердофазного иммуноферментного метода необходимы определенные компоненты.

1. Специфические иммуноглобулины (выделяют из гипериммунной сыворотки осажденным сульфатом аммония с последующей очисткой).

2. Антивидовые глобулины (выделяют из антивидовых сывороток осажденным сульфатом аммония с последующей очисткой).

3. Белок А (выделяют из золотистого стафилококка) или бычий сывороточный альбумин.

4. Антиген (готовят из органов зараженных животных). Заведомо положительные и отрицательные антигены.

5. Фермент пероксидаза (выделяют из хрена).

6. Конъюгаты (пероксидаза, связанная с антителами или антигеном методом периодатного окисления).

7. Субстратная смесь (5-аминосалициловая кислота и пероксид водорода или ортофенилендиамин и пероксид водорода).

8. Детергент (поверхностно-активные вещества: твин-20, -80, тритон х-100, сорбиталь с-20).

9. Иммунологический планшет (планшет из прозрачного полистирола).

10. Шприц-дозатор (для разлива ингредиентов реакции). На

биофабриках и в лабораториях научно-исследовательских институтов готовят диагностические наборы.

Существуют прямой и непрямой методы постановки этой реакции. На практике в основном используют непрямой метод.

#### **Постановка ИФА.**

**Иммуноферментный метод определения антигена.** Перед постановкой реакции лиофилизированные компоненты растворяют в объеме, указанном на этикетке, 0,01 М раствором фосфатного буфера или дистиллированной водой и доводят до объема рабочих разведений. Объем компонентов, вносимых поэтапно в лунки планшета составляет 0,1 мл.

1. Сенсибилизация планшета. В лунки планшета вносят специфические антитела (иммуноглобулины) в рабочем разведении, указанном на этикетке. Планшет с антителами инкубируют в термостате при 37° С в течение 3 ч или при 4° С в течение 18 ч. По окончании инкубации проводят отмывку планшета раствором фосфатного буфера, содержащим твин, 3...4 раза предварительно встряхнув содержимое лунок. Остатки раствора удаляют постукиванием о фильтровальную бумагу.

2. Внесение антигенов. В лунки планшета, сенсибилизированные специфическими антителами, вносят контрольные положительные и отрицательные антигены и исследуемую пробу в разведении от 1 : 10 до 1 : 1280, инкубируют в термостате при 37° С в течение 1 ч. По истечении срока инкубации проводят трехкратную отмывку лунок планшета от несвязавшихся с антителом антигенов и подсушивают на фильтровальной бумаге.

3. Внесение пероксидазного антивидавого конъюгата в рабочем разведении с целью выявления комплекса «антиген + антитело». Залитые планшеты помещают в термостат при 37° С на 1 ч. Затем лунки планшета трехкратно отмывают физиологическим раствором и подсушивают.

4. Внесение субстратной смеси. Для проявления реакции в лунки планшета вносят раствор субстрата (индикатора пероксидазы) – ортофенилдиамина, к раствору которого добавляют 3%-й раствор пероксида водорода для выявления комплекса «антиген + антитело + конъюгат». Планшеты закрывают и оставляют в темном месте при комнатной температуре на 15...30 мин.

5. Учет реакции проводят визуально или спектрофотометрически. При визуальной оценке реакции учет проводят по 4-плюсовой системе:

(+++++) – интенсивное оранжевое окрашивание; (++++) – оранжевое окрашивание; (++) – бледно-оранжевое окрашивание; (+) – желтое окрашивание.

Пробу считают положительной при оценке в два креста (++) и более. За титр антигена принимают то ее наивысшее разведение, при котором в реакции со специфическим антителом наблюдается бледно-оранжевое окрашивание

(++), значительно превосходящее по интенсивности окрашивание контрольных лунок планшета.

При спектрофотометрическом учете результатов реакции проводят расчет коэффициента специфичности, который равен отношению оптической плотности (ОП) продукта реакции в лунках с контрольным положительным антигеном (ОП<sub>1</sub>) к оптической плотности субстратной смеси в лунках с контрольным отрицательным антигеном (ОП<sub>2</sub>). Реакцию считают положительной, если коэффициент специфичности не ниже 2,1, и отрицательной, если ниже 2,1.

Постановка иммуноферментного метода для обнаружения (или титрования) антител такая же, как при обнаружении и идентификации вируса антигена, но с той разницей, что материалом служит исследуемая сыворотка крови.

**Иммунофлюоресцентный метод, реакция иммунофлюоресценции (РИФ)** – метод выявления специфических Аг (Ат) с помощью Ат (Аг), конъюгированных с флюорохромом. Он обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Применяется для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний (идентификация возбудителя в исследуемом материале), а также для определения Ат, поверхностных рецепторов, маркеров лейкоцитов (иммунофенотипирование) и других клеток. *Прямая РИФ* состоит в обработке среза ткани, мазка из патологического материала или микробной культуры специфическими Ат, конъюгированными с флюорохромом; препарат промывают для освобождения от несвязанных Ат и исследуют в люминесцентном микроскопе. В положительных случаях по периферии объекта появляется светящийся иммунный комплекс. Необходим контроль для исключения неспецифического свечения. При *непрямой РИФ* на первом этапе срез ткани, мазок обрабатывают нефлюоресцирующими специфическими антителами, на втором – люминесцирующими антителами к γ-глобулинам того животного, сыворотка которого была применена на первом этапе. В положительном случае образуется светящийся комплекс, состоящий из Аг, Ат к нему и Ат против Ат (сэндвич-метод).

**Иммунохроматографический метод** основан на ИФА. Но все диагностические компоненты сорбированы на специальном носителе. Исследуемый материал (в объеме порядка 10 мкл) помещается на один из концов этого носителя и всасывается в него, при соответствии антител исследуемого материала и диагностических компонентов (т. е. антигенов возбудителя) происходит их связывание, проявляющееся окрашиванием полосы носителя. В настоящее время данный метод применяется в качестве экспресс-диагностики инфекционных заболеваний, а также для определения ряда гормонов.

#### **Задания:**

- 1 Зарисовать схемы постановки иммуноферментного анализа и реакции иммунофлуоресценции.
- 2 Зарисовать демонстрационные препараты иммунохроматографического определения вирусных антигенов.

#### **Вопросы для самоконтроля знаний**

- 1 ИФА, сущность, компоненты, реакции?
- 2 РИФ, сущность, компоненты реакции?
- 3 Иммунохроматографический метод, сущность, постановка?

### **Лабораторная работа** **Молекулярно-генетический метод диагностики**

#### **Цель занятия:**

1. Ознакомить студентов с сущностью полимеразной цепной реакции, ее компонентами и методами постановки.

**Оборудование и материалы.** диагностикум для ПЦР на любую вирусную инфекцию, включающий все необходимые реактивы и материалы; амплификатор, микроцентрифуга типа Эппендорф ( $10...12 \text{ мин}^{-1}$ ); камера для электрофореза в гелях и источник напряжения до 100 В/1000 мА/200 Вт; трансиллюминатор ультрафиолетовый; встряхиватель пробирок типа Эппендорф (<Вортеко>); настольный микротермостат для пробирок типа Эппендорф; штатив для пробирок типа Эппендорф; автоматические пипетки на 1...10, 5...40, 40...200 и 200... 1000 мкл; одноразовые наконечники к автоматическим пипеткам; пробирки типа Эппендорф на 1,5, 0,5 и 0,2 мл; pH- метр; аналитические весы; спектрофотометр или спектрофлуориметр; фотоаппарат; лабораторный вакуумный насос.

ПЦР - это осуществляемая *in vitro* специфическая амплификация нуклеиновых кислот, иницируемая синтетическими олиго-нуклеотидными праймерами;

В литературе очень часто встречается такое образное описание ПЦР: это метод, с помощью которого ученые могут находить иголку в стоге сена и затем строить стог из этих игл. В принципе, очень точное описание. Если продолжать сравнение, то игла – это небольшой участок генетического материала микроорганизма, а стог сена – это организм человека, в котором данный микроорганизм поселился

ПЦР проводят в циклаторе или *амплификаторе* – приборе, в котором циклично автоматически выполняется заданный режим смены температур, позволяющий многократно последовательно проходить 1, 2, 3 стадии.

ПЦР-цикл состоит из тепловой денатурации ДНК, ее отжига с праймером и удлинения цепи (элонгации); смена этих этапов происходит в результате простого изменения температуры. Праймеры при этом ориентируются на матрице так, что число раундов репликации растет экспоненциально, соответственно увеличивается и число копий специфической нуклеотидной последовательности.

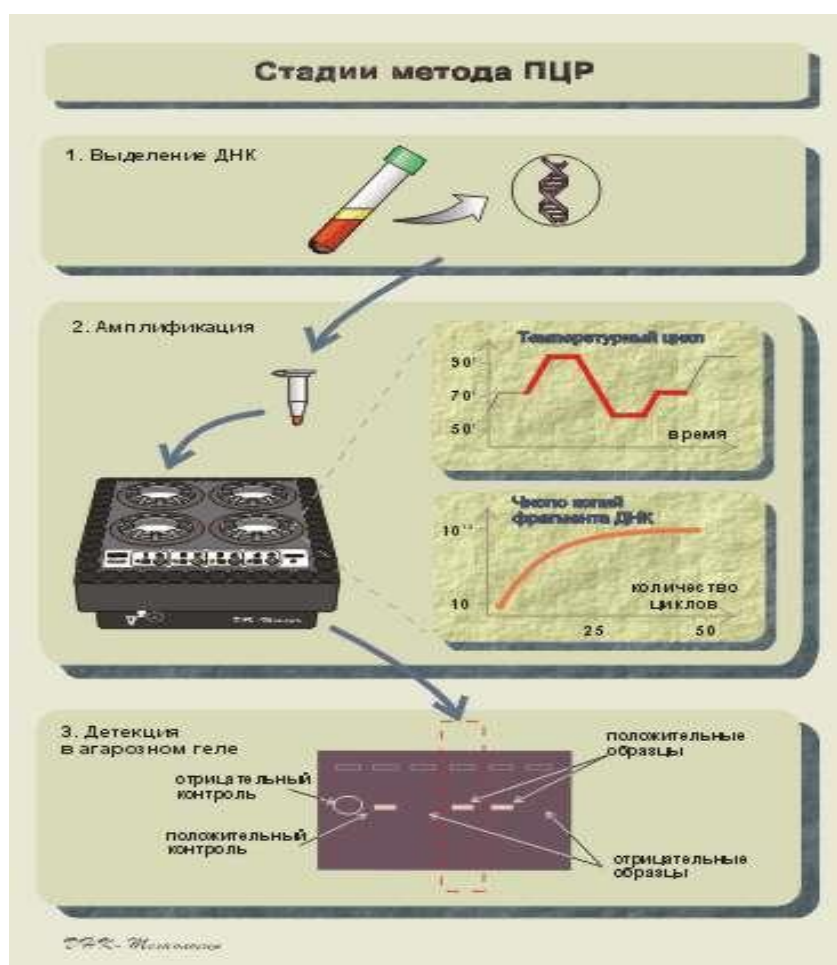
Учёт реакции проводят с помощью электрофореза в агарозном геле. Отрицательно заряженные молекулы ДНК движутся в геле под действием электрического поля от катода к аноду, при этом длина пробега фрагментов ДНК за определенный промежуток времени зависит от их размера. ДНК

в геле окрашивают бромидом этидия, что делает ее видимой в ультрафиолетовом свете. Если в исследуемой пробе в результате ПЦР накопились ампликоны (фрагменты ДНК одинакового размера), то они окажутся на одном расстоянии от старта и будут видны как полоса на гелевой дорожке. Если положение полосы на гелевой дорожке соответствует расчётной для использованной пары праймеров, т.е. находится на том же расстоянии от старта, что полоса положительного контроля, то это означает, что результат исследования положительный.

Как и в каждом эксперименте при учёте результатов ПЦР предусматривают контроли – положительный и отрицательный. Любая диагностическая тест-система должна иметь утверждённый регламент, который включает наличие упомянутых контролей.

Положительный контроль – это образец с ДНК-матрицей для накопления специфического ампликона, соответствующего определяемому микроорганизму.

Отрицательный контроль - вода, ДНК человека или ДНК микроорганизмов, близкородственных определяемому данной тест-системой.



## Принцип полимеразной цепной реакции (ПЦР)



Принцип работы. За генетическую информацию в живом организме любого размера отвечает ДНК – двухспиральная дезоксирибонуклеиновая кислота, состоящая из последовательности четырех нуклеотидов, которые принято обозначать буквами А (аденин), Г (гуанин), Т (тимидин) и Ц (цитозин). Одно из основных правил генетики – правило комплементарности, то есть нуклеотиды соседних спиралей ДНК соединяются только в определенном порядке: А с Т, Г с Ц, и никак иначе.

У каждого живого создания (бактерия, вирус, рыба, зверь) – своя ДНК, причем для выявления конкретного организма достаточно иметь лишь небольшой участок этого хранилища генетической информации. Некоторые виды микроорганизмов, например, вирус иммунодефицита человека, хранят генетическую информацию в другой нуклеиновой кислоте – РНК, но и ее фрагменты можно находить с помощью ПЦР.

Именно на обнаружении этого небольшого, но уникального для каждого отдельного организма участка и построен принцип ПЦР. Для каждого возбудителя создан свой специфический генетический детектор, эталонный фрагмент ДНК, который по принципу комплементарности точно обнаруживает «свой» фрагмент ДНК и запускает реакцию создания огромного количества его копий.

Молекулярная диагностика, вообще, и ПЦР в частности, основаны на определении наличия в исследуемом образце специфических нуклеиновых кислот, чаще всего ДНК.

ДНК – двунитевая (двуцепочечная) полимерная молекула, последовательность нуклеотидов в которой и определяет все свойства организма. При делении клеток ДНК удваивается, и в каждую из двух дочерних клеток попадает точная копия генетического материала родительской клетки. Удвоение молекулы ДНК называется репликацией. На двух исходных (матричных) цепях ДНК строятся новые дочерние цепи (комплементарные матричным). Репликация обеспечивается ферментативным комплексом, ключевым элементом которого является ДНК-полимераза. Для того, чтобы ДНК-полимераза сумела начать репликацию ей, помимо матрицы, необходима затравка (праймер) – небольшой фрагмент ДНК, комплементарно связанный с матрицей. Эту затравку ДНК-полимераза как бы удлиняет, строя новую цепь ДНК на имеющейся матрице. В норме в природе реплицируется вся ДНК, находящаяся в клетке или вирусе, и продуктом этого процесса являются две идентичные копии исходной ДНК.

Теперь, когда мы вкратце вспомнили самое главное о репликации, можно перейти к описанию полимеразной цепной реакции. ПЦР была открыта в 1983 году и в настоящее время широко применяется для научных и практических исследований, в области диагностики инфекционных и генетических заболеваний, ранней диагностики некоторых онкологических патологий. За открытие этого метода Кэри Мюллис в 1995 году был награжден самой престижной научной наградой – Нобелевской премией.

В ходе этой реакции тоже реплицируется ДНК, но не так, как обычно в природе. Во-первых, реплицируется не вся ДНК микроорганизма, а только ее небольшой фрагмент (мишень).

Во-вторых, продуктом ПЦР являются не две, а миллионы копий исходной мишени. Такая многократная репликация называется амплификацией.

У разных родов и видов бактерий, а также у вирусов, генетические тексты (нуклеотидные последовательности ДНК) различаются. Современные компьютерные программы содержат банк данных о расшифрованных последовательностях ДНК различных организмов. При разработке диагностической ПЦР-тест-системы находят небольшой фрагмент ДНК (мишень), строго специфичный для конкретного возбудителя. С помощью ПЦР амплифицируют именно этот участок и затем идентифицируют продукт амплификации (ампликон) методом электрофореза в агарозном геле.

Выявляя специфический для данного микроорганизма фрагмент ДНК, тем самым определяют микроорганизм.

### **Каждый цикл диагностики инфекций проходит в три стадии**

1. Присоединение (отжиг) праймеров. Для начала процесса репликации в ПЦР используют праймеры - короткие одноцепочечные ДНК (длиной 15-30 оснований), которые добавляют в избытке в реакционную смесь. Они специфично (по принципу комплементарного спаривания) присоединяются к коротким участкам, ограничивающим выбранную мишень. Эта стадия не является ферментативной и проходит в процессе инкубации реакционной смеси при 55-65<sup>0</sup>С. Праймеры присоединяются только к выбранным специфичным для данного возбудителя фрагментам ДНК и не взаимодействуют ни с какими другими последовательностями ДНК (а в клинической пробе очень много ДНК, как человека, так и различных микроорганизмов). Именно этим обеспечивается абсолютная специфичность диагностической ПЦР-тест-системы. Избыточное количество ДНК праймеров по отношению к матричной ДНК обеспечивает высокую чувствительность метода. То есть праймеры в исходном для ПЦР растворе со 100% вероятностью найдут мишень для присоединения.

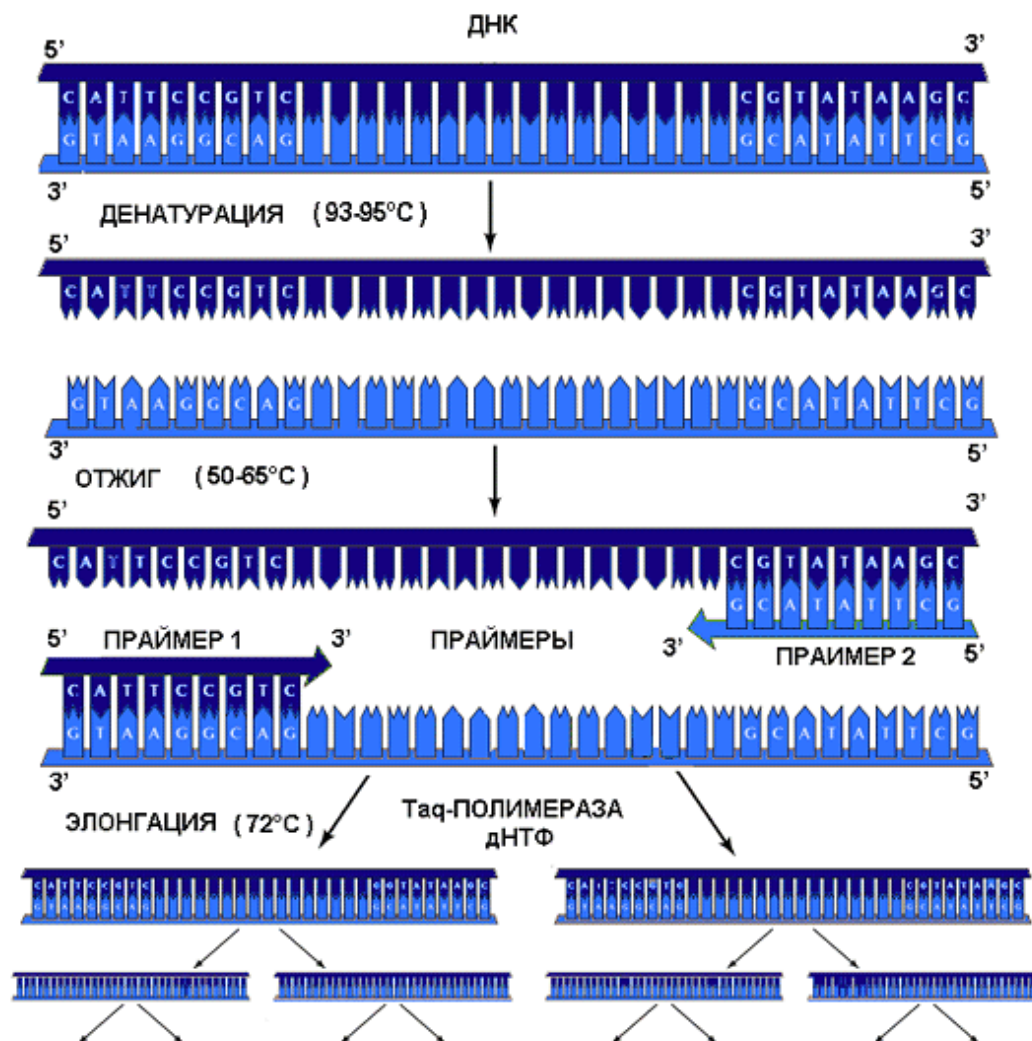
Денатурация - расплетение цепей двунитевой ДНК - не ферментативный процесс, который идет при температуре 95<sup>0</sup>С.

2. В результате присоединения праймеров образуются структуры [ДНК-матрица + праймер], являющиеся «затравочными» комплексами. Начинается достраивание праймеров, начиная с 3'-концов, путём комплементарного синтеза на матрицах одноцепочечных фрагментов ДНК. Этот процесс осуществляется с помощью специального фермента - Таq-полимеразы (термоустойчивой ДНК-полимеразы) и нуклеотидов (в качестве строительного материала).

Вновь синтезированные двуцепочечные ДНК после стадии денатурации [1] снова связывают праймеры, которые находятся в смеси в избытке [2]. Полученные структуры после достраивания [3] образуют специфические фрагменты ДНК, ограниченные последовательностями праймеров. Таким образом, даже если исходной для ПЦР была только одна молекула ДНК, то в течение 25 – 40 циклов происходит амплификация, т.е. синтезируется большое количество (108-109 копий) специфических фрагментов ДНК (ампликонов), достаточное для визуального учета результата реакции после электрофореза в агарозном геле.

Один цикл ПЦР длится около трех минут, количество копий растет в геометрической прогрессии. Таким образом, за несколько часов количество фрагментов увеличивается в несколько миллиардов раз. Понятно, что теперь определить, какой возбудитель у данной конкретной инфекции, достаточно легко.





Достоинства.

- **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.
- **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.
- **чувствительность** – возможно найти всего один фрагмент генетического материала возбудителя.
- **оперативность** – постановка реакции занимает несколько часов, таким образом, вся диагностика, от момента сдачи материала на анализ до получения результата, отнимет всего один день.
- **определение 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

Безусловно, ПЦР не идеальный метод, имеются и свои недостатки. Но они напрямую связаны с его достоинствами и с так называемым «человеческим фактором». ПЦР – очень высокотехнологичный метод, требующий соблюдения строжайших правил оснащения лаборатории. Достаточно сказать, что в помещении должен быть установлен фильтр биологической очистки со степенью



99,9%. Это связано с тем, что в воздухе постоянно присутствует невероятный коктейль из фрагментов ДНК всевозможных живых организмов, и в процессе подготовки к проведению реакции образец может быть загрязнен – возможно «ложное срабатывание».

Предложенный метод позволяет с высокой точностью диагностировать инфекционные болезни животных. Он считается самым лучшим методом диагностики вирусов и бактерий. Специфичность, высокая чувствительность, простота и удобство проведения анализа, сравнительно небольшие затраты времени, низкая стоимость анализа являются признанными достоинствами метода. Разработаны наборы ПЦР для диагностики КЧС, диареи, инфекционного ринотрахеита, африканской чумы лошадей, болезни Ньюкасла, ящура, инфекционного бронхита кур и других инфекционных болезней.

Оценивать результаты ПЦР должен практический врач, который лечит конкретного больного. Дело в том, что далеко не всегда положительный ответ ПЦР означает наличие заболевания. Например, человек пролежал от какого-либо заболевания, но погибший и уже не опасный возбудитель будет еще некоторое время «разбираться на запчасти» защитной системой организма. Если в этот момент сделать ПЦР – результат окажется положительным.

Другой вариант – это отрицательный результат ПЦР при наличии даже явной клинической картины. Одна из наиболее возможных причин – материал для исследования был взят «не оттуда». Образец должен брать квалифицированный врач, строго следуя инструкции, которую ему дает лаборатория.

### **Задания.**

Изучить сущность ПЦР, методику постановки, применение в вирусологии.

### **Контрольные вопросы.**

1. В чем принцип и сущность ПЦР?
2. Какие компоненты участвуют в этой реакции?
3. Какова техника постановки метода?
4. Как учитывать результаты этой реакции?

### **Библиографический список.**

1. Колычев, Н. М. Ветеринарная микробиология и микология [Электронный ресурс]: учебник для студентов вузов, обучающихся по специальности 111801.65 — «Ветеринария» / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. - СПб. ; М. ; Краснодар : Лань, 2014. - 624 с. – Режим доступа: <http://e.lanbook.com/view/book/39147/>

2. Частная ветеринарно-санитарная микробиология и вирусология [Электронный ресурс] : [учебное пособие для студентов вузов, обучающихся по направлению подготовки 111801 Ветеринария : допущено УМО вузов РФ по образованию] / Р. Г. Госманов [и др.]. - Уфа : [б. и.], 2013. - 293 с. – Режим доступа: <http://biblio.bsau.ru/metodic/21080.pdf>

3. Колычев, Н. М. Ветеринарная микробиология и микология [Электронный ресурс] : учебник / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. - Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2014. - 624 с. - (Учебники для вузов. Специальная литература). - Библиогр.: с. 615-616. - ISBN 978-5-8114-1540-3 Допущено Министерством сельского хозяйства РФ в качестве учебника для студентов высших аграрных учебных заведений, обучающихся по специальности 111801.65 — «Ветеринария» Режим доступа: [http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1\\_id=39147](http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=39147)

4. Госманов, Р. Г. Ветеринарная вирусология [Текст] : учебник для студ. Вузов, обуч. По спец. 111201 «Ветеринария» / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев. – 2-е изд., перераб. И доп. – М. : КолосС, 2006.





