

К ВОПРОСУ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

П.А.Красочко

РНИУП ИЭВ им. С.Н.Вышелесского НАН Беларуси

О.Г.Новиков

Департамент Смоленской области по ветеринарии

А.Х.Амиров – ветврач-радиолог

Смоленская областная ветеринарная лаборатория

Диагностика играет решающую роль в системе мероприятий по борьбе с болезнями животных вирусной этиологии. Быстро и правильно поставленный диагноз обеспечивает успешное проведение мероприятий по ликвидации вспышек вирусных болезней, так как позволяет четко уяснить конкретную эпизоотическую ситуацию и своевременное принятие целенаправленных мер по оздоровлению поголовья крупного рогатого скота с наименьшими потерями. Обычно диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, клинических симптомов болезни, патологоанатомических изменений органов и тканей, результатов лабораторных исследований патологического материала и сывороток крови от животных. При вирусных респираторных заболеваниях особенно важную роль отводят лабораторной диагностике, так как при этих заболеваниях наблюдают сходные эпизоотические данные, клинические симптомы и патологоанатомические изменения; нередко случаи атипичных и латентных форм течения болезни, а также смешанных инфекций, когда болезнь вызвана не одним, а двумя и более этиологическими агентами (например, двумя или тремя вирусами, вирусом и бактериями, вирусом и микоплазмами).

Все методы лабораторной диагностики вирусных инфекций можно разделить на три группы:

- экспресс-методы – они основаны главным образом на быстром обнаружении в патологическом материале вируса и его антигена;
- вирусологические методы – основаны на изоляции активных форм вируса из патологического материала и его идентификация в серологических реакциях, отличающиеся длительным и трудоемким процессом исследований, но дает точный ответ о возбудителе болезни;

– методы ретроспективной диагностики – основаны на установлении динамики титра антител в парных пробах сывороток крови больных и переболевания животных и дают высокодостоверные результаты, но ретроспективно.

В проведении диагностических исследований при вирусных респираторных заболеваниях из экспресс-методов широкое применение в лабораторной практике нашли иммунофлуоресценции, иммуноферментный анализ, реакция иммунодиффузии, прямая или иммунная электронная микроскопия.

После изоляции вирусов нашли применение такие методы идентификации возбудителей как реакции нейтрализации, связывания комплемента, иммунодиффузии, иммуноферментный анализ.

На наиболее широкое применение получили ретроспективные методы серологической диагностики вирусных респираторных инфекций. Это такие диагностические методы, как реакции нейтрализации, непрямой гемагглютинации, задержки гемагглютинации, иммунодиффузии, связывания комплемента, иммуноферментный анализ.

Наиболее чувствительным и достоверным методом в диагностике вирусных инфекций является иммуноферментный анализ. Этот метод, возникший более двадцати лет назад на пересечении иммунохимии и инженерной энзимологии, стал в настоящее время одним из распространенных методов исследований. Явным преимуществом данного метода, к которому относится простота выполнения, доступность и стабильность реагентов, экспрессивность и возможность автоматизации для проведения массовых анализов, обеспечили его прочное положение в клинической биохимии, при диагностике заболеваний растений и животных, в научных исследованиях. Благодаря успехам биотехнологии иммуноферментный анализ получил интенсивное развитие, поскольку с помощью генной инженерии были получены в высокоочищенном виде малодоступные антигены, а также ферменты-маркеры и их конъюгаты с антигеном, а с помощью клеточной инженерии - моноклональные антитела с заданной специфичностью, авидностью и аффинностью.

Имуноферментный анализ был предложен в начале 70-х годов тремя независимыми группами исследователей – Engval, Portmann в Швеции, van Neamen, Schumes в Нидерландах, Rubenslen et al в США. При этом методе антиген или антитело, вступающие в иммунологическую реакцию, метится ферментом. По превращению ферментом добавляемого субстрата можно судить о количестве вступившего во взаимодействие компонента реакции

антиген-антитело. Чувствительность иммуноферментного анализа позволяет определить минимальные количества нанограммы белка антигена или антител.

Обнаружение специфических антител в физиологических жидкостях играет важную роль в клинической диагностике широкого круга заболеваний как инфекционного, так и аутоиммунного характера.

Благодаря ИФА появилась возможность проводить количественные измерения в широком диапазоне концентраций с использованием лишь единичного разведения сыворотки или плазмы. Этот метод позволяет легко различить по активности антитела, принадлежащие различным классам иммуноглобулинов. Объективность количественной оценки обеспечивается инструментальным фотометрированием: при этом интенсивность регистрируемых сигналов непосредственно коррелирует с уровнем тестируемых антител. Правильный подбор соответствующих антигенов, связанных с носителями, подходящий антииммуноглобулиновый конъюгат, содержащий ферментную метку, позволяет создать системы тестирования множества различных антигенов, основанных на одном и том же наборе манипуляций.

Постановка твердофазного ИФА на полистироловых панелях с целью выявления противовирусных антител имеет следующие стадии: иммобилизация растворимых антигенов на твердой фазе, отмывание несвязавшегося антигена буферным раствором с детергентом, связывание активных центров твердой фазы инертным белком, взаимодействие иммобилизованных антигенов с исследуемыми антителами и образование комплекса антиген-антитело, выявление данного комплекса с помощью антииммуноглобулиновой сыворотки или белка А золотистого стафилококка, меченных ферментом, выявление с помощью субстратной смеси количества связанного фермента. После прохождения реакции ее учитывают визуально или спектрофотометрически.

Для обнаружения антигенов вируса диареи в инфицированной культуре клеток предложены прямой и непрямой иммунопероксидазные тесты. При этом инфицированные культуры могут быть обнаружены как микроскопически, так и макроскопически.

Выявление антител к вирусу диареи крупного рогатого скота с помощью ИФА осуществили J.M.Nuera et al. , R.Bock et al. , C.J.Howard et al. При сравнении РН с ИФА оказалось, что ИФА выявляет значительно более высокий процент сероположительных животных - коэффициент корреляции между этими реакциями составляет 0,89.

На основе вышесказанного нами проведены исследования по использованию иммуноферментного анализа для диагностики вирусной диареи крупного рогатого скота.

Антигеном для иммобилизаций на полистироловые плашки использованы ранние белки вируса диареи крупного рогатого скота (ВК-1 № 28), репродуцированный на культуре клеток МДБК. Специфические противовирусные антитела, воздействовавшие с сорбированным на твердой фазе антигеном, выявляли мечеными пероксидазой хрена антителами против глобулинов быка в разведении 1:200. Субстрат - ортофенилендиамин с перекисью водорода. Реакцию останавливали 10%-ным раствором серной кислоты. Учет ИФА осуществлялся на спектрофотометре "Титертек-мультискан МСС/340" при длине волны 492 нм. Показателем ИФА считали DE, который является отношением показателя оптической плотности исследуемой сыворотки к показателю оптической плотности заранее отрицательной. Положительной считалась проба, при исследовании которой DE было более 2,01.

Для исследования использованы сыворотки крови от телят (163) и коров (269) из 18 хозяйств Смоленской области. В таблице представлены результаты исследований сывороток крови крупного рогатого скота на наличие антител к вирусу диареи в ИФА.

Из представленных данных видно, что антитела к вирусу диареи выявляются у животных с различной патологией, как у молодняка, так и у взрослых животных, что свидетельствует об его этиологической роли данного возбудителя при различных заболеваниях крупного рогатого скота.

Результаты исследований сывороток крови крупного рогатого скота различного клинического состояния на наличие антител к вирусу диарей в ИФА

№№ п/п	Клиническое состояние животных	Количество исследованных проб	Результат ИФА (ΔЕ)	
			Количество	Процент
Коровы				
1	Клинически здоровые	38	12	31,6
2	Множественно перегуливающие	41	37	90,2
3	Абортировавшие	29	25	86,2
4	Больные катаральным и серозным маститом	54	43	79,6
5	Больные субклиническим маститом	63	49	77,8
6	Клинически здоровые, вакцинированные против вирусной диарей	44	42	95,5
Телята				
7	Клинически здоровые	34	11	32,3
8	Вакцинированные против вирусной диарей	43	39	90,7
9	Переболевшие энтеритами	53	45	84,9
10	Переболевшие респираторными болезнями	64	50	71,8

ИЗУЧЕНИЕ ЭПИЗООТИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО БОЛЕЗНИ АУЕСКИ В СМОЛЕНСКОЙ ОБЛАСТИ

Амирова И.В. ГУ Смоленская НИВС, Стрижаков А.А. ВНИИВВуМ.

Болезнь Ауески – контагиозная болезнь ряда домашних и диких млекопитающих животных. Вызывается ДНК-содержащим вирусом семейства *Herpesviridae*, сопровождается поражением центральной нервной системы и органов дыхания.

К вирусу восприимчивы свиньи, крупный и мелкий рогатый скот, домашние и дикие плотоядные, грызуны. Основным хозяином вируса – свинья,