

Министерство сельского хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь

Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины

Р. Г. Кузьмич, Д. С. Конотоп

**ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ СВИНЕЙ, ВЫЗЫВАЕМЫХ
ВИРУСАМИ ПРОСТОГО ГЕРПЕСА 1,2 ТИПОВ**

Методические рекомендации

Витебск
ВГАВМ
2019

УДК 619:616.98:578.825.1-07:636.4
ББК 48.439.133
К89

Утверждены Департаментом ветеринарного и продовольственного
надзора Министерства сельского хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь 27.07.2018 г., №03-02/24

Авторы:

доктор ветеринарных наук, профессор [^]. Г. Кузьмич;
ассистент кафедры эпизоотологии, [^]. С. Конотоп

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, профессор В. С. Прудников;
доктор ветеринарных наук, профессор И. А. Красочко

Кузьмич, Р.Г.

К89 Диагностика болезней свиней, вызываемых вирусами простого герпеса 1,2 типов : методические рекомендации / Р. Г. Кузьмич, Д.С. Конотоп. - Витебск: ВГАВМ, 2019.- 24 с.

Рекомендации предназначены для ветеринарных врачей и биотехнологов, а также слушателей ФПК и ПК, специалистов АПК и для студентов ветеринарной академии.

УДК 619:616.98:578.825.1-07:636.4
ББК 48.439.133

© УО «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной
медицины», 2019

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Общие положения	5
Лабораторная диагностика	7
Дифференциальная диагностика	12
Результаты исследований в Республике Беларусь	12
Практические предложения	13
Приложения	15
Литература	22

Введение

Болезни органов размножения и молочной железы у свиноматок имеют широкое распространение и проявляются нарушениями половой цикличности, оплодотворяемости, бесплодием и малоплодием, абортами и мертворождаемостью поросят, первичной слабостью родов, задержанием последа, синдромом метрит-мастит-агалактии (ММА), острым и хроническим эндометритом, маститом, агалактией (гипоагалактией) и др. Непосредственной причиной болезней органов размножения и молочной железы воспалительного характера является размножение в матке и молочной железе свиноматок различных микроорганизмов (бактерий, микоплазм, вирусов и т.п.) как в отдельности, так и в ассоциациях на фоне снижения у животных общей и местной неспецифической резистентности с последующей интоксикацией организма. Главная причина усложнения течения болезней - это постоянная эволюция микроорганизмов (особенно вирусов), в ходе которой структура инфекционной патологии изменяется в неблагоприятную сторону. Происходит тесное взаимодействие вирусов, их совместное влияние на иммунную систему свиней, что приводит к активизации вторичной микрофлоры. Многие вирусы приспособляются к «пожизненной» персистенции в организме, вследствие чего часто вызываемые ими заболевания протекают бессимптомно и вовремя не выявляются ветеринарными специалистами.

В своих исследованиях мы ставили задачу изучить роль герпесвирусов (ВПГ 1,2 типов) в возникновении патологии репродуктивной системы у свиней, так как у людей данные вирусы изучены подробно, а у животных данная болезнь изучалась недостаточно. Не стоит забывать о том, что вирусы данного семейства очень широко распространены у людей и имеют родство с вирусами, вызывающими заболевания животных (болезнь Ауески, инфекционный ринотрахеит, цитомегалия поросят и т.д.). В Республике Беларусь герпесвирусную инфекцию как заболевание официально не регистрируют, что связано со слабой изученностью вопросов эпизоотологии, диагностики и мер борьбы. До сих пор остается неизученной роль вирусов простого герпеса 1,2 типов (**имеют выраженное антигенное родство с вирусом болезни Ауески**) в акушерско-гинекологической патологии у свиней; эпизоотические особенности (распространенность, вирусоносительство, пути выделения, сезонность и т.д.), которые имеют большое значение для планирования и проведения санитарно-оздоровительных мероприятий.

Впервые в Республике Беларусь установлена этиологическая роль вирусов простого герпеса 1,2 типов (ВПГ 1,2 типа) в акушерско-гинекологической патологии у свиней. Проведены многочисленные исследования, в результате которых был апробирован и разработан комплекс диагностических, профилактических и ветеринарно-санитарных мероприятий.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Герпесвирусная инфекция - инфекционная болезнь свиней, характеризующаяся латентным течением, проявляющаяся прохолостами, малоплодием, рождением нежизнеспособного молодняка, иногда абортами на последних сроках беременности, синдромом ММА, эндометритами. К заболеванию также восприимчив и человек.

Болезнь наносит экономический ущерб, который складывается из недополучения поросят, рождения слабых, мертворожденных поросят, преждевременной выбраковки свиноматок, затрат, связанных с проведением мероприятий по профилактике и ликвидации заболевания.

Этиология болезни.

Возбудителем болезни являются вирусы семейства *Herpesviridae*, преимущественно вирусы простого герпеса 1,2 типов (ВПГ 1,2 типа или ШУ 1,2 - *herpes simplex virus 1,2 type*). Герпесвирусы состоят из линейной 2-нитчатой ДНК, вирионы диаметром 120-150 нм. Существует два серологических типа ВПГ (1 и 2). Они имеют общие (gB и gD) и типоспецифические (gC и gG) антигены. Данные вирусы характеризуются относительно коротким репликативным циклом (менее 24 ч), быстрым разрушением зараженных клеток и способностью существовать в латентной форме преимущественно в нервных ганглиях.

По устойчивости к химическим дезинфицирующим средствам герпесвирусы относятся к первой группе (малоустойчивые). Инактивируется под действием основных дезинфектантов, в обычной концентрации. Наибольший эффект достигается при использовании электроактивированных растворов, хлорсодержащих препаратов, кислот, эфира, этилового спирта.

Эпизоотологические данные.

К герпесвирусной инфекции восприимчивы свиньи, в основном свиноматки, после достижения физиологической половозрелости. Устойчивость поросят до 2-3- месячного возраста объясняется колостральным иммунитетом. Однако при заражении во время родов (при прохождении через ротовые пути или с околоплодными водами) может отмечаться вирусоносительство, при одновременной циркуляции противовирусных антител. Дополнительно у поросят может отмечаться наложение цитомегаловирусной инфекцией, также вызываемой вирусами из семейства *Herpesviridae*. Возможные пути передачи и опасность для человека герпесвирусов, циркулирующих у свиней и вызывающих инфекции животных, до сих пор недостаточно изучены из-за отсутствия достоверных эпидемиологических данных. Не исключаются случаи заражения работников и ветеринарных специалистов свиноводческих хозяйств, предприятий перерабатывающей и биологической промышленности.

Источником возбудителя инфекции являются латентно больные, переболевшие и вирусоносители.

Передача возбудителей возможна через предметы ухода, корм, воду,

контаминированные возбудителем, чаще всего при загрязнении выделениями из половых путей, околоплодными водами. Отмечается вертикальный путь передачи, инфицирование происходит во время родов (контакт с родовыми путями матери), трансплацентарно или через цервикальный канал в полости матки. Вертикальная передача вируса наиболее вероятна после разрыва околоплодных оболочек.

Сезонность не выражена, заболеванию свойственна стационарность, обусловленная длительной персистенцией возбудителя в организме и бессимптомным вирусоносительством.

Герпесвирусная инфекция достаточно редко протекает как моноинфекция, чаще всего регистрируются ассоциированное течение с микоплазмозом, уреоплазмозом, гепатитом Е, реже - с парвовирусной инфекцией, репродуктивно-респираторным синдромом свиней. Вследствие снижения иммунитета, угнетения барьерной функции печени также происходит развитие, активизация вирусов простого герпеса 1,2 типов и сопутствующей условно-патогенной микрофлоры.

Интенсивность эпизоотического процесса характерна для спорадий и/или энзоотий.

Течение и симптомы.

Распространение ВПГ 1,2 типов в организме, после его проникновения через кожу или слизистые, происходит лимфогематогенным и/или неврогенным путем. При лимфогематогенном пути заражения более важную роль, по сравнению с эритроцитами, играют лейкоциты.

По мнению многих авторов, значение последних заключается в защите вируса от клеток макрофагального ряда при его миграции в сенсорные паравертебральные ганглии. Достигнув их, вирус переходит в латентное состояние, где и персистирует пожизненно.

Под воздействием разнообразных провоцирующих факторов (стресс, интоксикация, перегревание, вакцинации и др.) возникает рецидив болезни, обусловленный реактивацией латентного вируса, что приводит к формированию рецидивирующего заболевания.

Заболевание протекает чаще всего латентно, явных, характерных клинических признаков при данной болезни не отмечается; однако выявлен ряд закономерностей. Чаще всего у животных регистрировали прохолосты; также отмечали малоплодие, рождение нежизнеспособного молодняка, иногда аборт, синдром ММА (метрит-мастит-агалактия) и эндометриты.

Патологоанатомические изменения.

При патологоанатомическом исследовании герпесвирусная инфекция проявляется эндометритами, вульвовагинитами, иногда отмечается наличие пустул на слизистой оболочке влагалища. При осложнении секундарной микрофлорой (стрептококки, стафилококки, протей, бактерии группы кишечной палочки) отмечаются кровоизлияния на серозных, слизистых оболочках, увеличение регионарных лимфоузлов. Данные

патологические изменения характерны для многих заболеваний, являются неспецифичными и не позволяют диагностировать герпесвирусную инфекцию без проведения дополнительных исследований. Однако в совокупности с другими методами исследований необходимо учитывать данные вскрытия.

При гистологическом исследовании изменения в половой системе характеризуются лимфоцитарной и лейкоцитарной инфильтрацией, метаплазией эпителия, тромбозом кровеносных сосудов, адгезией эритроцитов к стенке кровеносных сосудов, тромбозом, ишемией слизистой оболочки, кровоизлияниями.

Дополнительно регистрируются вакуоли, десквамация и дистрофия эпителия, кровоизлияния, формирование микротромбов, накопление продуктов распада клеток, разрушение мембран, в слизистой оболочке наблюдается отек сосочкового слоя.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагноз на герпесвирусную инфекцию ставится комплексно с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторного исследования.

Материалом для **серологического** исследования служат сыворотки крови от различных хозяйственных и половозрастных групп свиней.

Техника отбора. Пробы крови для биохимических исследований отбирают из орбитального венозного синуса, за 2-3 часа до кормления, используя иглы диаметром 1,2-2,0 мм и длиной 5-7 см. Полученную кровь оставляют в пробирках на 1-1,5 часа при комнатной температуре для образования сгустка. Образовавшийся сгусток отделяют от стенок пробирки тонкой спицей и центрифугируют сыворотку при 3 тыс. об./мин. в течение 5 минут. После центрифугирования, используя микропипетку и стерильные одноразовые наконечники, отсасывают полученную сыворотку в стерильные пробирки типа «Эппендорф».

Материалом для **вирусологического** исследования служат околоплодные воды, кусочки органов и плаценты, соскобы со слизистой оболочки влагалища, матки, сперма.

Подготовка исследуемого материала.

Пробы исследуемых жидкостей в объеме 10 мл (при необходимости объем проб доводят до требуемого путем добавления физиологического раствора) центрифугируют при 3 тыс об./мин. в течение 10 минут. Если осадок практически не виден, то в эту же пробирку вносят еще 10 мл материала и повторяют центрифугирование. Надосадочную жидкость осторожно сливают, оставив над осадком примерно 0,2 мл жидкости. Осадок ресуспендируют в оставшейся надосадочной жидкости и 100 мкл его используют для экстракции ДНК.

Пробы паренхиматозных органов, плодовых оболочек размером 1х1х1 см тщательно растирают в отдельных стеклянных гомогенизаторах, фарфоровых

ступках и т.п., добавляют по 1 мл (т.е. примерно равный объем) физиологического раствора и тщательно перемешивают. Смесь отстаивают при комнатной температуре в течение 30 минут, после чего верхнюю фазу переносят в пробирки типа Эппендорф и 100 мкл ее используют для экстракции ДНК.

Сперму в объеме 0,5 мл разводят равным объемом физиологического раствора, осаждают на микроцентрифуге при тыс об/мин в течение 5-10 минут, осадок, ресуспендированный в 100 мкл физиологического раствора, используют для экстракции ДНК.

Соскоб слизистых оболочек разводят в 0,5-1,0 мл физиологического раствора, осаждают на микроцентрифуге при тыс об./мин. в течение 5-10 минут. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок ресуспендируют в 100 мкл физиологического раствора и используют для экстракции ДНК. Если слизь очень густая (не всасывается в отверстие наконечника дозатора), то к пробе добавляют 1-2 мл раствора -меркаптоэтанола (0,1M), перемешивают на вортексе, выдерживают при комнатной температуре 10 минут, периодически встряхивая на вортерсе, и центрифугируют в вышеуказанном режиме. Осадок ресуспендируют в 100 мкл физиологического раствора и используют для экстракции ДНК.

Для **гистологического** исследования материал следует отбирать при убое животных в условиях санитарной бойни или мясокомбината. Отобранный материал следует поместить в емкость (стеклянная или пластиковая тара с плотно закрытой крышкой) с 10%-ным раствором формалина. Раствор формалина готовят заранее.

Техника отбора. После убоя свиноматки отделить половые органы (матка с влагалищем) в отдельную тару. Произвести продольный разрез, расправить органы и отрезать кусочки матки, влагалища, преддверия влагалища (обязательно вместе со слизистой оболочкой). Размер кусочков 1 см (до 1,5 см). Нарезанные кусочки материала поместить в емкость с 10%-ным раствором формалина на 1 сутки (для **фиксации материала**). Соотношение материал/раствор - 1:10 (1 часть материала и 10 частей раствора). На 2 сутки зафиксированные кусочки материала следует переложить в другую емкость с раствором и хранить при комнатной температуре. Соотношение материал/раствор - 1:10 (1 часть материала и 10 частей раствора).

Для гематологического исследования используют кровь от серопозитивных и серонегативных свиней различного возраста, полученную в течение не более 10-12 часов. Кровь, взятую путем венопункции (из орбитального глазного синуса), в количестве 5-10 мл помещают в сухие чистые пробирки с гепарином, из расчета 20 ЕД гепарина на 1 мл крови. После отстаивания отсасывают слой плазмы с лейкоцитами, переносят в сухую чистую пробирку и центрифугируют.

Лабораторная диагностика основана на:

а) обнаружении и идентификации вируса или его компонентов с помощью ИФАиПЦР;

б) выявлении антител в сыворотке крови животных в ИФА и др.

Иммуноферментный анализ предназначен для ранней диагностики, проведения мониторинговых обследований восприимчивого поголовья, проведения скрининговых исследований. Данный метод достаточно прост и нетрудоемок, предоставляет возможность проведения исследований большого количества проб за короткий срок. При этом высокая чувствительность, специфичность метода позволяет использовать его в диагностических учреждениях.

Для *серологической диагностики герпесвирусной* инфекции методом ИФА были использованы тест-системы ВектоВПГ - IgM-стрип и ВектоВПГ - IgG-стрип ЗАО «Вектор-Бест» (Россия, г. Новосибирск) для определения антител класса М (IgM - маркер острой инфекции) и класса G (IgG маркер латентной инфекции). Также при необходимости возможно определять титр антител.

Для постановки ИФА используют разборные планшеты на 96 лунок с иммобилизованным антигеном. Перед постановкой реакции исследуемые сыворотки разводят в 10 раз раствором для предварительного разведения сывороток во вспомогательном планшете. Необходимое количество сыворотки переносят в лунку основного планшета, куда предварительно вносят раствор для разведения сывороток. Таким образом, в лунках планшета исследуемые сыворотки разбавляются в 100 раз. В последующем добавляют пероксидазный конъюгат, цитратно-фосфатный буферный раствор и концентрат тетраметилбензидина (ТМБ). Перед добавлением очередных антигенов следует провести 5-кратную промывку планшета фосфатно-солевым буферным раствором с твином и инкубацию в термостате при $37,5^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут. На последнем этапе, после добавления раствора ТМБ и инкубации в темноте в течение 25 минут при $18-25^{\circ}\text{C}$, проводят остановку реакции добавлением стоп-реагента (раствор серной кислоты с концентрацией 1 моль/л). Реакцию учитывают с помощью спектрофотометра, путем измерения оптической плотности (ОП) на длине волны 450 нм и визуально (изменение голубого окрашивания на желтый цвет) не позднее 10-15 минут после остановки реакции.

Реакцию оценивают по превышению оптической плотности (ОП) в исследуемых пробах в сравнении с отрицательным контролем.

Положительными считают пробы, ОП которых равно или превышает критическое значение, которое вычисляли по формуле:

$$ОП_{Крит} = ОП_{рК''} + 0,10$$

Для определения титра антител перед основной реакцией проводят титрование исследуемых сывороток. В лунки верхнего ряда планшета вносят предварительно разведенные в 100 раз сыворотки крови, в остальные лунки - необходимое количество раствора для разведения сывороток. Многоканальной пипеткой переносят по 100 мкл разведенных сывороток крови из лунок верхнего ряда в лунки 2-го ряда. После перемешивания пробы из лунок 2-го ряда следует внести в лунки 3-го ряда и далее, последовательно, до последнего ряда,

откуда сбрасывают по 100 мкл содержимого лунок. Таким образом, в вертикальных рядах планшета получают последовательные 2-кратные разведения исследуемых сывороток (от 1:100 до 1:12800). Дальнейший ход анализа проводят аналогично вышеописанному для выявления положительных сывороток.

Титром считают последнее разведение исследуемой сыворотки, при котором ОПв соответствующей лунке превышает ОП_{ср}К⁻ на 0,1 о.е.

Для выяснения этиологической роли ВПГ 1,2 типов, особенно от серопозитивных животных, проводят **выделение вируса** (ВПГ 1,2 типов) с использованием ПЦР согласно методике их постановки.

Наилучший материал для исследования - соскоб со слизистой оболочки влагалища, отобранный с использованием одноразовых цитощеток. После того как стерильную щетку поместили во влагалище, необходимо сделать соскоб, затем следует поместить рабочую часть цитощетки в пробирку типа «Эппендорф» со стерильным физиологическим раствором; отрезать с помощью ножниц выступающую часть и плотно закрыть крышку. Допускается использование ватно-марлевых тампонов, смоченных в стерильном физиологическом растворе. Допускается цитощетки помещать в пробирки с транспортной средой. Транспортная среда представляет собой физиологический раствор с добавлением консерванта, который предотвращает рост посторонней микрофлоры.

Также посмертно отбирают кусочки спинного мозга, слизистой оболочки матки, влагалища, внутренние органы абортированных плодов. Кусочки тканей массой 1-2 г поместить в охлажденную фарфоровую ступку, добавить охлажденный изотонический раствор с последующим растиранием пестиком. Надсадочную жидкость поместить в стерильные микропробирки типа «Эппендорф».

В основе метода лежит амплификация специфического участка ДНК вируса простого герпеса 1,2 типов за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента Taq-полимеразы.

ПЦР-анализ проводят в три этапа в отдельных помещениях (зонах): экстракция ДНК из исследуемого материала (зона 1), проведение амплификации (зона 2), детекция продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле (зона 3). Согласно инструкции по применению тест-системы (см. приложение 2).

Дополнительным методом исследования является **гематологический** (определение количества регуляторных Т-лимфоцитов и их субпопуляций по экспрессии рецепторов к эритроцитам барана). Качественное и количественное определение Т-лимфоцитов проводят с использованием реакции спонтанного розеткообразования, с применением разных температурных режимов инкубации. Ограничением для данной методики является время постановки реакции, которую необходимо проводить не позднее 6-12 часов после отбора крови. В дальнейшем достоверность реакции резко

снижается.

Принцип метода: Т-клетки, обладающие супрессорной активностью, чувствительны к температуре и не образуют Е-розетки при + 29⁰С, тогда как Т-хелперы термостабильны. Производится одновременная постановка реакции розеткообразования с эритроцитами барана при + 4⁰С и при + 29⁰С. Затем определяют разницу между количеством Е-РОК в различных температурных режимах. Для постановки реакции используют кровь от серопозитивных и серонегативных свиней, различного возраста, полученную в течение не более 10-12 часов.

Отбор крови у барана проводят из яремной вены, двумя разными способами. В первом случае кровь отбирают в пробирку с антикоагулянтом (гепарин), с последующим хранением в стакане с водой при 4⁰С. Во втором случае цельную кровь дефибринируют в колбе со стеклянными бусами в течение 15-20 мин. аккуратно переливают в центрифужные стаканчики и центрифугируют. Надосадочную жидкость сливают и проводят процедуру отмывания осадка эритроцитов. Осадок эритроцитов после последнего центрифугирования принимают за 100%-ный, полученные эритроциты следует хранить в течение 2 недель при температуре 4⁰С в растворе Олсвера. В дальнейшем готовят 1% суспензию эритроцитов барана для постановки реакции. Для правильной постановки реакции суспензию эритроцитов необходимо проверять в камере Горяева на отсутствие конгломератов и концентрацию ЭБ (50-100 эритроцитов в 1 квадрате).

Для получения суспензии лейкоцитов следует использовать кровь, взятую путем венопункции с гепарином, из расчета 20 ЕД гепарина на 1 мл крови. После отстаивания отсасывают слой плазмы с лейкоцитами, переносят в сухую чистую пробирку и центрифугируют 10 минут при 10 тыс. об./мин. После лизиса эритроцитов и получения суспензии лейкоцитов проверяют ее в камере Горяева на их жизнеспособность. К капле суспензии клеток добавляют 1-2 капли краски 0,1% раствора трипанового синего с эозином, смешивают и подсчитывают не менее 100 клеток, определяя процент окрашенных (мертвых). В суспензиях лейкоцитов их обычно бывает не более 1-3%.

После инкубации смеси в термостате и удаления надосадочной жидкости осадок осторожно ресуспензируют, без вспенивания, оставляют на 1 мин. при комнатной температуре, а затем делают мазки на обезжиренных предметных стеклах. Мазки высушивают, фиксируют метанолом 10 минут, окрашивают азуро-эозином по Романовскому (РН - 6,8) 1-2 минут. Подсчитывают под иммерсионным увеличением количество розеткообразующих клеток на 200 лимфоцитов, считая за розетку лимфоцит, прикрепивший 3 и более эритроцитов.

У серопозитивных животных наблюдается увеличение количества Т-супрессоров и снижение количества Т-хелперов, соответственно нарушается их соотношение, что свидетельствует о недостаточности клеточного иммунитета и развитии иммуносупрессии, что является предрасполагающим фактором в развитии герпесвирусной инфекции.

Интерпретация результатов

Факт обнаружения антител в сыворотке крови не может расцениваться как показатель текущего заболевания, но свидетельствует о вирусоносительстве или латентном течении болезни. Для подтверждения диагноза необходимо провести вирусологическое исследование патматериала и выделить ВПГ 1,2 типов методом ПЦР или ПЦР в реальном времени.

Обнаружение антител в совокупности с клинико-эпизоотологическими данными свидетельствует о выделении серопозитивных животных, являющихся вирусоносителями.

Обнаружение антител при наличии характерных положительных результатов патологоанатомического и гистологического исследования свидетельствует о роли возбудителя в патологии болезней свиней, сопровождающихся акушерско-гинекологической патологией.

Совокупность обнаружения специфических антител и выделения вируса простого герпеса 1,2 типов в исследуемом материале с помощью полимеразной цепной реакции в любом из вариантов ее постановки (классическая ПЦР, ПЦР в режиме реального времени) позволяет поставить окончательный диагноз.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Болезни свиней, сопровождающиеся акушерско-гинекологической патологией, обусловленные ВПГ 1,2 типов, следует дифференцировать от парвовирусной болезни свиней, репродуктивно-респираторного синдрома свиней (РРСС), болезни Ауески, листериоза, лептоспироза, хламидиоза и малоизученных болезней - микоплазмоза, уреоплазмоза, кампилобактериоза (вибриоз).

Микоплазмоз свиней - инфекционное, чаще хронически протекающее заболевание, характеризующееся поражением преимущественно органов дыхательного и мочеполового трактов, серозных покровов и молочной железы, реже - головного мозга.

Уреоплазмоз - инфекционная болезнь, вызываемая микроорганизмами рода *Ureaplasma* и характеризующееся прохлостами свиноматок, абортами, увеличением количества мертворожденных поросят.

Кампилобактериоз (вибриоз) проявляется у свиноматок абортами, рождением нежизнеспособного молодняка, воспалением половых путей, бесплодием.

Основным в диагностике является лабораторный метод. Другие вирусные, бактериальные, инвазионные болезни, а также смешанные инфекции, сопровождающиеся абортами свиноматок и рождением мертвых поросят, диагностируют согласно соответствующим методическим указаниям.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Проведенные нами многочисленные мониторинговые исследования показали отсутствие иммуноглобулинов класса М (маркера острого течения болезни) у свиней разных половозрастных и хозяйственных групп во всех пробах.

Обнаружение иммуноглобулинов класса G регистрировали у достаточно большого процента животных, разного возраста и хозяйственной ценности. Это свидетельствует о широкой степени персистенции ВПГ 1,2 типов у свиноголовья, особенно при наличии акушерско-гинекологической патологии (34-36%). Проверка всех положительных проб на наличие антител к вирусу болезни Ауески (вызываемой также вирусом семейства *Herpesviridae*, имеющего иммунологическое родство с ВПГ 1,2 типов) и вирусу инфекционного ринотрахеита дало отрицательный результат при положительном результате исследования контрольных проб (заведомо положительных). У серопозитивных свиноматок с нарушением воспроизводительной функции высокий титр антител, свидетельствующий об активности вируса, выявлен у 18% животных.

Приведенные выше данные свидетельствуют о высокой специфичности выделения ВПГ 1,2 типов как в сыворотке крови человека, так и в сыворотке крови свиней.

Течение болезни - латентное, без явных клинических признаков. Клинические признаки неспецифичны, соответствуют другим болезням (аборты, синдром ММА и т.д.).

Инфицированность свиней ВПГ 1,2 типов на свинокомплексах Республики Беларусь составляет от 6,41% до 11,54%. Выделение герпесвирусов из биологического материала, отобранного прижизненно и посмертно - соответственно в 7,58% и 4,17% проб служит безусловным доказательством этиологической значимости данных возбудителей в патологическом процессе.

При проведении качественного и количественного определения Т-лимфоцитов с использованием реакции спонтанного розеткообразования (вариант с применением разных температурных режимов инкубации) выявлено нарушение соотношения Т-хелперы/Т-супрессоры у серопозитивных свиней. Полученные данные коррелируют с проведенными в медицине многочисленными исследованиями и свидетельствуют о недостаточности клеточного иммунитета и развитии иммуносупрессии, что является предрасполагающим фактором в развитии герпесвирусной инфекции.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Для проведения скрининговых исследований с целью выяснения эпизоотической и эпидемиологической ситуации по болезням, вызываемым ВПГ 1,2 типов, необходимо проводить обследование свиноголовья серологическим методом (ИФА) с применением коммерческих тест-систем для

обнаружения иммуноглобулинов класса G, что свидетельствует о вирусоносительстве.

Для обнаружения генома ВПГ1,2 типов использовать ПЦР или ПЦР в реальном времени.

Лабораторную диагностику следует осуществлять в соответствии с нормативными документами, утвержденными МСХ и П РБ, Департаментом ветеринарного и продовольственного надзора РБ, Белгосветцентром.

Методические рекомендации по постановке серологических реакций при диагностике инфекционных болезней животных. ГУВ с ГВ и ГПИ МСХ и П РБ 03.03.2008 (№ 10-1-5/129)-«Выявление антител к вирусу болезни Ауески, вирусу репродуктивного и респираторного синдрома свиней, к парвовирусу свиней, к *Chlamydophila abortus*».

Методические указания по постановке полимеразной цепной реакции в ветеринарных диагностических лабораториях № 02-1-30/333, утв. директором Белорусского государственного ветеринарного центра от 16.12.2016.

Методические указания «Обнаружение вируса репродуктивного и респираторного синдрома свиней методом полимеразной цепной реакции» № 02-1-30/194, утв. директором Белорусского государственного ветеринарного центра от 15.12.2016.

Методические указания «Выявление антител к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота методом иммуноферментного анализа» (ИФА) № 02-1-30/155, утв. директором Белорусского государственного ветеринарного центра от 15.12.2016.

Санитарные и Ветеринарные правила «Кампилобактериоз»- Постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь и Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 14 марта 2003 г. № 34/12.

Векто ВПГ-1,2-!^С - Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов в сыворотке (плазме) крови.

Векто ВПГ-^М-Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса M к вирусу простого герпеса 1 и 2 типов в сыворотке (плазме) крови.

РеалБест ДНК ВПГ-1,2 Набор реагентов для определения ДНК вируса простого герпеса 1 и 2 типов методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Не содержит реагентов для выделения ДНК.

Набор реагентов для выявления ДНК вируса простого герпеса I и II типов (HSV I, II) в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® HSV I, II-FL».

**Методика постановки
(выдержки из инструкции по применению)**

Тест-система «ВектоВПГ-И^АС-стрип»

Диагностическая иммуноферментная система «ВектоВПГ-1§0-стрип» представляет собой набор реагентов для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу простого герпеса первого и второго типов (ВПГ-I/II) методом иммуноферментного анализа.

Тест-система предназначена для выявления иммуноглобулинов класса G к вирусу простого герпеса (ВПГ) в сыворотке (плазме) крови.

Меры предосторожности.

Для получения достоверных результатов необходимо соблюдать следующие правила:

Не смешивайте реагенты тест-системы разных серий. Не смешивайте с реагентами других производителей.

Не используйте реагенты после истечения срока годности, указанного на упаковке. Перед использованием набора доведите все реагенты до комнатной температуры (18..,25°C).

Отбирайте только то количество реагента, которое необходимо для анализа. Во избежание контаминации не возвращайте отобранный реагент обратно во флакон.

Используйте только дистиллированную или деионизованную воду и только чистую посуду. Избегайте присутствия ионов металла или окисляющих субстанций.

Не подвергайте реагенты воздействию высокой температуры.

Избегайте контаминации образцов. Используйте чистые наконечники для каждого образца или реагента.

Проводите анализ в соответствии с данной инструкцией по применению.

ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ АНАЛИЗА

Упаковку с планшетом перед вскрытием выдерживают в течение 30 минут при комнатной температуре (18.25°C) для предотвращения конденсации влаги на стрипах. Пакет открывают и переставляют на свободную рамку необходимое количество стрипов. Приготовление растворов проводят согласно инструкции.

ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

В лунки планшетов вносят контрольные образцы по схеме, предусмотренной инструкцией, в зависимости от количества исследуемых образцов. В остальные лунки вносят предварительно разведенные образцы.

Примечание. Общее время внесения контролей и исследуемых образцов не должно превышать 20 минут, иначе время инкубации различных образцов с иммуносорбентом будет значительно отличаться, что приведет к неправильным результатам.

1. Плотно прижав самоклеющую пленку, накрывают планшет и инкубируют стрипы в течение 30 ± 5 минут при температуре $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

2. По окончании инкубации удаляют содержимое лунок и промывают лунки четыре раза. При каждой промывке во все лунки добавляют промывочный буферный раствор и выдерживают в течение нескольких секунд с последующим декантированием (удалением). При каждом декантировании тщательно удаляют остатки жидкости из лунок постукиванием рамки со стрипами в перевернутом положении по фильтровальной бумаге, которую меняют после каждой операции.

Вносят по 100мкл конъюгата в каждую лунку.

3. Накрывают планшет самоклеющейся пленкой и инкубируют в течение 30 ± 2 минут при температуре $37 \pm 2^\circ\text{C}$.

4. По окончании второй инкубации удаляют содержимое лунок декантированием и промывают лунки согласно п. 2.

5. Добавляют во все лунки по 100мкл раствора ТМБ. Инкубируют в течение 10 минут при $37 \pm 2^\circ\text{C}$ или в течение 15 минут при комнатной температуре ($18.., 25^\circ\text{C}$). Следует избегать прямого попадания света на планшет.

6. Добавляют во все лунки с той же скоростью и в той же последовательности, как раствор ТМБ, по 100мкл стоп-реагента для остановки ферментной реакции. Инкубируют в течение 1-2 минут при комнатной температуре ($18. 25^\circ\text{C}$).

7. Измеряют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 450нм. Референсный фильтр устанавливают на 620-650нм, обнуляют прибор по лункам А1, А2. В случае если значение оптической плотности превышает предел линейности спектрофотометра, считывание результатов проводят при 405нм. Измерение должно проводиться в течение 15 минут после остановки реакции.

ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Определяют среднее арифметическое значение оптической плотности (ОП) в лунках с отрицательным контрольным образцом. Качество тест-системы считают удовлетворительным, если среднее значение оптической плотности отрицательного контрольного образца не превышает 0,2 о.е., а среднее значение ОП положительного контрольного образца (ОПср К+) не менее чем в 3 раза превышает ОПсрК-. Значение ОП контроля поглощения раствора ТМБ не должно превышать 0,1 о.е.

Результат считается положительным, если значение ОП в соответствующей лунке равно или превышает критическое значение (ОПкрит), которое вычисляют по формуле:

$$\text{ОПкрит} = \text{ОПср К-} + 0,10$$

При необходимости возможно проводить определение титра антител (согласно инструкции).

**Методика постановки
(выдержки из инструкции по применению)**

Наборы реагентов для выявления ДНК *HSV I* и II типов в клиническом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной и электрофоретической детекцией продуктов амплификации «АмплиСенс® 100-RHSV-430, HSV I, II-FL», варианты FEP или FRT и «АмплиСенс® HSV I, II-Eph».

Наборы реагентов предназначены для выявления ДНК *HSV I* и II типов путем амплификации специфического фрагмента ДНК данных микроорганизмов методом ПЦР.

Меры предосторожности.

Работать только в одноразовых перчатках, использовать и менять при каждой операции одноразовые наконечники для дозаторов с аэрозольным барьером. Одноразовую пластиковую посуду необходимо сбрасывать в специальный контейнер, содержащий дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания биоматериалов (например, 0,2% раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты). При работе с включенным трансиллюминатором необходимо пользоваться защитным экраном или специальной защитной маской, так как ультрафиолетовый свет вызывает ожоги лица и слизистой глаз.

Бромистый этидий является мутагеном, проникающим через кожу. При работе с ним использовать одноразовые перчатки.

Анализ проводится в три этапа в трех отдельных помещениях (зонах), согласно «Правилам проведения работ в диагностических лабораториях, использующих метод полимеразной цепной реакции», утвержденным действующими ТНПА РБ.

Все лабораторное оборудование, в том числе дозаторы, штативы, лабораторная посуда, а также все рабочие растворы должно быть строго стационарным. Запрещается их перенос из одного помещения в другое. Сотрудники, работающие в помещении для детекции продуктов амплификации (зона 3), не должны посещать помещения для обработки клинического материала (зона 1) и проведения ПЦР (зона 2). Смена верхней одежды, головных уборов, обуви и перчаток является обязательным условием при выходе из помещения для электрофоретического анализа. Поверхности столов, а также помещения, в которых проводится постановка ПЦР, должны обязательно до начала и после окончания работ облучаться ультрафиолетовым светом. Обеззараживание биоматериалов и реагентов проводят для каждой стадии отдельно, помещая одноразовую пластиковую посуду, колбы-ловушки вакуумных отсасывателей на 1 ч в специальные контейнеры, содержащие дезинфицирующее средство, которое может быть использовано для обеззараживания биоматериалов (например, 0,2% раствор натриевой соли дихлоризоциануровой кислоты).

ПОРЯДОК ПРОВЕДЕНИЯ ПЦР

ПЦР-анализ проводят в три этапа в отдельных помещениях (зонах). ЗОНА 1 - для экстракции ДНК из исследуемого материала, ЗОНА 2 - для проведения амплификации ДНК, ЗОНА 3 - для электрофоретического анализа продуктов ПЦР.

ЭТАП 1 (зона 1). Экстракция (выделение) ДНК из исследуемого материала. Объем материала для выделения ДНК - 0,1 мл.

1. Лизирующий раствор и раствор для отмывки 1 (если они хранились при температуре от 2 С⁰ до 8 С⁰) прогреть при температуре 65 С⁰ до полного растворения кристаллов.
2. Отобрать необходимое количество одноразовых пробирок (включая отрицательный и положительный контроли экстракции). Внести в каждую пробирку по 10 мкл ВКО комплексного (если для анализа будет использоваться набор с детекцией методом электрофореза) или 10 мкл ВКО- FL (если для анализа будет использоваться набор с гибридационно-флюоресцентной детекцией) и по 300 мкл лизирующего раствора. Промаркировать пробирки.
3. В пробирки с лизирующим раствором и ВКО внести по 100 мкл пробы, используя наконечники с аэрозольным барьером. В пробирку отрицательного контроля экстракции (ОК) внести 100 мкл ОК.
4. Пробы тщательно перемешать на вортексе и прогреть 5 мин. при температуре 65 °С. Процентрифугировать 5 с. при 5 тыс. об./мин. на микроцентрифуге. Если проба растворилась не полностью, процентрифугировать пробирку на микроцентрифуге 5 мин. при максимальных оборотах (12 тыс. об./мин.) и использовать для экстракции (выделения) ДНК надосадочную жидкость, перенеся ее в новую пробирку.
5. Тщательно ресуспендировать сорбент универсальный на вортексе. В каждую пробирку отдельным наконечником добавить по 20 мкл ресуспендированного сорбента универсального. Перемешать на вортексе, поставить в штатив на 2 мин. еще раз перемешать и оставить в штативе на 5 мин.
6. Осадить сорбент универсальный в пробирках центрифугированием при 5 тыс. об./мин. в течение 30 с. Удалить супернатант, используя вакуумный отсасыватель с колбой -ловушкой и отдельный наконечник для каждой пробы.
7. Добавить в пробы по 500 мкл отмывочного раствора, перемешать на вортексе до полного ресуспендирования сорбента универсального, процентрифугировать при 10 тыс. об./мин. на микроцентрифуге в течение 30 с. Удалить надосадочную жидкость, используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой и отдельный наконечник для каждой пробы.
8. Повторить процедуру отмывки раствором, удалить супернатант полностью.
9. Поместить пробирки в термостат при температуре 65 С⁰ на 5-10 мин. для подсушивания сорбента универсального. При этом крышки пробирок должны быть открыты.

10. В пробирки добавить по 100 мкл ТЕ-буфера для элюции ДНК. Перемешать на вортексе. Поместить в термостат при температуре 65⁰С на 5 минут, периодически встряхивая на вортексе.

11. Процентрифугировать пробирки на максимальных оборотах (12 тыс. об./мин.) микроцентрифуги в течение 1 мин. Надосадочная жидкость (супернатант) содержит очищенную ДНК. Пробы готовы к постановке.

ЭТАП 2 (зона 2).Проведение амплификации.

Общий объем реакции - 25 мкл, объем ДНК-пробы - 10 мкл.

В комплекте реагентов для амплификации «ПЦР-комплект» применяется «горячий старт», который обеспечивается разделением нуклеотидов и Taq-полимеразы прослойкой воска. Плавление воска и перемешивание реакционных компонентов происходит только при 95⁰С, что значительно снижает количество неспецифически затравленных реакций.

А. Подготовка пробирок для проведения ПЦР.

1. Отобрать необходимое количество пробирок с ПЦР-смесью-1-R и воском для амплификации ДНК исследуемых и контрольных проб.
2. На поверхность воска внести по 10 мкл ПЦР-смеси-2, при этом она не должна проваливаться под воск и смешиваться с ПЦР-смесью-1.
3. Сверху добавить по капле минерального масла для ПЦР (примерно 25 мкл). При использовании амплификатора с термостатируемой крышкой минеральное масло можно не добавлять.

Б. Проведение амплификации.

1. Взять подготовленные для ПЦР пробирки. Под масло или непосредственно на поверхность масла, внести по 10 мкл ДНК-проб, выделенных из клинических или контрольных проб этапа выделения ДНК.
2. Поставить контрольные реакции амплификации:
 - а) отрицательный контроль (К) - вместо ДНК-пробы внести в пробирку 10 мкл ДНК-буфера.
 - б) положительный контроль (К+) внести в пробирку 10 мкл ПКО ДНК (положительного контрольного образца ДНК), согласно паспорта к ПКО.
3. Запустить на амплификаторе программу (согласно таблицы).
4. Когда температура в ячейке амплификатора достигнет 95⁰С, поставить программу на паузу, поместить пробирки в ячейки амплификатора, закрыть крышку прибора и снять программу с паузы. Время амплификации на амплификаторе с регулированием температур по матрице примерно 2,5 часа, на амплификаторе с активным регулированием - 1 час 50 мин.
5. Рекомендуется перед постановкой в амплификатор осадить капли со стенок пробирок кратким центрифугированием на вортексе (1-3 с).
6. После окончания реакции собрать пробирки в специальный штатив и отправить в помещение для детекции продуктов ПЦР (зону 3). Пробы (образцы) после амплификации можно хранить 16 ч при комнатной температуре, в течение недели при температуре от 2⁰С до 8⁰С (однако перед проведением электрофореза необходимо нагреть пробирки до комнатной температуры для размягчения воска).

Анализ продуктов амплификации проводится разделением фрагментов ДНК в агарозном геле.

ЭТАП 3 (зона 3). Детекция продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле.

Работа с амплифицированной ДНК должна проводиться в отдельном помещении сотрудником лаборатории, не производящим манипуляций в ПРЕ-ПЦР- и ПЦР-помещении.

А. Приготовление рабочих растворов и агарозного геля.

1. Приготовить рабочий электрофорезный буфер. В мерный цилиндр влить 25 мл трисборатного буфера (ТБЕ) концентрированного с бромидом этидия, довести дистиллированной водой до 500 мл, закрыть цилиндр парафильмом и перемешать. **ВНИМАНИЕ!** Бромид этидия - канцерогенное соединение, поэтому при работе с ним следует соблюдать правила безопасности: работать только в перчатках, избегать попадания на кожу и слизистые, при попадании на кожу или слизистые тщательно промыть соответствующий участок водой. Все реагенты, содержащие этидия бромид, перед утилизацией следует подвергать специальной обработке (см. раздел «Дезактивация буфера и гелей»).

2. Агарозу для электрофореза ДНК из одного флакона пересыпать в стеклянную колбу из термостойкого стекла на 250 мл. Налить 100 мл рабочего буфера, перемешать вращением колбы и плавить в микроволновой печи до полного растворения агарозы. Время плавления агарозы в микроволновой печи мощностью 800 Вт при ее загруженности 1 колбой - 1,5 мин. Если в микроволновую печь мощностью 800 Вт ставится 5 колб с агарозой, время плавления увеличивается до 5 мин. Вынуть колбу с расплавленной агарозой из микроволновой печи, аккуратно перемешать, вращая колбу. После этого вновь поместить колбу с агарозой в микроволновую печь на 1,5 минуты (при мощности 800 Вт), довести агарозу до кипения. Вынуть колбу из микроволновой печи и остудить агарозу, вращая колбу, до 65-70°C.

3. Выровнять столик для заливки гелей, залить расплавленный гель в форму камеры. Установить гребенки, не касаясь дна формы, на расстоянии не менее 3 см друг от друга. Толщина геля должна быть около 0,6 см.

4. После полного застывания геля (30 мин, при комнатной температуре) осторожно вынуть из него гребенки, не повредив лунки. Поместить подложку с готовым гелем в камеру, лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду. ДНК, соответственно, движется к положительному. Залить в камеру готового буфера столько, чтобы он покрывал гель на 5 мм сверху.

Б. Порядок работы.

1. Пробирки с продуктами амплификации выставить в штатив последовательно, отобрать изпод слоя масла по 10-15 мкл проб и внести в лунки геля (если для нанесения разных проб используется один и тот же наконечник, то его необходимо промывать буфером из камеры после нанесения каждой пробы). В каждом ряду дорожек геля должен быть обязательно представлен K⁺ и, желательно, маркер молекулярных масс ДНК (с набором не поставляется).

2. Подключить камеру к источнику тока, соблюдая полярность (ДНК движется

к положительному электроду), и включить источник. При использовании камеры SE-2 («Хеликон», Россия) и источника питания «Эльф-4» (ЗАО «НПФ ДНК Технология») параметры источника следующие: напряжение 250 В, стабилизация по напряжению, время электрофореза 18-20 мин. Оптимальная напряженность электрического поля при этом составляет 10 В/см.

3. По завершении времени электрофореза (краситель при этом пройдет примерно половину длины геля - 1,5 см) выключить источник тока, перенести гель на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. Получить изображение геля на компьютере с помощью видеосистемы, отметив порядок нанесения, занести в базу данных.

ВНИМАНИЕ! При просматривании геля и фотографировании глаза и лицо должны быть защищены специальной маской или стеклянной пластиной!

V. УЧЕТ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

Учет результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфической полосы амплифицированной ДНК. Длина амплифицированных специфических фрагментов:

Вирус простого герпеса 1,2 типов - 430 нуклеотидных пар

Внутреннего контрольного образца - 720 нуклеотидных пар

Литература

1. Конотоп, Д.С. Герпесвирусные инфекции свиней и человека / Д.С. Конотоп, В.Ф. Багрецов // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 125-летию ветеринарии Курской области. - Курск, 2008. - С. 33-36.
2. Конотоп, Д.С. Полимеразная цепная реакция в диагностике герпесвирусной инфекции свиней/ Д.С. Конотоп // Современные технологии сельскохозяйственного производства : материалы XI Международной научно-практической конференции / Гродненский государственный аграрный университет.- Гродно, 2008. - С. 269-270.
3. Кузьмич, Р.Г. Акушерско-гинекологическая патология у свиней герпесвирусной этиологии / Р.Г. Кузьмич, Д.С. Конотоп // Актуальные проблемы ветеринарного акушерства и репродукции животных: материалы Международной научно-практической конференция, посвященной 75-летию со дня рождения профессора Г.Ф. Медведева. - Горки, 2013. -С. 473-479.



**Учреждение образования «Витебская ордена
«Знак Почета» государственная академия
ветеринарной медицины»**

Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины является старейшим учебным заведением в Республике Беларусь, ведущим подготовку врачей ветеринарной медицины, ветеринарно-санитарных врачей, провизоров ветеринарной медицины и зооинженеров.

Вуз представляет собой академический городок, расположенный в центре города на 17 гектарах земли, включающий в себя единый архитектурный комплекс учебных корпусов, клиник, научных лабораторий, библиотеки, студенческих общежитий, спортивного комплекса, Дома культуры, столовой и кафе, профилактория для оздоровления студентов. В составе академии 4 факультета: ветеринарной медицины; биотехнологический; повышения квалификации и переподготовки кадров агропромышленного комплекса; довузовской подготовки, профориентации и маркетинга. В ее структуру также входят Аграрный колледж УО ВГАВМ (п. Лужесно, Витебский район), филиалы в г. Речице Гомельской области и в г. Пинске Брестской области, первый в системе аграрного образования НИИ прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии (НИИ ПВМ и Б).

В настоящее время в академии обучается более 4 тысяч студентов, как из Республики Беларусь, так и из стран ближнего и дальнего зарубежья. Учебный процесс обеспечивают около 330 преподавателей. Среди них 170 кандидатов, 27 докторов наук, 135 доцентов и 22 профессора.

Помимо того, академия ведет подготовку научно-педагогических кадров высшей квалификации (кандидатов и докторов наук), переподготовку и повышение квалификации руководящих кадров и специалистов агропромышленного комплекса, преподавателей средних специальных сельскохозяйственных учебных заведений.

Научные изыскания и разработки выполняются учеными академии на базе Научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии. В его состав входит 2 отдела: научно-исследовательских экспертиз (с лабораторией биотехнологии и лабораторией контроля качества кормов); научно-консультативный.

Располагая современной исследовательской базой, научно-исследовательский институт выполняет широкий спектр фундаментальных и прикладных исследований, осуществляет анализ всех видов биологического материала и ветеринарных препаратов, кормов и кормовых добавок, что позволяет с помощью самых современных методов выполнять государственные тематики и заказы, а также на более высоком качественном уровне оказывать услуги предприятиям агропромышленного комплекса. Активное выполнение научных исследований позволило получить сертификат об аккредитации академии Национальной академией наук Беларуси и Государственным комитетом по науке и технологиям Республики Беларусь в качестве научной организации. Для проведения данных исследований отдел научно-исследовательских экспертиз аккредитован в Национальной системе аккредитации в соответствии с требованиями стандарта СТБ ИСО/МЭК 17025.

Обладая большим интеллектуальным потенциалом, уникальной учебной и лабораторной базой, вуз готовит специалистов в соответствии с европейскими стандартами, является ведущим высшим учебным заведением в отрасли и имеет сертифицированную систему менеджмента качества, соответствующую требованиям ISO 9001 в национальной системе (СТБ ISO 9001 - 2015).

www.vsavm.by

210026, Республика Беларусь, г. Витебск, ул. 1-я Доватора, 7/11, факс (0212) 51-68-38,
тел. 53-80-61 (факультет довузовской подготовки, профориентации и маркетинга);
51-69-47 (НИИ ПВМ и Б); E-mail: vsavmpriem@mail.ru.

Нормативное производственно-практическое издание

Кузьмич Ростислав Григорьевич,
Конотоп Денис Семенович

**Диагностика болезней свиней,
вызываемых вирусами
простого герпеса 1,2 типов**

Методические рекомендации

Ответственный за выпуск	Д.С. Конотоп
Технический редактор	Е. А. Алисейко
Компьютерный набор	Д.С. Конотоп
Компьютерная верстка	Е. А. Алисейко
Корректор	Е.В. Морозова

Подписано в печать 03.04.2019. Формат 60х84 1/16.
Бумага офсетная. Печать ризографическая.
Усл. п. л. 1,37. Уч.-изд. л. 1,28. Тираж 35 экз. Заказ 1902.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.

ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.
Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.
Тел.: (0212) 51-75-71.
E-mail: rio_vsavm@tut.by
<http://www.vsavm.by>