619:616.9
Л125

225451

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

619:616.9
Л 125

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

225451

БИБЛИОТЕКА
Сам. СХИ
гор. Самарканд

МОСКВА, «КОЛОС», 1972

УДК 619:616.988-07

Лабораторная диагностика вирусных болезней животных. *В. Н. Сюрин, Г. А. Иванова, Е. А. Краснобаев, Ю. В. Фомин, 1972*

В данной книге авторы обобщили имеющийся материал по диагностике вирусных болезней животных, использовав последние достижения советских и зарубежных ученых.

При описании той или иной болезни дана краткая характеристика возбудителя. Приведены только те сведения, которые необходимы для идентификации вируса и установления его этиологической роли в возникновении болезни.

Довольно подробно описаны способы взятия, подготовки и хранения материала, методы выращивания вирусов на развивающихся куриных эмбрионах, на первичных и перевиваемых культурах клеток различных тканей и органов животных и т. д.

Основное внимание уделено проведению и читке диагностических реакций (РСК, РН, РЗГА и др.) и описанию метода постановки биологической пробы на восприимчивых лабораторных животных.

В книгу включены как часто встречающиеся и широко распространенные болезни сельскохозяйственных животных, так и малоизученные, так называемые «экзотические» болезни, свойственные животным стран Африканского континента, но занос которых в нашу страну не исключен в результате все развивающихся торговых и транспортных связей.

Лабораторная диагностика вирусных болезней животных. М., «Колос», 1972.
416. с. с ил.

На обороте тит. л. авт.: В. Н. Сюрин, Г. А. Иванова, Е. А. Краснобаев, Ю. В. Фомин.

Редактор А. М. Ярных
Художник М. И. Гозенпут
Художественный редактор З. П. Зубрилина
Технические редакторы Н. А. Усанова и В. А. Зорина
Корректор Р. Д. Пронман

Сдано в набор 22/VI 1972 г. Подписано к печати 21/IX 1972 г. Т 16222. Формат 60×90¹/₁₆. Бумага тип. № 2. Усл. печ. л. 26. Уч.-изд. л. 32,84. Изд. № 125. Тираж 13 000 экз. Заказ № 6196. Цена 1 р. 20 к. Издательство «Колос», 103716. Москва, К-31, ГСП, ул. Дзержинского, д. 1/19.

Типография им. Смирнова Смоленского облуправления по печати, г. Смоленск, пр. им. Ю. Гагарина, 2.

Л $\frac{0492\text{-}016}{035(01)\text{-}73}$ 152—72

ПРЕДИСЛОВИЕ

В последние годы особенно остро ощущается необходимость издания руководства по лабораторной диагностике вирусных болезней сельскохозяйственных животных. Это обусловлено накоплением фактического материала в результате изучения отдельных вирусных инфекций, разработкой новых и усовершенствованием имевшихся методов лабораторной диагностики, а также широким применением в вирусологических исследованиях новых методов работы с вирусами: культуры ткани, иммунофлуоресценции, хроматографии, электронной микроскопии и др. Использование метода культуры ткани, например, значительно обогатило наши знания о вирусах и позволило обнаружить множество совершенно новых вирусных агентов, о наличии которых прежде и не подозревали: энтеро-, адено-, рино-, цитомегаловирусы, вирусы папова и др.

К созданию этой книги нас побудило также стремление обобщить накопившуюся информацию по лабораторной диагностике отдельных вирусных болезней животных, сделать ее доступной для практических работников диагностических лабораторий.

Кроме того, с каждым годом появляется все больше фактов, имеющих непосредственное отношение к диагностике, когда один и тот же вирус способен вызывать клинически различные формы болезни-комплексы: болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота, вульвовагинит и ринотрахеит крупного рогатого скота, ринит, пневмония и аборт лошадей. Описываются случаи клинически сходных синдромов болезней при поражении различными вирусами (полиэнцефалиты свиней и болезнь Тешена, ящур, везикулярный стоматит и везикулярная экзантема, классическая чума птиц и ньюкаслская болезнь, европейская и африканская чума свиней и т. п.), случаи вирусоносительства реконвалесцентами и латенции у клинически здоровых животных (при ящуре, болезнях Тешена, Ауески, бешенстве), так называемые медленные вирусные инфекции (скрепи, визна, алеутская болезнь норок, лейкозы и пр.), что также имеет непосредственное отношение к проблеме диагностики.

Различные лабораторные модели (животные, куриные эмбрионы, тканевые культуры), используемые в научной и диагностической работе, часто дают возможность специалистам неожиданно

обнаруживать вирусные агенты неизвестного происхождения, которые, разумеется, не могут не влиять на результаты диагностических исследований.

И, наконец, невозможно игнорировать эволюцию вирусных болезней, обусловленную еще недостаточно ясными причинами. Несомненно лишь одно, что широкая систематическая вакцинация животных, по-видимому, является одним из факторов проявления атипичных форм инфекций.

В связи с организацией в нашей стране крупных животноводческих хозяйств и птицефабрик возникла проблема диагностики и ликвидации ряда латентных инфекций, которые при большой концентрации животных часто проявляются энзоотически у молодняка в виде пневмоний и энтеритов неясной этиологии. Истинную причину их обычно не удается установить на основании клинических, патологоанатомических и эпизоотологических данных. Поэтому необходимо дополнительно проводить лабораторные исследования (выделение, идентификация вируса, серодиагностика). Лабораторная диагностика таких болезней, как параинфлуенца-3, аденоинфекция, мукозная болезнь, ринотрахеит крупного рогатого скота, инфекционный бронхит, грипп птиц и другие, недостаточно четко изложена в соответствующих учебниках и руководствах по вирусным болезням животных. В предлагаемом руководстве мы стремились восполнить этот пробел.

Особое внимание уделено диагностике так называемых малоизученных, или «экзотических», болезней животных, свойственных странам Африканского континента (африканская чума свиней, чума однокопытных, катаральная лихорадка овец, болезнь Найроби, лихорадка долины Рифт и др.). Это связано с тем, что современные широкие торговые и транспортные связи создают опасность проникновения таких инфекций на территорию европейских стран, о чем свидетельствует, например, распространение африканской чумы свиней.

Книга предназначена для ветеринарных врачей-вирусологов ветеринарных бактериологических лабораторий, преподавателей, научных сотрудников и студентов.

ЯЩУР
(FOOT AND MOUTH DISEASE)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Ящур — остро протекающая инфекционная, чрезвычайно контагиозная болезнь парнокопытных, характеризуется лихорадкой и развитием афт на слизистой оболочке ротовой полости, а иногда на коже вымени и конечностей.

Наиболее восприимчивы к ящуру крупный рогатый скот, свиньи, овцы и козы, а также северные олени. Верблюды и буйволы менее чувствительны. Из диких животных восприимчивы сайгаки, джейраны, косули, кабаны и др. Описаны случаи заболевания ящуром человека, особенно детей, употребляющих в пищу непастеризованное молоко от больных животных. Экспериментально удается заразить морских свинок, молодых мышей, кроликов, сусликов, крыс, хомяков.

Ящур регистрируется во многих странах Европы, Азии, Африки и Южной Америки. Свободны от этой болезни США, Канада, Австралия, Новая Зеландия.

Экономический ущерб, причиняемый ящуром, складывается из потерь в результате гибели животных, главным образом молодняка (телят, поросят, ягнят), уменьшения на 50—70% удоя у коров, снижения веса больных животных и потерь в связи с карантинными мероприятиями.

У крупного рогатого скота и свиней в естественных условиях ящур протекает остро и, как правило (у взрослых животных), доброкачественно.

У крупного рогатого скота инкубационный период продолжается 1—3 дня, но может быть до 7—10 дней. Вначале отмечается ухудшение аппетита, вялая жвачка, повышенная соливация. Затем повышается (до 40,5—41,5°) температура тела, наступает угнетение, животное отказывается от корма, жвачка прекращается. На 2—3-й день болезни на внутренней поверхности верхней и нижней губ, на беззубом крае нижней челюсти, на языке и слизистой оболочке щек появляются афты. У некоторых животных афты образуются в области межкопытной щели и на вымени. Иногда поражаются все четыре конечности. Через 12—24 часа стенки афт разрываются, и образуется свежая эрозия. В это время температура тела понижается до нормальной, наступает обильное слюнотечение. В результате чмокающих движений в углах рта появляется пенистая масса. Через 2—3 недели эрозии заживают. При поражении конечностей животные хромают и часто ложатся, а при поражении вымени отмечается болезненность при доении, иногда возникает мастит.

У телят ящур чаще протекает в безафтозной форме с явлениями острого гастроэнтерита. При злокачественной форме ящур вначале протекает типично, но в стадии выздоровления, на 7—10-й день, внезапно наступает резкое ухудшение состояния животного, учащение пульса до 120—140 ударов в минуту, и 20—50% животных погибает от паралича сердца.

У свиней болезнь проявляется лихорадкой, угнетением, ухудшением аппетита. На коже конечностей, в области межкопытной щели, венчика и мякишей вначале появляются красные болезненные припухлости, затем афты, которые, разрываясь, образуют эрозии. Заболевание конечностей сопровождается хромотой, иногда спадением копытец. Чаще афты появляются на пятачке, на сосках и редко на слизистой ротовой полости. У взрослых свиней ящур длится 8—

25 дней. У поросят-сосунов он протекает в септической форме и в первые 2—3 дня болезни вызывает гибель 60—80% животных (Р. Ф. Сосов, 1969).

У овец инкубационный период продолжается 2—3 дня. Поражаются конечности в области венчика и межкопытной щели, реже слизистая оболочка ротовой полости. У больных отмечают лихорадку, отказ от корма, прекращение жвачки, хромоту, угнетение. Больные животные отстают от стада, ложатся. Болезнь длится около двух недель. У ягнят болезнь чаще проявляется гастроэнтеритом и нередко обусловливает гибель животных.

У коз клинические признаки болезни такие же, как и у овец. Довольно часто у них поражается вымя. Выздоровление наступает через 10—14 дней.

У оленей наблюдается понос, поражение слизистой оболочки ротовой полости и конечностей, часто осложняемое некробактериозом. Если не развиваются осложнения, животные выздоравливают через 10—12 дней (Р. Ф. Сосов, 1969).

При вскрытии обнаруживают изменения (афты и эрозии) в ротовой полости, иногда на слизистой оболочке пищевода и преджелудков жвачных. У телят, ягнят, поросят отмечают геморрагическое воспаление кишечника и дегенеративные изменения в мышце сердца («тигровое сердце»).

При злокачественном ящуре тяжелые поражения находят в сердечной мышце. Она бледная и дряблая, на разрезе выступают серовато-красноватые пятна эпикардом и эндокардом кровоизлияния. Подобные изменения находят также в скелетных мышцах (Р. Ф. Сосов, 1969).

ВИРУС

Возбудитель — мельчайший из вирусов, патогенных для человека и животных. Относится к семейству Picornavirinae, роду Picornavirus и типовому виду Picornavirus aphtae.

Вирионы возбудителя состоят из внутреннего ядра — рибонуклеиновой кислоты, симметрично покрытого снаружи белковой оболочкой, состоящей из 32 капсомеров. Вирионы имеют кубическую (икасаэдрическую) симметрию. Наружная белковая оболочка обусловливает антигенные и иммунохимические свойства. На долю белка приходится 68% вирусной частицы, а РНК — 32%.

Размеры вирионов колеблются от 20 до 25 ммк, а размеры капсомеров — 7—8 ммк. Вирус имеет четыре компонента: 140-S, 75-S, 12-S-частицы и VLA-компонент. Субъединицы, имеющие 75-S, лишены РНК, но обладают антигенной и серологической активностью. Компонент VLA — фермент полимераза.

В вируссодержащем исходном материале имеются инфекционный и комплементсвязывающий антигены, которые представлены двумя частицами вируса различной величины: частицы большего размера (25 ммк) обладают инфекционной и комплементсвязывающей активностью. Частицы меньшего размера (7 ммк) не обладают инфекционностью, но проявляют комплементсвязывающую активность. При нагревании вируса до 56° количество комплементсвязывающего антигена увеличивается, а количество инфекционного антигена уменьшается, так как происходит распад крупных частиц.

Типоспецифичность вируса, а также иммунизирующая активность больше связаны с крупными (25 ммк) частицами. Большие частицы полностью типоспецифичны, мелкие частицы могут быть ответственны за перекрестные реакции.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус ящура устойчив к спирту, эфиру, хлороформу, ацетону и быстро инактивируется β-пропиолактоном, сохраняя комплементсвязывающие свойства. Вирус относительно стабилен при pH 7,0—7,5 и очень чувствителен к кислому pH. Его устойчивость к температуре характеризуется следующими данными: 90% вируса теряет активность при 61° и pH7,5 в течение 3 секунд; при 49° — за 1 час; при 37° — за 21 час. Формальдегид инактивирует 90% вируса при 4° в течение суток.

Вирус ящура сравнительно устойчив к влиянию факторов внешней среды. В обрывках эпителиальных стенок афт он сохраняет вирулентность 67 дней,

в навозной жиже — 39 дней, в сточных водах — до 103 дней. На поверхности стогов сена он выживает летом один день, в сентябре — 3—6 дней, в октябре — 10 дней; внутри стогов он погибает через один месяц, зимой же только через семь месяцев (Р. Ф. Сосов, 1969). Лучшими дезинфицирующими средствами являются 2% или 3%-ные горячие растворы едкого натрия и 1%-ный раствор формальдегида.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. В 50%-ном растворе глицерина на фосфатном буфере (pH 7,2) при 4°, 8°, вируссодержащий материал сохраняет инфекционность в течение 40 дней. Данный консервант широко используют при пересылке материала в лабораторию. Вирус хорошо сохраняется в лиофилизированном виде.

Локализация в организме. Первоначально вирус размножается в эпителии слизистой оболочки ротовой полости. В инкубационный период от больного рогатого скота вирус можно выделять из молока в течение 7 дней и из спермы в течение 4 дней до появления клинических признаков. В период, когда болезнь выражена клинически, эпителий и жидкость везикул содержат большое количество вируса ($>10^8$ инф. ед./г ткани или миллилитр афтозной жидкости). Аналогичные результаты получены и при исследовании больных свиней и овец. В неблагополучном стаде всегда могут быть животные без клинических признаков болезни, но выделяющие со слюной вирус.

После заживления поражений и клинического выздоровления вирус ящура можно выделить из фаренгиальной области, особенно с дорсальной поверхности мягкого нёба (у крупного рогатого скота) и миндалин (у овец). Около 50% выздоровевшего крупного рогатого скота могут выделять вирус в течение 8 месяцев. У некоторых животных вирус может выделяться до 2 лет. Среди клинически выздоровевших овец 50% животных могут быть носителями вируса в течение 7 месяцев. У свиней персистентного носительства вируса не установлено (Berrows, 1968). Следует отметить, что количество вируса, выделяемого животными-реконвалесцентами, незначительно, порядка 10—100 инф. ед./мл.

Антигенная структура. В противоящурной иммунной сыворотке содержатся антитела к 25-миллимикронному и к 7-миллимикронному компонентам вируса ящура, причем антитела к первому компоненту типоспецифические, а ко второму — перекрестно реагируют с различными типами антигена. Ящурная антисыворотка после насыщения гомологичными 7-миллимикронными компонентами сохраняет способность образовывать преципитирующую линию только против 25-миллимикронного компонента, нейтрализовать инфекционность вируса и связывать комплемент.

Антигенная вариабельность. Известно несколько типов вируса ящура A, O, C, Sat_1, Sat_2, Sat_3, «Азия-1», «Азия-2». Все типы имеют варианты. Тип A включает 28 вариантов, тип O — 11, тип C — 2, Sat_1 — 7, Sat_2 — 3, Sat_3 — 4 варианта. В нашей стране регистрируют главным образом два типа: A и O. Антигенные типы и варианты, установленные в РСК, различаются и иммунологически.

Антигенная активность. В сыворотке крови переболевшего крупного рогатого скота обнаруживают комплементсвязывающие (КС), вируснейтрализующие и преципитирующие антитела. В сыворотках естественно заболевших животных эти антитела можно обнаружить на 8—10-й день после появления клинических признаков болезни с максимальным подъемом их титра на 16—21-й день. Затем титр комплементсвязывающих антител снижается, и к тем месяцам их присутствие не устанавливают, в то время как нейтрализующие антитела сохраняются в крови реконвалесцентов до 24 месяцев. Резистентность переболевших животных к повторному заражению связана (коррелирует) с титром вируснейтрализующих антител.

Накопившиеся в литературе данные свидетельствуют о различии в широте антигенного спектра отдельных вариантов вируса ящура в пределах одного и того же типа. Например, вариант O_2 индуцирует антитела, эффективные как против гомологичного вируса O_2, так и против O_1. При этом антител против O_1 образуется больше, чем от варианта O_1. Все варианты, относящиеся к типу A, индуцируют в различной степени и образование антител и против гетерологичного варианта.

Гемолитические свойства вируса ящура не установлены, гемагглютинирующие свойства выявлены в 1957 г.; они не резко выражены и проявляются при соответствующих условиях.

Спектр патогенности. В естественных условиях к вирусу ящура восприимчивы крупный рогатый скот, свиньи, овцы, козы, верблюды, буйволы, яки, олени, косули, джейраны, сайгаки, туры, лоси, кабаны и антилопы.

В лабораторных условиях вирусом ящура удается заразить лабораторных, естественно невосприимчивых животных: новорожденных крольчат, мышат, котят, хомяков, молодых и взрослых морских свинок и ежей.

Культивирование в лабораторных условиях. Вирус ящура можно поддерживать серийными пассажами на естественно восприимчивых животных (крупном рогатом скоте, свиньях, овцах, козах), однако данный метод дорог и связан с опасностью выноса вируса за пределы учреждения. Поэтому чаще в лабораторных условиях стандартные и полевые штаммы вируса поддерживают на морских свинках, белых мышах, крольчатах и культуре ткани. Следует иметь в виду, что длительное пассирование вируса ящура на лабораторных (естественно невосприимчивых) животных, а также в культуре ткани ведет к аттенуации вируса (при сохранении исходной типовой принадлежности) и непригодности такого вируса в качестве производственного штамма при изготовлении инактивированной вакцины.

Активность вируса устанавливают методом титрования на крупном рогатом скоте, новорожденных белых мышах и культуре ткани (см. стр. 9).

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагностика ящура основана на эпизоотологических данных, клинических признаках болезни, патологических изменениях, выделении вируса и биологической пробе, а типовая и вариантная идентификация — на РСК, реакции нейтрализации, диффузионной преципитации, серозащиты на мышатах-сосунах или культуре ткани по реконвалесцентным сывороткам крупного рогатого скота или морских свинок, пробой перекрестного испытания иммунитета на морских свинках, крупном рогатом скоте, а также в опытах перекрестного заражения вакцинированного крупного рогатого скота.

Клинический диагноз. Подозрения на ящур вызывает любое заболевание восприимчивых животных, характеризующееся появлением везикулярной сыпи в ротовой полости, на конечностях и вымени, повышенной саливацией, чмоканьем, затрудненным приемом и пережевыванием корма, а при осмотре ротовой полости — обнаружением афт и эрозий. Кроме того, обращают внимание продолжительная хромота, афты на венчике и в межкопытной щели, иногда спадение рогового башмака, афты на сосках и болезненность последних при доении и сосании, с сильно выраженным защитным рефлексом.

Эпизоотологический диагноз — высокая контагиозность; избирательное поражение только парнокопытных.

Лабораторные исследования. Методы лабораторной диагностики ящура варьируют в зависимости от того, требуется ли раннее обнаружение и типовая (вариантная) идентификация вируса (ранняя диагностика) или обнаружение и идентификация специфических противоящурных антител у животных-реконвалесцентов (ретроспективная диагностика).

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

От 2—3 больных животных берут стенки ящурных афт в количестве не менее 5 г. У свиней афты берут с «пятачка» или вымени, у мелкого рогатого скота — с беззубого края верхней челюсти, с кожи межкопытной щели или венчика. Афты берут свежие, созревшие, непрорвавшиеся, не издающие гнилостного запаха. Собранный материал помещают в консервирующую жидкость, состоящую из смеси химически чистого глицерина и фосфатно-буферного раствора pH 7,4—7,6, взятых в равных количествах. Материал транспортируют в запаянных пеналах.

Пробы, доставленные в лабораторию (кусочки афт с языка, конечностей или вымени), обрабатывают. Вначале удаляют консервирующую среду. Для этого кусочки материала несколько раз прополаскивают в 5—10-кратном объеме буферного раствора pH 7,4—7,5. Далее их взвешивают, измельчают в ступке со стерильным песком и заливают фосфатным буфером (pH 7,4—7,6), содержащим антибиотики, из расчета на 1 г ткани 9 мл буфера. Суспензию выдерживают 2—3 часа при 4°, после чего центрифугируют 15 минут при 6000 об/мин. Надосадочную жидкость используют для заражения животных или культуры ткани.

Биопроба на морских свинках. Морские свинки легко заражаются при интрадермальном введении вируссодержащего материала в плантарную поверхность задних лапок. Первичные поражения обычно появляются через 24—48 часов после инокуляции. Созревшие афты собирают на 2—5-й день (по мере созревания) и сразу же замораживают или помещают в консервирующую жидкость. Вторичные поражения — везикулы в ротовой полости обычно развиваются при заражении штаммами, глубоко адаптированными к морским свинкам. При заражении морских свинок следует иметь в виду, что часто для адаптации полевых штаммов вируса приходится производить несколько пассажей, прежде чем вирус начинает вызывать появление хорошо развитых афт и генерализованный процесс.

Биопроба на мышатах удобна и экономична. ID_{50} испытуемого штамма на мышатах-сосунах и крупном рогатом скоте одинаковы. Мышата-сосуны более чувствительны к вирусу ящура, чем морские свинки. Однако необходимо иметь в виду, что оценка результатов титрования на мышатах-сосунах нередко затруднительна из-за большого числа неспецифических смертельных случаев и часто наступающего каннибализма матерей.

Мышат-сосунов (не менее 10 голов на пробу одного материала) заражают подкожно или интраперитонеально в дозе 0,1 мл. В положительных случаях они заболевают с явлениями парезов и параличей; погибают обычно на 2—5-й день после инокуляции материала. Трупы мышат замораживают до использования в серологических реакциях или для следующего пассажа на мышах.

Выделение вируса на культуре клеток. Для этого используют первично-трипсинизированную культуру клеток почки телят или поросят, выращенную на среде с телячьей сывороткой, не содержащей противоящурных антител.

Первый пассаж испытуемого материала на первичных культурах клеток почки свиньи проводят в пробирках. Для этого гомогенезированные афты заливают средой для тканевой культуры без сыворотки или фосфатным буфером 1 : 10 и выдерживают 1—2 часа при 4°, после чего центрифугируют 30 минут при 3000 тыс. об/мин или 10 минут при 6000 об/мин. Надосадочную жидкость разводят поддерживающей средой от 10^{-2} до 10^{-9} и разливают по 1 мл в пять пробирок с культурой ткани, которые помещают во вращающийся барабан или укладывают под небольшим углом (5—7°) в кюветы и переносят в термостат (37°). Для выявления цитопатогенного действия (ЦПД) вируса зараженные культуры периодически просматривают. Пробирки, в которых обнаруживают появление характерного цитопатогенного действия, замораживают и хранят при минус 30°. Второй пассаж испытуемого материала проводят с размороженным материалом первого пассажа (содержимое разных пробирок смешивают), который вводят в матрацы Ру из расчета 30 мл материала, разведенного 1 : 1000 на один матрац Ру. После появления отчетливого цитопатогенного действия материал замораживают и хранят до использования.

Вирус ящура, длительно пассированный на белых мышах и куриных эмбрионах, обладает низкой цитопатогенной активностью в культуре ткани почек крупного рогатого скота и свиней.

Титрование вируса. Инфекционный титр вируса ящура вычисляют по методу Рида и Менча (1938), которым устанавливают LD_{50}, т. е. количество вируса, вызывающее гибель 50% подопытных животных (в опытах на мышатах-сосунах 4—5-дневного возраста).

Из вируссодержащих тканей (мышц, эпителия стенок афт и др.) берут необходимую навеску материала, тщательно (10—20 минут) растирают в стерильной форфоровой ступке с кварцевым песком или битым нейтральным стеклом до полной гомогенизации. К взятой навеске материала добавляют 9 частей физиологического или буферного раствора (pH 7,6), чтобы получилась 10%-ная концентрация исходного вируссодержащего материала. Полученную суспензию тщательно перемешивают, вносят антибиотики (пенициллин и стрептомицин по 200—400 ЕД на 1 мл суспензии) и оставляют при комнатной температуре для экстрагирования на 1 час или на 2—3 часа при 4°.

Перед приготовлением последующих разведений исходную суспензию вируса обязательно центрифугируют при 3000 об/мин в течение 30 минут или при 6 тыс. об/мин в течение 15 минут. Из исходной 10%-ной суспензии готовят возрастающие разведения вируса. Для удобства последующих вычислений титра вируса следует сохранять постоянный коэффициент разведения. Готовят десятикратные разведения от 10^{-1} до 10^{-8} или 10^{-9} общепринятым методом.

Титрование на белых мышах. Титрование вируса на мышатах-сосунах проводят общепринятым методом. В шприц объемом 1—2 мл, начиная с пробирки № 10, набирают по 0,8 мл каждого разведения вируса и вводят по 0,2 мл под кожу четырем мышатам-сосунам. Последних метят татуировкой, прокалывая кожу инъекционной иглой, смоченной черной тушью, и помещают их в общую клетку, в которую подсаживают четырех контрольных мышат и четырех лактирующих маток. За мышатами наблюдают в течение 7 суток с момента

заражения. Гибель их регистрируют в специальном журнале. Титр вируса рассчитывают по методу Рида и Менча и выражают в lg LD_{50}/г вируссодержащего материала.

Надо иметь в виду, что штаммы, слабовирулентные и низкоинвазивные для крупного рогатого скота, обычно плохо титруются на белых мышах (В. А. Сергеев, 1966). Вирусы, адаптированные к морским свинкам, имеют титр на мышах в 10—50 раз выше, чем на морских свинках.

Титрование вируса на крупном рогатом скоте. Гендерсон (1949) предложил метод титрования вируса ящура на слизистой оболочке языка крупного рогатого скота. Титрование вируса проводят после местной анестезии языка.

Вирус вводят тонкой иглой в толщу слизистой оболочки языка в момент удаления ее из ткани. На каждом языке испытывают четыре (10-кратных) разведения вируса. Вирус каждого разведения вводят по 0,1 мл в четыре точки слизистой языка, располагая уколы в ряд поперек языка на равном расстоянии друг от друга. Суспензию наименьшего разведения вируса вводят у корня языка, а последовательно возрастающие разведения — по направлению к концу языка. Каждое разведение вируса вводят отдельными шприцем и иглой. Результаты титрования учитывают через 18—36 часов, в зависимости от штамма. Стандартное отклонение, по данным Гендерсона, составляет ±0,33 lg. При использовании четырех животных для титрования одного материала ошибка уменьшилась до ±0,21 lg.

Титрование вируса ящура в пробирках с однослойной клеточной культурой по цитопатогенному действию. Титрование вируса ящура в однослойных клеточных культурах — один из основных методов количественного определения титра вируса. При этом титр вируса выражают в $ЦПД_{50}$ (цитопатическая доза, вызывающая гибель зараженной культуры клеток в 50% пробирок). Для этого используют вируссодержащий материал, полученный от больных животных (афты от крупного рогатого скота и морских свинок, тушки крольчат и новорожденных мышей, а также пробы различных органов, секреты, кровь и др.) и в культуре ткани. Из тканевого материала готовят 10%-ную суспензию на стерильном фосфатно-буферном растворе pH 7,6. После добавления антибиотиков (по 200—400 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина и 100 ЕД/мл полимиксина) суспензию выдерживают при 4—6° в течение 2—3 часов. Центрифугируют 30 минут при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают в стерильные флаконы и хранят в замороженном состоянии (минус 20°) до использования. Надосадочную жидкость проверяют на стерильность (высевы на МПБ и МПА) и при отсутствии бактериального загрязнения титруют в клеточных культурах. При сильном загрязнении вируссодержащий материал фильтруют через стерилизующие пластинки СФ.

Вирус, выращенный в однослойных клеточных культурах, а также в суспензии клеток, титруют после замораживания, оттаивания, центрифугирования и проверки на стерильность культуральной жидкости. Вирус, выращенный по методу Френкеля, используют для титрования в виде 10%-ной суспензии инфицированного эпителия, приготовленной на культуральной жидкости или фосфатно-буферном растворе.

Для титрования вируса ящура обычно применяют первичные однослойные культуры клеток почки свиней (СП), телят (БП), кроликов (КрП), эмбрионов почки свиней (СЭП) и коров (БЭП) и однослойные культуры перевиваемых линий клеток почки поросенка (ПП), почки эмбриона свиней (СПЭВ). Используют пробирки с хорошим сплошным монослоем клеток.

10-кратные разведения вируссодержащей суспензии или культуральной жидкости готовят на питательной среде (0,5%-ный раствор гидролизата лактальбумина, среда 199, среда Игла и др.), без сыворотки (pH 7,4—7,5), общепринятым методом. На каждое разведение вируса обычно используют по четыре пробирки с культурой клеток. Предварительно из отобранных пробирок сливают питательную ростовую среду. В каждую пробирку вносят по 1 мл разведенного в питательной среде вируса или 0,1 мл разведенного вируса и 0,9 мл питательной среды без сыворотки (поддерживающая среда). В первом случае титр вируса устанавливают в 1 мл, во втором — в 0,1 мл. На пробирках с з

раженным монослоем указывается номер исследуемого материала (числитель) и разведения вируса (знаменатель). Пробирки складывают в специальные кюветы или оставляют в штативах в горизонтальном положении и инкубируют при 37°. Одновременно ставят контроль — культуру ткани с поддерживающей средой.

Учет результатов. Через 24 часа проводят первый учет результатов титрования. Каждую пробирку просматривают под малым увеличением (7×10) микроскопа и определяют ЦПД вируса (условно в крестах). Вирус ящура вызывает деструкцию клеток монослоя. Вначале они округляются, становятся блестящими (преломление света), а затем разрушаются. Такие клетки отслаиваются от стекла и в виде детрита оказываются в питательной среде. Дегенеративные изменения клеток монослоя под воздействием вируса ящура начинаются через 12—15 часов после заражения культуры и полностью заканчиваются через 24—72 часа, в зависимости от дозы и происхождения вируса. Пробирки с явным поражением клеток монослоя помещают отдельно, остальные пробирки вновь ставят при 37°. Окончательно результаты учитывают через 72 часа после заражения культуры. Одновременно просматривают и контрольные пробирки. Результаты титрования достоверны при сохранении монослоя в контроле. Их отражают в протоколе титрования (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1

Дата титрования	Вид культуры	№ материала	Разведение вируса								Титр вируса ЦПД $_{50}$ /мл
			10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	
1/V 1968 г.	СП	1	+	+	+	+	+	+	+	—	$10^{6,22}$
			+	+	+	+	+	+	—	—	
			+	+	+	+	+	—	—	—	
			+	+	+	+	+	—	—	—	

Примечание. + ЦПД вируса; — отсутствие ЦПД.

Определение титра вируса. Титром вируса считают наибольшее его разведение, вызывающее полное разрушение клеток в 50% зараженных пробирок. Его вычисляют по статистической формуле Рида и Менча, описанной в руководствах по вирусологии. Однако для определения титра вируса по данному методу можно пользоваться упрощенной схемой (табл. 2).

ТАБЛИЦА 2

Количество пробирок, зараженных разведением 10^{-n}	Количество культур с ЦПД	Культуры с ЦПД в %	Титр вируса в лог. 10
4	1	25	(n—1),66
4	2	50	n,0
4	3	75	n,33
4	4	100	n,50

Для вычисления титра вируса в 1 мл делается поправка на дозу заражения:
0,1 — 1 лог. 0,25 — 0,6 лог. 0,4 — 0,4 лог.
0,2 — 0,7 » 0,3 — 0,52 » 0,5 — 0,3 »

Титр вируса можно также определять по модифицированному методу Ашмарина.

Примеры:

Разведения вируса	Результат учета ЦПД в пробирках
10^{-3}	++++=1,0
10^{-4}	+++-+=1,0
10^{-5}	+++—=0,75
10^{-6}	++——=0,5
10^{-7}	++——=0,5
10^{-8}	+———=0,25

Титр= 4+0,75+0,5+0,5+0,25 (+0,5)=$10^{6,5}$ ЦПД$_{50}$/0,1мл

Пробирки каждого разведения, где отмечено ЦПД, принимают за одну единицу. В остальных случаях учитывают пробирки с ЦПД, как часть единицы (3 пробирки — 0,75; 2 пробирки — 0,5; 1 пробирка — 0,25). Полученные цифровые данные складывают и делают поправку +0,5 (1,0—0,5), что и выражает титр вируса в обратных лог. 10. При вычислении титра вируса в миллилитрах также делают поправку на дозу заражения.

Обычно при титровании «афтозного», «лапинизированного» или «муринизированного» вируса титр его указывают в 1 мл 10%-ной вирусной суспензии, а при титровании культурального вируса — в 1 мл культуральной жидкости.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Серологическая идентификация. Ее проводят или непосредственно с афтозным материалом, полученным от больного животного, или с материалом, собранным от зараженных лабораторных животных (морские свинки, мышата-сосуны), или инфицированной культурой клеток, где выявлены цитопатические изменения. При помощи метода серо-иммунологической идентификации удается также дифференцировать ящур от других клинически сходных болезней (например, везикулярного стоматита).

Для идентификации выделенного вируса последний в реакциях участвует в качестве испытуемого антигена с заведомо позитивными типовыми и вариантными сыворотками. Идентификация вируса включает три последовательных этапа: ориентировочная (вирус ящура или нет), типовая (на основании данных РСК и РДП) и вариантная (по данным РСК и РДП). Идентификацию типов и вариантов по исследованию сывороток реконвалесцентов (ретроспективная диагностика) проводят при помощи реакции серозащиты и РДП.

Реакция связывания комплемента. Определение типов и подтипов (вариантов) полевых штаммов вируса ящура в реакции связывания комплемента (РСК) проводят, согласно утвержденному наставлению, следующим образом *. Компоненты реакции: гемолизин, эритроциты барана (2%-ная взвесь), ком-

* Помимо того, РСК применяют для проверки производственных штаммов вируса ящура при изготовлении вакцины и лабораторных штаммов в научно-исследовательской работе.

племент (свежая или сухая нормальная сыворотка морских свинок), сыворотки морских свинок, гипериммунизированных стандартными типовыми, производственными или эпизоотическими штаммами вируса ящура; антигены: контрольные из эталонов типовых и производственных штаммов вируса ящура; испытуемые из эпизоотических производственных или лабораторных штаммов вируса* от крупного рогатого скота, овец, свиней, крольчат, морских свинок, мышат и животных других видов; физиологический раствор.

Определения титра гемолизина. Для этого гемолизин разводят физиологическим раствором и испытывают на активность в различных разведениях. Выпускаемый биофабрикой гемолизин консервируют глицерином (1 : 1), поэтому для приготовления первого разведения — 1 : 100 берут 0,2 мл гемолизина и 9,8 мл физиологического раствора. Затем в отдельной пробирке готовят разведение 1 : 1000, для чего к 1 мл гемолизина в разведении 1 : 100 добавляют 9 мл физиологического раствора. Разведение 1 : 1000 является основным, из которого готовят все последующие: 1 : 1500, 1 : 2000, 1 : 3000, 1 : 4000 и т. д. по следующей схеме (табл. 3).

ТАБЛИЦА 3

Необходимое разведение	1:1500	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000	1:6000
Гемолизин 1 : 1000, в мл	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Физиологический раствор, в мл	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0

Титрация гемолизина

Разведение гемолизина	1:1000	1:1500	1:2000	1:3000	1:4000	1:5000
Гемолизин, в мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Физиологический раствор (вместо антигена и сыворотки)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Комплемент в разведении 1 : 20	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Эритроциты — 2%-ная взвесь	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Реакцию учитывают после выдерживания разведений гемолизина 10 минут в водяной бане при температуре 37—38°.

Титром гемолизина считают то наивысшее разведение его, которое вызывает полный гемолиз эритроцитов. Рабочим разведением его считается четырехкратная концентрация от его предельного титра.

В дальнейшем перед постановкой реакции гемолизин не титруют, а рабочее разведение готовят, исходя из предельного титра, установленного при его выпуске биофабрикой и указанного на этикетке. Например, если предельный титр гемолизина 1 : 3000, то рабочее разведение будет 1 : 750. Поскольку гемолизин, выпускаемый биофабрикой, консервирован глицерином (1 : 1), то для приготовления рабочего разведения его берут вдвое больше, т. е. 2 : 750, или 0,2 мл гемолизина и 74,8 мл физиологического раствора.

Для дальнейшей работы гемолизин в рабочем разведении смешивают с равным количеством 2%-ной взвеси эритроцитов. Полученная смесь называется гемолитической системой.

Эритроциты готовят общепринятым методом. Отмывают от сыворотки до тех пор (3—4 раза), пока жидкость над осадком не станет бесцветной. Из осадка эритроцитов готовят 2%-ную взвесь.

Комплемент титруют в гемолитической системе и обязательно в день по-

* В зависимости от целей исследования.

становки реакции. Его исследуют в разведении 1 : 20 в следующих дозах: 0,05; 0,10; 0,15 и т. д. с интервалами 0,05 до 0,40 мл. В каждую пробирку недостающее количество до объема 0,5 мл доливают физиологическим раствором (в первую пробирку 0,45 мл; во вторую — 0,40; в третью — 0,35 и т. д.). Это будет соответствовать 0,5; 1,0; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5 и 4% цельного комплемента, содержащегося в дозе 0,5 мл разведения с физиологическим раствором.

ТАБЛИЦА 4

Схема титрации комплемента

	Содержание цельного комплемента, в %							
	0,5	1,0	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5	4,0
Комплемент в разведении 1 : 20	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40
Недостающее количество физиологического раствора	0,45	0,40	0,35	0,30	0,25	0,20	0,15	0,10
Гемолизин в рабочем титре	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Эритроциты (2%-ная взвесь)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Физиологический раствор вместо антигена и сыворотки	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Водяная баня 15 минут при 37—38°, после чего учитывают реакцию. *Титром комплемента считается то наименьшее его количество, которое вызывает полный гемолиз эритроцитов.* При определении типов вируса ящура используют комплемент, который при указанных условиях имеет титр не ниже 2,5%.

В дальнейшем для постановки главного опыта комплемент берут с постоянным излишком в 1%, или 2 условные единицы от титра его в гемолитической системе. Например, если титр комплемента в гемолитической системе будет 1,5% (см. схему титрации комплемента), то за рабочее разведение его следует взять 2,5%, что составляет 2 единицы. Разведение комплемента делают из нативного цельного комплемента.

Сыворотки. Типоспецифические и вариантные гипериммунные ящурные сыворотки готовят централизованно на биофабриках (в институтах) и используют для определения типов и подтипов (вариантов) вируса ящура.

Антигены. Типоспецифические и вариантные ящурные антигены готовят из тканей больных ящуром крольчат на биофабриках (институтах) и рассылают через систему «Зооветснаб».

Испытуемый антиген (стенки афт с языка крупного рогатого скота, пятачка или вымени свиней, с венчика, межкопытной щели или беззубого края мелкого рогатого скота и т. п.) готовят по следующей методике. Эпителий афт отмывают от загрязнений и от консервирующей жидкости в чашке Петри стерильным физиологическим раствором pH 7,6, высушивают фильтровальной бумагой, взвешивают, измельчают и тщательно растирают в фарфоровой ступке с нейтральным стеклом до получения однородной массы. К гомогенату добавляют двойное (по весу) количество физиологического раствора (чтобы получить 33%-ную взвесь). Приготовленную суспензию экстрагируют при комнатной температуре в течение 2 часов и ставят в холодильник для промораживания при температуре минус 6—20° на 12—18 часов. Затем антиген размораживают, центрифугируют 15 минут при 5000 об/мин, надосадочную жидкость отделяют, инактивируют 40 минут при 58° и повторно центрифугируют *.

* Такая инактивация не гарантирует полную утрату вирулентности титруемого вируса, поэтому при работе с такими антигенами необходимо соблюдать все необходимые ветеринарно-санитарные правила, исключающие вынос инфекции ящура за пределы лаборатории.

Остаток присланного на исследование патологического материала хранят при температуре минус 6—20° в консерванте и используют по мере надобности. В случае отрицательных результатов РСК проводят расплодку испытуемого материала на 4—6-дневных мышатах, морских свинках или культуре ткани *.

Определение типовой принадлежности испытуемого полевого штамма вируса ящура. С этой целью перед проведением главного опыта позитивные ящурные сыворотки и антигены не титруют, а используют их в удвоенных титрах. Например, если предельный титр позитивной сыворотки, указанный на этикетке, 1 : 40, то удвоенным титром ее будет разведение 1 : 20. Если предельный титр антигена, указанный на этикетке, 1 : 6, то удвоенным титром его будет разведение 1 : 3. Испытуемый антиген в реакции исследуют цельным (33%-ная взвесь) и в разведениях 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8.

Для определения типа вируса главный опыт РСК ставят в объеме 1 или 0,5 мл по следующей схеме (табл. 5).

ТАБЛИЦА 5

Компоненты	Сыворотки типов					Без сыворотки
	О	А	С	Sat,	„Азия-1"	
Сыворотки в рабочем титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—
Испытуемый антиген в разведении 1 : 2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент 2 единицы	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Физиологический раствор	—	—	—	—	—	0,2
Гемсистема	Водяная баня 20 минут при 37—38°					
	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Результат	Водяная баня 30 минут при 37—38°					
	++++	—	—	—	—	—

Пример учета постановки РСК (табл. 6).

Испытуемый антиген относится к типу О.

Одновременно с главным опытом по определению типов вируса ящура ставят контроль ящурных компонентов, участвующих в реакции (табл. 7).

В пограничных зонах страны при угрозе проникновения ящура других типов в контроль и главный опыт по определению типов включают сыворотки и антиген вируса ящура, регистрируемого сопредельном государстве.

Определение вариантной (подтиповой) принадлежности полевых штаммов вируса ящура. Необходимо взять те же компоненты, и при постановке РСК для определения типов, и, кроме того, антигены и сыворотки производственных (вариантных) штаммов вируса ящура.

* При использовании эпизоотического материала в РСК необходимо иметь в виду, что эпителиальная ткань языка крупного рогатого скота становится инфекционной уже через 6 часов после заражения животного, когда еще не различимы изменения на месте.

ТАБЛИЦА 6

Антигены	Сыворотка в рабочих титрах					Без сыворотки
	О стандартный	А стандартный	С стандартный	Sat_1	«Азия-1»	
Стандартный:						
О	++++	—	—	—	—	—
А	—	++++	—	—	—	—
С	—	—	++++	—	—	—
Sat_1	—	—	—	++++	—	—
«Азия-1»					++++	
Испытуемый антиген в разведениях:						
цельный	++++	++	+	+	+	+
1 : 2	++++	—	—	—	—	—
1 : 4	++++	—	—	—	—	—
1 : 8	++	—	—	—	—	—
Без антигена	—	—	—	—	—	—

Примечание. ++++ 100%-ная задержка гемолиза (полная); +++ 75%-ная задержка гемолиза; ++ 50%-ная задержка гемолиза; + 25%-ная задержка гемолиза и — полный гемолиз.

225451

Перед постановкой РСК с целью определения вариантной принадлежности эпизоотических штаммов вируса ящура определяют активность и вариантную специфичность антигенов и сывороток, используемых в реакции по схеме (табл. 8).

Первый учет реакции проводят сразу же после водяной бани и окончательный — через 18 часов после выдерживания пробирок при температуре 12—18°.

Предельным титром сыворотки считают то наивысшее разведение ее, которое дает с гомологичным антигеном полную задержку гемолиза эритроцитов (++++), в данном случае разведение 1:40.

Титром антигена считается наивысшее разведение его, дающее с гомологичной сывороткой полную задержку гемолиза эритроцитов. В данном случае титр антигена 1 : 6.

По аналогичным схемам (табл. 9—11) проводят проверку на активность и специфичность сывороток и антигенов других вариантов.

Определение вариантной принадлежности эпизоотического штамма вируса ящура проводится в два этапа.

Первый этап — предварительное заключение по РСК. В этом случае исследуют по РСК антиген испытуемого штамма вируса с предельными разведениями вариантных сывороток. Антиген относится к тому варианту, с сывороткой которого он будет давать связывание в более высоких разведениях.

БИБЛИОТЕКА
Сам. СХИ

ТАБЛИЦА 7

Контроль типоспецифических ящурных компонентов

Компоненты	Номера пробирок														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Сыворотка в удвоенном титре:															
типа О	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
типа А	—	—	—	—	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—	—	—	—	—
типа С	—	—	—	—	—	—	—	—	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—
Антиген в удвоенном титре:															
типа О	0,2	—	—	—	0,2	—	—	—	0,2	—	—	—	0,2	—	—
типа А	—	0,2	—	—	—	0,2	—	—	—	0,2	—	—	—	0,2	—
типа С	—	—	0,2	—	—	—	0,2	—	—	—	0,2	—	—	—	0,2
Физиологический раствор	—	—	—	0,2	—	—	—	0,2	—	—	—	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент 2 единицы	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
	Водяная баня при 37—38° 20 минут														
Гемолизин в четырехкратном титре+2%-ная взвесь эритроцитов	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	Водяная баня при 37—38° 30 минут														
Результаты	++++	—	—	—	—	++++	—	—	—	—	++++	—	—	—	—

Примечание. При постановке главного опыта с сыворотками и антигенами других типов контроль их проводят по аналогичной схеме.

ТАБЛИЦА 8

Схема проверки активности вариантной сыворотки A_7

Разведение сыворотки A_7	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1;160
Сыворотка A_7	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Антиген A_7 в рабочем титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент 2 единицы	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 20 минут при 37—38°						
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 30 минут при 37—38°						
Результат	++++	++++	++++	++++	++	+

ТАБЛИЦА 9

Схема проверки вариантной специфичности сыворотки A_7

Сыворотка A_7 в предельном титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Антиген A_7 в удвоенном титре	0,2	—	—	—	—
Антиген A_{20} в удвоенном титре	—	0,2	—	—	—
Антиген A_{22} в удвоенном титре	—	—	0,2	—	—
Антиген стандартного типа А в удвоенном титре	—	—	—	0,2	—
Физраствор	—	—	—	—	0,2
Комплемент 2 единицы	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 20 минут при 37—38°					
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 30 минут при 37—38°					
Результат	++++	++	±	+	—

Заключение. Сыворотка варианта A_7 специфична.

ТАБЛИЦА 10

Схема проверки активности антигена варианта A_7

Разведение антигена	1:2	1:3	1:4	1:6	1:8	1:12	1:16
Количество разведенного антигена	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Сыворотка A_7 в предельном титре	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент 2 единицы	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 20 минут при 37—38°							
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 30 минут при 37—38°							
Результат	++++	++++	++++	++++	+++	++	+

ТАБЛИЦА 11

Схема проверки вариантной специфичности антигена A_7

Антиген в удвоенном титре	0,2	0,2	0,2	0,2
Сыворотка A_7 в предельном титре	0,2	—	—	—
Сыворотка A_{20} в предельном титре	—	0,2	—	—
Сыворотка A_{22} в предельном титре	—	—	0,2	—
Физраствор	—	—	—	0,2
Комплемент 2 единицы	0,2	0,2	0,2	0,2
Водяная баня 20 минут при 37—38°				
Гемолитическая система	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 30 минут при 37—38°				
Результат	++++	+	++	—

Заключение. Антиген варианта A_7 специфичен.

Примерный результат РСК при определении вариантной принадлежности эпизоотического штамма вируса ящура приведен в таблице 12.

ТАБЛИЦА 12

Вариантные сыворотки в предельных титрах	Антиген испытуемого штамма					
	цельный	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
A_7	++++	++++	++	+	±	—
A_{90}	++++	++++	++	+	±	—
A_{22}	++++	++++	++++	++++	++++	+++
А стандартная	++++	++++	+++	++	+	—
Без сыворотки	—	—	—	—	—	—

Предварительное заключение. Испытуемый штамм относится к варианту A_{22}.

Второй этап — окончательное заключение по РСК.

К началу исследований по второму этапу на испытуемый штамм вируса должна быть получена штаммоспецифическая гипериммунная сыворотка. В этом случае опыт перекрестной РСК ставят с сыворотками в предельных титрах и с антигенами в удвоенных титрах. Испытуемый антиген относится к тому варианту, с сывороткой которого он будет давать наибольшее связывание (++++) (табл. 13).

Определение типа вируса ящура методом перекрестного иммунитета на крупном рогатом скоте. Испытание перекрестного иммунитета на крупном рогатом скоте с целью определения типовой принадлежности полевого штамма вируса ящура проводится лишь в том случае, если по лабораторным тестам обнаруживается новый тип вируса ящура, ранее не встречавшийся в стране.

ТАБЛИЦА 1

Примерная схема и результат постановки перекрестной РСК для определения вариантной принадлежности эпизоотического штамма вируса ящура

Антигены в удвоенном титре	Штаммоспецифические сыворотки в удвоенном (уд. т.) и предельном (п. т.) титрах										Без сыворотки
	А стандартный		A_7		A_{20}		A_{22}		испытуемый		
	уд. т.	п. т.	уд. т.	п. т.	уд. т.	п. т.	уд. т.	п. т.	уд. т.	п. т.	
А стандартный	++ ++	++ ++	++ +	++	++	+	++	+	++	+	—
A_7	++	+	++ ++	++ ++	++	+	++	+	++	+	—
A_{20}	++	+	++	+	++ ++	++ ++	++	+	++	+	—
A_{22}	++	+	++	+	++	+	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	—
Испытуемый	++	+	++	+	++	+	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	—
Без антигена	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Окончательное заключение. Испытуемый штамм вируса ящура относится к варианту A_{22}.

Методика постановки опыта состоит в следующем. Крупный рогатый скот, переболевший ящуром неизвестного типа, через 21—30 дней повторно заражают вирусом ящура семи известных типов. Для этого на каждый тип необходимо взять четырех переболевших животных и двух контрольных животных, ранее не болевших ящуром. Таким образом, для проведения опыта нужно 42 головы крупного рогатого скота. Заражают животных инъекцией под слизистую оболочку языка 10 000 ID_{50} вируса по 0,2 мл в две точки. Испытуемый штамм вируса относится к тому типу, после заражения которым переболевшие животные не заболели ящуром при наличии генерализованного процесса ящура у контрольных животных.

Определение типа вируса ящура методом перекрестного иммунитета на морских свинках. Морских свинок заражают интрапларнально адаптированным к морским свинкам испытуемым штаммом вируса ящура. После выздоровления от генерализованного процесса морских свинок разбивают на группы и реинфицируют эталонными типами в дозе по 10 000 ID_{50}. На каждый эталонный штамм берут минимум по шесть переболевших морских свинок.

Определение варианта вируса ящура методом перекрестного иммунитета на переболевшем крупном рогатом скоте. Данный метод применяют для определения иммунологического соответствия эпизоотического штамма вируса ящура производственному. Мето-

дика опыта заключается в следующем: крупный рогатый скот в возрасте 2—3 лет в количестве 24 голов разбивают на две группы (по 12 голов в группе).

Животных первой группы иммунизируют вакциной, приготовленной из производственного штамма вируса ящура того же типа.

Животных второй группы иммунизируют вакциной из испытуемого штамма вируса.

Через 21 день после вакцинации животных каждой группы разбивают на две подгруппы, по шесть животных в подгруппе.

Животных первых подгрупп, первой и второй групп, заражают испытуемым вирусом, вторых подгрупп — производственным (афтозным) штаммом вируса ящура, используемым для контроля активности вакцины. В качестве контроля вируса к каждой группе животных берут по две головы восприимчивого (невакцинированного) крупного рогатого скота того же возраста, что и вакцинированный. Заражают инъекцией под слизистую оболочку языка 10 000 ID_{50} вируса по 0,2 мл в две точки.

Штаммы считают идентичными, если вакцина предохраняет животных от развития генерализованного процесса при заражении используемыми штаммами. В случае иммунологического отличия штаммов вакцинированные животные, инфицированные гетерологичным штаммом, заболевают генерализованной формой ящура.

Реакция серозащиты на мышатах-сосунах* применяется для определения типа вируса ящура по сывороткам крови реконвалесцентов (ретроспективная диагностика), а также в патологическом материале. Эта же реакция используется и для установления соответствия эпизоотических штаммов вируса производственным.

Реакцию серозащиты ставят в диагностических лабораториях научно-исследовательских учреждений.

Определение типа вируса ящура по сыворотка м животных-реконвалесцентов. Компоненты реакции: *физиологический раствор* pH 7,5—7,6, стерилизованный в автоклаве при 120° в течение 30 минут (перед употреблением на 1 мл раствора добавляют по 1000 ЕД пенициллина и стрептомицина), *мышата-сосуны в возрасте 4—7 дней, вирус ящура* и *сыворотка переболевших животных.*

Для постановки реакции используют эталонные (адаптированные к организму 4—7-дневных мышат-сосунов) штаммы вируса ящура различных типов. Штаммы должны быть типоспецифическими и иметь титр на мышатах-сосунах, выраженный в логарифмах с основанием 10, не ниже 7,0 в 1 г вируссодержащего материала или 6,0 в 1 мл вируссодержащей суспензии 1 : 10.

Расплодку и титрование вируса ящура на мышатах-сосунах проводят в лабораториях по следующей методике. Вируссодержа-

* Методика реакции серозащиты на мышатах-сосунах рекомендована сотрудниками Всесоюзного научно-исследовательского ящурного института А. И. Соко, Ю. Ф. Нестеровой, Ю. А. Черняевым и В. Н. Прохоровым и утверждена Главным управлением ветеринарии МСХ СССР.

щий материал в количестве 1 г гомогенизируют. Суспензию 1 : 10 экстрагируют 30 минут в условиях комнатной температуры, затем центрифугируют при 3000—6000 об/мин в течение 15—20 минут. Надосадочную жидкость вводят под кожу 10—20 мышатам-сосунам в дозе по 0,2 мл. Мышат помещают в клетку, подсаживают к ним двух лактирующих маток и, начиная с 12 часов после заражения, осматривают каждые 3—5 часов. Мышат, находящихся в агональном состоянии и павших, отбирают в герметически закрытые контейнеры и переносят в стерильный бокс. В боксе мышат помещают в эмалированный кювет, их кожный покров протирают этиловым спиртом, ножницами отсекают голову, лапки и хвост, пинцетами снимают шкурку и удаляют внутренние органы. Из тушек готовят суспензию (1 : 10) на физиологическом растворе, суспензию титруют на мышатах-сосунах и используют для постановки реакции серозащиты. Перед титрацией и постановкой реакции серозащиты полученный вирус проверяют в РСК на типовую принадлежность.

Перед постановкой реакции серозащиты из вируссодержащего материала готовят суспензию 1 : 10, которую расфасовывают в ампулы или флаконы по 1—2 мл и замораживают в холодильнике. Через 1—2 дня одну из ампул размораживают и определяют титр вируса в суспензии. На основании полученного титра рассчитывают дозу вируса ящура при титрации иммунных сывороток. Вируссодержащую суспензию хранят в холодильнике при минус 20° в течение месяца или при минус 60° в течение 2 месяцев. Суспензию, приготовленную на консервирующей жидкости, состоящей из 1 части глицерина и 1 части фосфатного буфера (pH 7,6), можно хранить в указанных условиях до четырех месяцев, а в морозильном отделении бытового холодильника — до одного месяца. При указанных условиях хранения титр вируса в суспензии существенно не меняется.

Сыворотку крови 10—20 животных-реконвалесцентов (крупный рогатый скот, овцы, свиньи), взятую от 14 до 60 дней после заболевания ящуром, смешивают в одной пробирке по 0,2 мл для приготовления средней пробы и хранят в холодильнике в замороженном состоянии *.

* Если заморозить сыворотки невозможно, их высушивают на фильтровальной бумаге следующим образом. Фильтровальную бумагу нарезают прямоугольниками площадью 60—70 см². Бумажки кладут на стекло, на каждую наливают по 1 мл сыворотки и оставляют при комнатной температуре на 30 минут. Далее бумажки отделяют от стекла и кладут на пергаментную бумагу для просушивания в хорошо вентилируемой комнате в течение 10—12 часов. Высушенные фильтровальные бумажки помещают в полиэтиленовые пакеты и проверяют их герметичность. В таком виде сухую сыворотку можно пересылать по почте и сохранять при комнатной температуре 2—3 месяца. Перед постановкой реакции серозащиты фильтровальную бумагу, содержащую сухую сыворотку, разрезают на квадратики величиной 2—3 мм и помещают в пенициллиновый флакон, в который наливают 5 мл физиологического раствора. Флакон ставят в холодильник при 4° на 16—20 часов, после чего жидкость отсасывают и используют в реакции.

щиты является обязательная гибель контрольных мышат, которым введен вирус, в то время как контрольные мышата, которым вводили только испытуемую сыворотку, должны выжить.

Примечание. Если контрольные мышата, которым вводили только сыворотку, погибли, определяют степень токсичности сыворотки для мышат-сосунов.

Для этого готовят разведения испытуемой сыворотки на физиологическом растворе — 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40 и по 0,2 мл вводят под кожу мышатам. На каждое разведение берут по четыре мышонка, за которыми наблюдают в течение двух суток. Наименьшее разведение испытуемой сыворотки, которое не вызвало гибели мышат, используют при повторении реакции.

Определение типа вируса ящура в патологическом материале. Тип вируса в патологическом материале при помощи реакции серозащиты определяют в том случае, если доставленный вируссодержащий материал не активен в реакции связывания комплемента.

Компоненты реакции: *физиологический раствор, мышата-сосуны в возрасте 4—7 дней, испытуемый вируссодержащий материал*, иммунные сыворотки.* В качестве иммунных сывороток используют сыворотку крови крупного рогатого скота, переболевшего ящуром типов О, А, С и др. Иммунные сыворотки получают из научно-исследовательского учреждения.

Постановка реакции. Иммунные сыворотки разводят физиологическим раствором с таким расчетом, чтобы в 0,2 мл разведения содержалось 50 нейтрализующих доз ($НД_{50}$). Степень разведения сыворотки определяют по таблице 16. Например, если титр сыворотки, указанный на этикетке в логарифмах с основанием 2, равен 10,22, то в третьей колонке таблицы 16 находят наиболее близкое к этому титру значение 10,2 и против него в четвертой колонке читают разведение сыворотки, которое необходимо сделать для получения 50 $НД_{50}$ в 0,2 мл. Это разведение равно 1 : 48.

Иммунные сыворотки типов О, А и С (а в случае необходимости и других типов) вводят мышатам-сосунам под кожу в дозе 50 $НД_{50}$ в 0,2 мл. Сыворотку каждого типа вводят четырем мышатам, которых помещают в клетку, подсаживают к ним четырех контрольных мышат и двух лактирующих маток. Мышат метят татуировкой.

---

* В лабораторию доставляют пораженный эпителий языка крупного рогатого скота, пятачка или вымени свиней, венчика копытец или десен мелкого рогатого скота и т. д.

Полученный патологический материал отмывают от загрязнений и консервирующей жидкости стерильным физиологическим раствором (pH 7,6) в чашке Петри, высушивают фильтровальной бумагой, взвешивают, измельчают ножницами, растирают в фарфоровой ступке с нейтральным стеклом до получения однородной массы. К 1 части гомогената ткани добавляют 9 частей физиологического раствора. Взвесь экстрагируют при комнатной температуре 30 минут и центрифугируют 15—20 минут при 3000—6000 об/мин. Надосадочную жидкость используют в качестве исходного вируссодержащего материала для реакции серозащиты.

ТАБЛИЦА 16

Разведения иммунных сывороток для получения 50 $НД_{50}$ в 0,2 мл (титр сыворотки выражен в логарифмах с основанием 2 в 0,1 мл)

Титр	Разведения сыворотки	Титр	Разведения сыворотки
5,6	1:2	9,0	1:20
5,7	1:2	9,1	1:22
5,8	1:2,2	9,2	1:24
5,9	1:2,4	9,3	1:25
6,0	1:2,6	9,4	1:27
6,1	1:2,8	9,5	1:29
6,2	1:3	9,6	1:31
6,3	1:3,2	9,7	1:33
6,4	1:3,4	9,8	1:36
6,5	1:3,6	9,9	1:38
6,6	1:3,8	10,0	1:40
6,7	1:4	10,1	1:44
6,8	1:4,4	10,2	1:48
6,9	1:4,8	10,3	1:50
7,0	1:5,2	10,4	1:54
7,1	1:5,6	10,5	1:58
7,2	1:6	10,6	1:60
7,3	1:6,4	10,7	1:66
7,4	1:6,8	10,8	1:70
7,5	1:7	10,9	1:76
7,6	1:8	11,0	1:80
7,7	1:8,5	11,1	1:88
7,8	1:9	11,2	1:94
7,9	1:9,5	11,3	1:100
8,0	1:10	11,4	1:108
8,1	1:11	11,5	1:116
8,2	1:12	11,6	1:120
8,3	1:13	11,7	1:132
8,4	1:14	11,8	1:140
8,5	1:15	11,9	1:152
8,6	1:16	12,0	1:160
8,7	1:17	12,1	1:176
8,8	1:18	12,2	1:189
8,9	1:19	12,3	1:200

Через 1—3 часа после введения сыворотки всем мышатам вводят подкожно по 0,2 мл суспензии испытуемого вируссодержащего материала и ежедневно наблюдают за ними.

Испытуемый вирус ящура относится к тому типу, против которого иммунная сыворотка защищает мышат от заболевания и гибели.

В таблице 17 приведен пример оценки результатов реакции серозащиты при определении типа вируса ящура в патологическом материале.

По результатам реакции серозащиты, приведенным в таблице 17, вирус ящура отнесен к типу О.

Определение вариантной принадлежности вируса ящура и соответствия эпизоотических

штаммов вируса производственным. Компоненты реакции: *физиологический раствор; мышата-сосуны 7-дневного возраста; испытуемый вирус ящура* *;

ТАБЛИЦА 17

Иммунные сыворотки	Мышата	Метки мышат
О	О О О О	Голова
А	∅ ∅ ∅ ∅	Спина
С	∅ ∅ ∅ ∅	Хвост
Без сыворотки	∅ ∅ ∅ ∅	Без метки

Примечание. О — живой мышонок; ∅ — павший мышонок.

эталоны вариантных и производственных штаммов вируса ящура, адаптированные к организму мышат-сосунов **, *иммунные сыворотки крупного рогатого скота* на вариантные штаммы вируса ящура получают от научно-исследовательского учреждения ***.

Если нет возможности получить иммунные сыворотки в очаге эпизоотии, их готовят в научно-исследовательском учреждении. Для этого эпизоотическим штаммом вируса заражают крупный рогатый скот (1—2 головы) в возрасте 1,5—2 лет и на 20-й день после заражения получают сыворотку.

Сыворотку проверяют на токсичность на мышатах-сосунах.

Для этого ее разводят физиологическим раствором 1 : 2 и вводят по 0,2 мл четырем мышатам-сосунам, за которыми наблюдают в течение 1—2 дней. Мышата должны остаться живыми; если они погибли, сыворотку выбраковывают.

После проверки на токсичность иммунную сыворотку исследуют на вирусонейтрализующую активность против гомологичного вируса.

Для титрования сыворотки в штатив ставят 11 пробирок и нумеруют их порядковыми номерами. Во все пробирки наливают по 1 мл физиологического раствора. В первую пробирку вносят 1 мл испытуемой сыворотки, смешивают и 1 мл смеси переносят во вторую пробирку и так далее, до конца ряда.

После этого делают разведения вируса, гомологичного сыворотке, с таким расчетом, чтобы в 1 мл разведения содержалось 1000 LD_{50} вируса. Для определения нужного разведения вируса пользуются таблицей 14.

* Вначале его адаптируют к мышатам-сосунам. Для этого готовят вируссодержащую суспензию (см. стр. 22) и вводят ее под кожу 10—20 мышатам-сосунам в дозе 0,2 мл. Мышат помещают в клетку и подсаживают к ним 1—2 лактирующих маток. Осматривают мышат 3—4 раза в сутки. Павших и больных, с характерными симптомами ящура, отбирают и из их тушек готовят 10%-ную суспензию на физиологическом растворе, как описано выше (см. стр. 23). Полученной суспензией заражают мышат следующей группы (второй пассаж) аналогичным методом. Таким образом проводят 4—6 пассажей. Вирус ящура считают адаптированным к организму мышат-сосунов в том случае, если мышата погибают через 20—30 часов после заражения; титр вируса на мышатах-сосунах, выраженный в логарифмах с основанием 10, достигает 7,0 и выше; комплементфиксирующая активность антигенов, приготовленных из тушек павших мышат, становится постоянной (в пределах 1 : 4—1 : 8). Титрацию вируса проводят по вышеописанной методике (стр. 22).

** Получают из научно-исследовательского учреждения.

*** Иммунную сыворотку на испытуемый штамм вируса ящура можно получить в очаге эпизоотии от переболевших животных на 18—21-й день после заболевания. Сыворотку нельзя брать от животных, ранее вакцинированных против ящура или переболевших ящуром повторно.

Например, если десятичный логарифм титра вируса в 1 г вируссодержащего материала равен 8,46, то в четвертой колонке таблицы находят наиболее близкое к этому показателю значение — 8,45, а в пятой колонке читают нужное разведение вируса 1 : 2800. Для получения данного разведения берут 0,1 мл исходной вируссодержащей суспензии, которая хранится в холодильнике, и разводят в 9,9 мл физиологического раствора. После этого берут 1 мл полученного разведения вируса и разводят его в 27 мл физиологического раствора.

Во все пробирки с разведениями сыворотки вносят по 1 мл полученного разведения вируса. Штатив с пробирками встряхивают и помещают в термостат на 1 час при 37°. Затем смесь каждого разведения сыворотки с постоянной дозой вируса инокулируют четырем мышатам в объеме по 0,2 мл. Мышат метят татуировкой и помещают в клетку, в которую подсаживают четырех контрольных мышат и четырех лактирующих маток. Наблюдают за мышатами в течение 7 дней, отмечая падеж в специальном журнале.

Титр сыворотки рассчитывают по методу Рида и Менча. Однако при этом вычисляют не процент летальности, а процент выживаемости мышат в каждом разведении сыворотки и в формуле $\frac{L_1 - 50}{L_1 - L_2} + K$ исключают коэффициент (К). Титр сыворотки выражают в логарифмах с основанием 2 против 1000 LD_{50} вируса.

Одновременно с титрованием сывороток проводят контрольную титрацию вируса. Для этого в штатив ставят пять пробирок и наливают в них по 1,8 мл физиологического раствора. Затем в пробирку № 1 наливают 0,2 мл вируссодержащей суспензии, которая применялась при титровании сыворотки. Стерильной пипеткой смешивают содержимое первой пробирки и 0,2 мл смеси переносят во вторую пробирку и так далее, до конца ряда. Разведенный вирус инъецируют мышатам-сосунам по вышеописанной методике.

Если доза вируса взята правильно, то логарифм титра вируса должен быть равен 3. Результаты опыта можно учитывать в том случае, если логарифм титра вируса составляет от 2,5 до 3,5. При получении более высокого или более низкого титра вируса в суспензии титрацию сыворотки повторяют, при этом производят поправку титра вируса в исходной суспензии, исходя из данных, полученных при титрации.

Постановка реакции. В качестве примера приводим методику постановки реакции серозащиты на мышатах-сосунах для определения соответствия двух штаммов вируса ящура (эпизоотического и производственного), которая может быть применена при определении вариантной принадлежности эпизоотического штамма вируса ящура (А. И. Собко, Ю. Ф. Нестерова и др., 1970).

Для постановки реакции серозащиты с целью определения соответствия двух штаммов вируса ящура отбирают 208 мышат-сосунов в возрасте 4—7 дней и 18 лактирующих маток. Мышат помещают в шесть клеток в количестве, указанном в таблице 18. В каждую клетку подсаживают трех лактирующих маток.

Иммунные сыворотки разводят физиологическим раствором с таким расчетом, чтобы в 0,2 мл разведения содержалось 50 $НД_{50}$ сыворотки, применяя вышеописанную методику (табл. 16).

ТАБЛИЦА 18

Иммунные сыворотки	Штамм вируса ящура			
	производственный		эпизоотический	
	№ клетки	количество мышат	№ клетки	количество мышат
На производственный штамм вируса	1	36	4	36
На эпизоотический штамм вируса	2	36	5	36
Без сыворотки	3	32	6	32

Мышатам-сосунам, находящимся в клетках 1 и 4, вводят подкожно по 0,2 мл полученного разведения иммунной сыворотки на производственный штамм. В каждой клетке сыворотку вводят 32 мышатам, а четырех метят татуировкой и оставляют в качестве контрольных.

Мышатам в клетках 2 и 5 вводят подкожно по 0,2 мл разведения иммунной сыворотки против эпизоотического штамма (32 мышатам вводят сыворотку и четырех оставляют для контроля).

Через 1—3 часа после введения сыворотки на мышатах, находящихся в клетках 1, 2, 3, титруют производственный штамм вируса ящура; на мышатах в клетках 4, 5 и 6 титруют эпизоотический штамм вируса.

Титрацию обоих штаммов вируса ящура и учет результатов проводят по вышеописанной методике (стр. 22—23) с той лишь разницей, что перед постановкой реакции вирусы уравнивают по титру. Для этого делают разведения производственного и эпизоотического штаммов вируса ящура, пользуясь таблицей 19.

Например, при титре вируса, равном 8,46, в первой колонке таблицы находят наиболее близкое к данному титру значение 8,45 и против него во второй колонке читают разведение 1 : 28. Это означает, что в первую пробирку нужно налить исходную вируссодержащую суспензию в разведении 1 : 28. При такой постановке реакции титры обоих штаммов вируса будут равняться примерно 7,0 (в логарифмах с основанием 10).

Титры вируса, полученные на мышатах-сосунах во всех шести клетках, заносят в таблицу и рассчитывают индексы защиты (И. З.) для обеих сывороток по отношению к гомологичному и гетерологичному штаммам вируса ящура.

В качестве примера в таблице 20 приведены результаты опыта.

Индекс защиты рассчитывают вычитанием из логарифма титра вируса на мышатах-сосунах, которым не вводили сыворотки, логарифма титра вируса на мышатах, которым предварительно ввели иммунную сыворотку.

Расчет значения *в* проводят вычитанием из логарифма титра производственного штамма вируса на мышатах в клетке 3 лога-

ТАБЛИЦА 19

Разведения вируссодержащей суспензии (1 : 10), которые нужно взять взамен разведения 10^{-1}, для получения титра вируса, десятичный логарифм которого в грамме вируссодержащего материала равен 7,0 (титр вируса выражен в десятичных логарифмах в грамме материала)

Титр вируса	Разведение вируса	Титр вируса	Разведение вируса	Титр вируса	Разведение вируса
7,0	цельная	8,5	1:32	10,0	1: 1 000
7,05	1:1,1	8,55	1:35	10,05	1: 1 100
7,1	1:1,2	8,6	1:40	10,1	1: 1 200
7,15	1:1,4	8,65	1:46	10,15	1: 1 400
7,2	1:1,6	8,7	1:50	10,2	1: 1 600
7,25	1:1,8	8,75	1:56	10,25	1: 1 800
7,3	1:2	8,8	1:63	10,3	1: 2 000
7,35	1:2,2	8,85	1:70	10,35	1: 2 200
7,4	1:2,5	8,9	1:80	10,4	1: 2 500
7,45	1:2,8	8,95	1:90	10,45	1: 2 800
7,5	1:3,2	9,0	1:100	10,5	1: 3 200
7,55	1:3,5	9,05	1:110	10,55	1: 3 500
7,6	1:4	9,1	1:120	10,6	1: 4 000
7,65	1:4,6	9,15	1:140	10,65	1: 4 600
7,7	1:5	9,2	1:160	10,7	1: 5 000
7,75	1:5,6	9,25	1:180	10,75	1: 5 600
7,8	1:6,3	9,3	1:200	10,8	1: 6 300
7,85	1:7	9,35	1:220	10,85	1: 7 000
7,9	1:8	9,4	1:250	10,9	1: 8 000
7,95	1:9	9,45	1:280	10,95	1: 9 000
8,0	1:10	9,5	1:320	11,0	1:10 000
8,05	1:11	9,55	1:350	11,05	1:11 000
8,1	1:12	9,6	1:400	11,1	1:12 000
8,15	1:14	9,65	1:460	11,15	1:14 000
8,2	1:16	9,7	1:500	11,2	1:16 000
8,25	1:18	9,75	1:560	11,25	1:18 000
8,3	1:20	9,8	1:630	11,3	1:20 000
8,35	1:22	9,85	1:700	11,35	1:22 000
8,4	1:25	9,9	1:800	11,4	1:25 000
8,45	1:28	9,95	1:900	11,45	1:28 000

ТАБЛИЦА 20

Иммунные сыворотки	Штамм вируса ящура					
	производственный			эпизоотический		
	титр	И. З.	условные обозначения	титр	И. З.	условные обозначения
На производственный штамм вируса	3,66	3,54	b	5,0	1,9	a
На эпизоотический штамм вируса	5,5	1,7	a_1	4,9	2,00	b_1
Без сыворотки	7,2	—	—	6,9	—	

рифма титра вируса производственного штамма в клетке 1. В данном примере: 7,2−3,66=3,54.

Значение a получают вычитанием из логарифма титра вируса эпизоотического штамма в клетке 6 логарифма титра вируса эпизоотического штамма в клетке 4. В данном случае: 6,9−5,0=1,9.

Таким же методом рассчитывают индексы защиты сыворотки, полученной на эпизоотический штамм вируса.

В данном примере значение a_1 равно 7,2−5,5=1,7, а значение b_1 равно 6,9—4,9=2,0.

После того как будут рассчитаны индексы защиты сывороток, определяют антигенное родство штаммов по формуле:

$$R\% = \sqrt{r_1 \cdot r_2} \cdot 100,$$

где: $R\%$ — степень антигенного родства штаммов вируса ящура, выраженная в процентах.

$$r_1 = \frac{a}{b}; \quad r_2 = \frac{a_1}{b_1},$$

где: a — И. З. сыворотки производственного штамма по отношению к вирусу эпизоотического штамма;

b — И. З. сыворотки производственного штамма по отношению к вирусу производственного штамма;

a_1 — И. З. сыворотки эпизоотического штамма по отношению к вирусу производственного штамма.

b_1 — И. З. сыворотки эпизоотического штамма по отношению к вирусу эпизоотического штамма.

Значения r_1 и r_2 находят по таблице 21.

Величины a и a_1 идентичны и даны в верхней строке таблицы. Величины b и b_1 также идентичны и даны в первой колонке:

В данном примере r_1 равно $\frac{a}{b} = \frac{1,9}{3,54}$.

В верхней строке таблицы 21 находят величину 1,9, а в первой колонке таблицы — наиболее близкое к 3,54 число 3,5 и на пересечении строк, на которых стоят эти числа, находят значение r_1, равное 0,55.

Таким же способом находят значение r_2, равное $\frac{a_1}{b_1} = \frac{1,7}{2,0}$. Числа 1,7 и 2,0 находят в той же таблице и на пересечении строк отыскивают значение r_2, которое равно 0,85.

Во всех случаях, когда a равно или больше b, значение r приравнивается к единице, а если a равно нулю, то r приравнивается к 0,02.

После того как определены значения r_1 и r_2, по таблице 22 находят величину R %. Для этого в верхней строке таблицы 22 находят значение r_1, а в первой колонке — значение r_2. В данном примере r_1 равно 0,55, поэтому берут наиболее близкое к нему табличное значение — 0,54, а r_2 равно 0,85, поэтому берут наиболее

близкое к нему значение 0,86. На пересечении строк, на которых стоят эти числа, находят значение R %, равное 68%.

Если значение r_1 округлить до большей величины — 0,56, то значение r_2 необходимо округлять до меньшей величины — 0,84. В этом случае на пересечении строк таблицы также получим величину R %, равную 68%.

Штаммы вируса ящура считаются идентичными в том случае, если антигенное родство R % составляет от 70 до 100%.

Штаммы вируса ящура, имеющие антигенное родство от 15 до 70%, относят к различным вариантам одного и того же типа вируса. Штаммы вируса с антигенным родством от 0 до 15% относят к различным типам вируса.

При определении вариантной принадлежности штамма вируса ящура или соответствия эпизоотического штамма вируса производственному реакцию серозащиты повторяют не менее 2—3 раз и на основании полученных средних данных рассчитывают антигенное родство R%.

Примечание. При подготовке к реакции серозащиты каждый штамм вируса хранят в отдельном флаконе, помещенном в металлический контейнер. Расплодку и титрование каждого штамма вируса проводят в отдельном помещении. При этом пользуются халатами, оборудованием, инструментами, растворами, посудой и т. п., строго закрепленными за данным помещением.

Животных, зараженных испытуемым штаммом, содержат в отдельном боксе. Ухаживают за ними лица, закрепленные для работы с животными, зараженными только одним штаммом вируса.

Реакцию серозащиты ставят в отдельном боксе.

Определение типа вируса ящура по сыворотке крови переболевших животных в реакции диффузионной преципитации* (ретроспективная диагностика). Компоненты реакции. Антигены. Для постановки РДП используют антигены из очищенного и концентрированного лапинизированного вируса ящура различных типов. Для приготовления антигенов берут мышечную ткань крольчат 2—3-дневного возраста, обескровленных в агональном состоянии после инфицирования соответствующими штаммами лапинизированного вируса ящура.

Полученную тканевую суспензию в соотношении 1 : 5 с фосфатным буфером pH 7,6 двукратно замораживают при минус 20°, оттаивают в условиях термостата, центрифугируют при 3000 об/мин 15—20 минут и очищают хлороформом. Для этого к суспензии добавляют 20% химически чистого хлороформа и гомогенизируют 7 минут в электроизмельчителе при 8000 об/мин. Затем после выдерживания суспензии в течение 30 минут в холодильнике при 4° ее повторно гомогенизируют еще 5 минут.

После центрифугирования при 6000 об/мин в течение 40 минут надосадочную жидкость, содержащую основную массу вируса, сливают, пропуская через ватный фильтр в целях удаления липоидных пленок, и используют для концентрирования, предварительно разбавив 1 : 1 фосфатно-солевым раствором pH 7,6.

---

* Данная реакция усовершенствована для идентификации штаммов вируса ящура сотрудниками ВНИИЯИ А. Собко, Ю. Нестеровой, Ю. Черняевым и Б. Прохоровым (1970) и рекомендована для практического применения.

Реакцию ставят в чашках Петри или в микромодификации на предметных стеклах. Микромодификация позволяет в 2 раза уменьшить количество используемых в реакции реагентов, сократить время реакции и является более чувствительной по сравнению с реакцией, поставленной в чашках Петри.

Определение значений r_1 и r_2

b \ a	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5
0,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,2	0,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,3	0,33	0,66	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,4	0,25	0,50	0,75	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,5	0,20	0,40	0,60	0,80	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,6	0,16	0,33	0,50	0,66	0,8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,7	0,14	0,30	0,43	0,57	0,71	0,85	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,8	0,12	0,25	0,37	0,50	0,62	0,75	0,87	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
0,9	0,12	0,22	0,33	0,44	0,55	0,66	0,77	0,88	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
1,0	0,10	0,20	0,30	0,40	0,50	0,60	0,70	0,80	0,90	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
1,1	0,09	0,19	0,28	0,37	0,45	0,54	0,63	0,72	0,81	0,91	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
1,2	0,09	0,17	0,25	0,33	0,42	0,50	0,58	0,66	0,75	0,83	0,91	1,0	1,0	1,0	1,0
1,3	0,08	0,15	0,23	0,31	0,40	0,46	0,54	0,61	0,70	0,77	0,84	0,92	1,0	1,0	1,0
1,4	0,08	0,14	0,21	0,30	0,36	0,43	0,50	0,57	0,64	0,71	0,80	0,86	0,92	1,0	1,0
1,5	0,07	0,13	0,20	0,27	0,33	0,40	0,46	0,53	0,60	0,66	0,73	0,80	0,87	0,93	1,0
1,6	0,06	0,13	0,19	0,25	0,31	0,37	0,43	0,50	0,56	0,62	0,68	0,75	0,81	0,87	0,93
1,7	0,06	0,12	0,18	0,23	0,30	0,35	0,41	0,47	0,53	0,58	0,64	0,70	0,76	0,82	0,88
1,8	0,05	0,11	0,17	0,22	0,28	0,33	0,39	0,44	0,50	0,55	0,61	0,67	0,72	0,78	0,83
1,9	0,05	0,11	0,16	0,21	0,26	0,31	0,36	0,42	0,47	0,53	0,58	0,63	0,68	0,73	0,79
2,0	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,70	0,75
2,1	0,05	0,10	0,14	0,19	0,24	0,29	0,34	0,39	0,43	0,47	0,53	0,58	0,62	0,66	0,71
2,2	0,05	0,10	0,14	0,18	0,23	0,27	0,32	0,36	0,41	0,45	0,50	0,54	0,59	0,64	0,68
2,3	0,04	0,09	0,13	0,18	0,21	0,36	0,30	0,35	0,39	0,43	0,47	0,52	0,56	0,61	0,65
2,4	0,04	0,09	0,13	0,17	0,21	0,25	0,29	0,33	0,37	0,41	0,46	0,50	0,54	0,58	0,62
2,5	0,04	0,08	0,12	0,16	0,20	0,24	0,28	0,32	0,36	0,40	0,44	0,48	0,52	0,56	0,60
2,6	0,04	0,08	0,12	0,15	0,20	0,23	0,26	0,31	0,35	0,38	0,42	0,46	0,50	0,54	0,60
2,7	0,04	0,07	0,11	0,15	0,19	0,22	0,26	0,30	0,33	0,37	0,41	0,44	0,48	0,52	0,56

2,8	0,04	0,07	0,11	0,14	0,18	0,21	0,25	0,28	0,32	0,36	0,39	0,43	0,46	0,50	0,53
2,9	0,04	0,07	0,10	0,14	0,18	0,21	0,24	0,27	0,31	0,34	0,37	0,41	0,44	0,48	0,51
3,0	0,03	0,07	0,10	0,13	0,17	0,20	0,23	0,26	0,30	0,33	0,36	0,40	0,43	0,46	0,50
3,1	0,03	0,06	0,10	0,13	0,16	0,19	0,22	0,25	0,29	0,32	0,35	0,38	0,42	0,45	0,48
3,2	0,03	0,06	0,09	0,13	0,16	0,19	0,22	0,25	0,28	0,31	0,34	0,37	0,41	0,43	0,47
3,3	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15	0,18	0,21	0,24	0,27	0,30	0,33	0,36	0,39	0,42	0,45
3,4	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15	0,18	0,21	0,24	0,26	0,29	0,30	0,35	0,38	0,41	0,44
3,5	0,03	0,06	0,09	0,12	0,14	0,17	0,20	0,23	0,26	0,29	0,31	0,34	0,37	0,40	0,43
3,6	0,03	0,05	0,08	0,11	0,14	0,17	0,20	0,22	0,25	0,28	0,30	0,33	0,36	0,39	0,41
3,7	0,03	0,05	0,08	0,11	0,13	0,16	0,19	0,21	0,24	0,27	0,29	0,32	0,35	0,38	0,40
3,8	0,03	0,03	0,08	0,10	0,13	0,16	0,18	0,21	0,24	0,26	0,29	0,31	0,34	0,37	0,39
3,9	0,03	0,05	0,08	0,10	0,12	0,15	0,18	0,20	0,23	0,26	0,28	0,31	0,33	0,36	0,38
4,0	0,02	0,05	0,08	0,10	0,12	0,15	0,18	0,20	0,22	0,25	0,27	0,30	0,32	0,35	0,37
4,2	0,02	0,05	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,19	0,21	0,23	0,26	0,28	0,31	0,33	0,36
4,4	0,02	0,04	0,07	0,09	0,11	0,13	0,15	0,18	0,20	0,22	0,24	0,26	0,29	0,31	0,34
4,6	0,02	0,04	0,07	0,09	0,11	0,13	0,15	0,18	0,20	0,21	0,24	0,25	0,28	0,30	0,32
4,8	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,17	0,19	0,21	0,23	0,25	0,27	0,29	0,31
5,0	0,02	0,04	0,06	0,08	0,10	0,12	0,14	0,16	0,18	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28	0,30
5,2	0,02	0,04	0,06	0,08	0,09	0,11	0,13	0,15	0,17	0,19	0,21	0,23	0,25	0,27	0,29
5,4	0,02	0,04	0,05	0,07	0,09	0,11	0,13	0,14	0,16	0,18	0,20	0,22	0,24	0,26	0,28
5,6	0,02	0,04	0,05	0,07	0,09	0,11	0,12	0,14	0,16	0,18	0,19	0,21	0,23	0,25	0,27
5,8	0,02	0,03	0,05	0,07	0,08	0,10	0,12	0,14	0,15	0,17	0,19	0,21	0,22	0,24	0,26
6,0	0,02	0,03	0,05	0,07	0,08	0,10	0,11	0,13	0,15	0,17	0,18	0,20	0,22	0,23	0,25
6,2	0,02	0,03	0,05	0,06	0,08	0,09	0,11	0,13	0,14	0,16	0,17	0,19	0,21	0,22	0,24
6,4	0,01	0,03	0,04	0,06	0,08	0,09	0,11	0,12	0,14	0,15	0,17	0,19	0,20	0,22	0,23
6,6	0,01	0,03	0,04	0,06	0,07	0,09	0,10	0,12	0,13	0,14	0,16	0,18	0,20	0,21	0,22
6,8	0,01	0,03	0,04	0,06	0,07	0,09	0,10	0,11	0,13	0,14	0,16	0,17	0,19	0,21	0,22
7,0	0,01	0,03	0,04	0,05	0,07	0,08	0,10	0,11	0,13	0,14	0,15	0,16	0,18	0,19	0,21
7,2	0,01	0,03	0,04	0,05	0,07	0,08	0,09	0,11	0,12	0,14	0,15	0,16	0,18	0,19	0,20
7,4	0,01	0,03	0,04	0,05	0,07	0,08	0,09	0,10	0,12	0,13	0,14	0,16	0,17	0,18	0,20
7,6	0,01	0,02	0,04	0,05	0,06	0,07	0,09	0,10	0,11	0,12	0,14	0,15	0,16	0,17	0,19
8,0	0,01	0,02	0,04	0,05	0,06	0,07	0,09	0,10	0,11	0,12	0,14	0,15	0,16	0,17	0,19

Продолжение

b \ a	1,6	1,7	1,8	1,9	2,0	2,1	2,2	2,3	2,4	2,5	2,6	2,7	2,8	2,9	3,0
1,6	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
1,7	0,93	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
1,8	0,88	0,93	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
1,9	0,84	0,89	0,94	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2,0	0,80	0,85	0,90	0,95	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2,1	0,76	0,81	0,86	0,90	0,95	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2,2	0,73	0,77	0,82	0,86	0,91	0,96	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2,3	0,69	0,74	0,78	0,82	0,87	0,91	0,96	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2,4	0,67	0,71	0,75	0,80	0,83	0,87	0,91	0,96	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2,5	0,64	0,68	0,72	0,76	0,80	0,84	0,88	0,92	0,96	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2,6	0,61	0,65	0,70	0,73	0,77	0,81	0,84	0,88	0,92	0,96	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2,7	0,59	0,63	0,66	0,70	0,75	0,77	0,81	0,85	0,90	0,92	0,96	1,0	1,0	1,0	1,0
2,8	0,56	0,61	0,64	0,68	0,71	0,75	0,78	0,82	0,86	0,89	0,92	0,96	1,0	1,0	1,0
2,9	0,54	0,58	0,62	0,66	0,70	0,73	0,76	0,80	0,82	0,86	0,90	0,93	0,96	1,0	1,0
3,0	0,53	0,56	0,60	0,63	0,66	0,70	0,73	0,77	0,80	0,83	0,86	0,90	0,93	0,96	1,0
3,1	0,51	0,55	0,58	0,61	0,64	0,70	0,71	0,74	0,77	0,80	0,84	0,87	0,90	0,93	0,96
3,2	0,50	0,53	0,56	0,59	0,62	0,66	0,68	0,72	0,75	0,77	0,81	0,84	0,89	0,90	0,94
3,3	0,48	0,51	0,54	0,57	0,61	0,64	0,66	0,69	0,73	0,76	0,79	0,80	0,84	0,88	0,90
3,4	0,47	0,50	0,53	0,56	0,59	0,62	0,64	0,67	0,70	0,73	0,76	0,79	0,82	0,85	0,88
3,5	0,46	0,49	0,52	0,55	0,57	0,60	0,62	0,65	0,68	0,71	0,74	0,77	0,80	0,83	0,86
3,6	0,44	0,47	0,50	0,53	0,55	0,58	0,60	0,64	0,67	0,69	0,72	0,75	0,78	0,80	0,83
3,7	0,43	0,46	0,49	0,51	0,54	0,56	0,58	0,62	0,65	0,67	0,70	0,73	0,75	0,78	0,81
3,8	0,42	0,44	0,47	0,50	0,52	0,55	0,56	0,60	0,64	0,66	0,68	0,71	0,73	0,76	0,80
3,9	0,41	0,43	0,46	0,48	0,51	0,54	0,55	0,59	0,61	0,64	0,66	0,69	0,72	0,74	0,77
4,0	0,40	0,42	0,45	0,47	0,60	0,52	0,54	0,58	0,60	0,62	0,65	0,67	0,70	0,72	0,75
4,1	0,39	0,41	0,44	0,46	0,49	0,51	0,53	0,56	0,59	0,61	0,63	0,66	0,68	0,71	0,73
4,2	0,38	0,40	0,43	0,45	0,48	0,50	0,51	0,55	0,57	0,59	0,62	0,64	0,66	0,69	0,71
4,3	0,37	0,39	0,42	0,44	0,47	0,49	0,50	0,53	0,56	0,58	0,60	0,63	0,65	0,68	0,70
4,4	0,36	0,38	0,41	0,43	0,46	0,48	0,49	0,52	0,54	0,57	0,59	0,61	0,64	0,66	0,68
4,5	0,36	0,37	0,40	0,42	0,44	0,47	0,48	0,51	0,53	0,55	0,58	0,60	0,62	0,64	0,66

4,6	0,36	0,37	0,39	0,41	0,43	0,46	0,47	0,50	0,52	0,54	0,56	0,59	0,61	0,63	0,65
4,7	0,34	0,36	0,38	0,40	0,42	0,45	0,46	0,49	0,51	0,53	0,55	0,57	0,60	0,62	0,64
4,8	0,33	0,36	0,37	0,39	0,42	0,44	0,45	0,48	0,50	0,52	0,54	0,56	0,58	0,60	0,62
4,9	0,32	0,35	0,36	0,38	0,41	0,43	0,44	0,47	0,49	0,51	0,53	0,55	0,57	0,59	0,61
5,0	0,32	0,34	0,36	0,38	0,40	0,42	0,44	0,46	0,48	0,50	0,52	0,54	0,56	0,58	0,60
5,1	0,31	0,33	0,35	0,37	0,39	0,41	0,43	0,45	0,47	0,49	0,51	0,53	0,55	0,57	0,59
5,2	0,31	0,32	0,34	0,36	0,38	0,40	0,42	0,44	0,46	0,48	0,50	0,52	0,54	0,56	0,58
5,3	0,30	0,32	0,34	0,36	0,37	0,39	0,41	0,43	0,45	0,47	0,49	0,51	0,53	0,55	0,57
5,4	0,30	0,31	0,33	0,35	0,37	0,38	0,40	0,42	0,44	0,46	0,48	0,50	0,52	0,54	0,56
5,5	0,29	0,31	0,33	0,34	0,36	0,38	0,40	0,42	0,44	0,45	0,47	0,49	0,51	0,53	0,54
5,6	0,28	0,30	0,32	0,34	0,36	0,38	0,39	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48	0,50	0,52	0,53
5,7	0,28	0,30	0,31	0,33	0,35	0,37	0,38	0,40	0,42	0,44	0,45	0,47	0,49	0,51	0,52
5,8	0,28	0,29	0,31	0,33	0,34	0,36	0,38	0,39	0,41	0,43	0,45	0,46	0,48	0,50	0,52
5,9	0,27	0,29	0,30	0,32	0,33	0,35	0,37	0,38	0,40	0,42	0,44	0,45	0,48	0,49	0,51
6,0	0,27	0,28	0,30	0,31	0,33	0,35	0,37	0,38	0,40	0,42	0,43	0,45	0,47	0,48	0,50
6,1	0,26	0,28	0,29	0,30	0,32	0,34	0,36	0,38	0,39	0,41	0,42	0,44	0,46	0,47	0,49
6,2	0,26	0,27	0,29	0,30	0,32	0,34	0,35	0,37	0,39	0,40	0,42	0,43	0,45	0,46	0,48
6,3	0,25	0,27	0,28	0,30	0,31	0,33	0,34	0,36	0,38	0,40	0,41	0,43	0,44	0,46	0,48
6,4	0,25	0,26	0,28	0,29	0,31	0,33	0,34	0,36	0,37	0,39	0,40	0,42	0,43	0,45	0,47
6,5	0,24	0,26	0,28	0,29	0,31	0,32	0,34	0,35	0,37	0,38	0,40	0,41	0,43	0,44	0,46
6,6	0,24	0,26	0,27	0,28	0,30	0,32	0,33	0,35	0,36	0,38	0,39	0,40	0,42	0,44	0,45
6,7	0,24	0,25	0,26	0,28	0,30	0,31	0,33	0,34	0,35	0,37	0,38	0,40	0,42	0,43	0,45
6,8	0,23	0,25	0,26	0,28	0,29	0,31	0,32	0,34	0,36	0,37	0,38	0,39	0,41	0,42	0,44
6,9	0,23	0,24	0,26	0,27	0,29	0,30	0,32	0,33	0,35	0,36	0,37	0,39	0,40	0,42	0,43
7,0	0,23	0,24	0,25	0,27	0,29	0,30	0,31	0,33	0,34	0,36	0,37	0,38	0,40	0,41	0,43
7,1	0,22	0,24	0,25	0,27	0,28	0,29	0,31	0,32	0,33	0,35	0,36	0,38	0,39	0,40	0,42
7,2	0,22	0,23	0,25	0,26	0,28	0,29	0,30	0,32	0,33	0,34	0,36	0,37	0,39	0,40	0,41
7,3	0,22	0,23	0,24	0,26	0,27	0,29	0,30	0,32	0,33	0,33	0,36	0,36	0,38	0,39	0,40
7,6	0,21	0,23	0,24	0,26	0,27	0,28	0,29	0,30	0,31	0,32	0,34	0,35	0,37	0,38	0,39
8,0	0,20	0,21	0,22	0,24	0,25	0,26	0,27	0,29	0,30	0,31	0,32	0,34	0,35	0,36	0,37

Продолжение

b \ a	3,1	3,2	3,3	3,4	3,5	3,6	3,7	3,8	3,9	4,0	4,1	4,2	4,3	4,4	4,5
3,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3,2	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3,3	0,94	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3,4	0,91	0,94	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3,5	0,89	0,91	0,94	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3,6	0,86	0,89	0,92	0,94	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3,7	0,84	0,86	0,89	0,92	0,94	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3,8	0,82	0,84	0,87	0,90	0,92	0,94	0,97	1,0	1,0	1.0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3,9	0,79	0,82	0,84	0,88	0,90	0,92	0,94	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4,0	0,77	0,80	0,82	0,85	0,87	0,90	0,92	0,95	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4,1	0,76	0,78	0,80	0,83	0,85	0,88	0,90	0,92	0,95	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4,2	0,74	0,76	0,78	0,81	0,83	0,86	0,88	0,90	0,93	0,95	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0
4,3	0,72	0,74	0,76	0,79	0,81	0,84	0,86	0,88	0,90	0,93	0,95	0,98	1,0	1,0	1,0
4,4	0,70	0,73	0,75	0,77	0,80	0,82	0,84	0,86	0,89	0,91	0,93	0,96	0,98	1,0	1,0
4,5	0,69	0,71	0,73	0,75	0,78	0,80	0,82	0,84	0,87	0,89	0,91	0,93	0,96	0,98	1,0
4,6	0,67	0,69	0,72	0,74	0,76	0,78	0,80	0,82	0,85	0,87	0,89	0,91	0,93	0,96	0,98
4,7	0,66	0,68	0,70	0,72	0,74	0,76	0,78	0,81	0,83	0,85	0,87	0,90	0,91	0,93	0,96
4,8	0,65	0,66	0,69	0,71	0,73	0,75	0,76	0,79	0,81	0,83	0,85	0,88	0,90	0,92	0,94
4,9	0,63	0,65	0,68	0,70	0.72	0,74	0,76	0,78	0,80	0.82	0,84	0,86	0,88	0,90	0,92
5,0	0,62	0,64	0,66	0,68	0,70	0,72	0,74	0,76	0,78	0,80	0,82	0,84	0,86	0,88	0,90

5,1	0,61	0,63	0,65	0,67	0,68	0,70	0,72	0,74	0,76	0,78	0,80	0,82	0,84	0,86	0,88	
5,2	0,60	0,62	0,64	0,65	0,67	0,69	0,70	0,73	0,75	0,77	0,78	0,81	0,82	0,84	0,86	
5,3	0,58	0,60	0,62	0,64	0,66	0,68	0,70	0,72	0,74	0,75	0,77	0,79	0,81	0,82	0,84	
5,4	0,57	0,59	0,61	0,63	0,65	0,66	0,68	0,70	0,72	0,74	0,76	0,78	0,80	0,81	0,83	
5,5	0,56	0,58	0,60	0,62	0,64	0,65	0,67	0,69	0,71	0,73	0,74	0,76	0,78	0,80	0,82	
5,6	0,53	0,57	0,59	0,61	0,62	0,64	0,66	0,68	0,70	0,72	0,73	0,75	0,77	0,78	0,80	
5,7	0,54	0,56	0,58	0,60	0,61	0,63	0,65	0,67	0,68	0,70	0,72	0,74	0,76	0,77	0,79	
5,8	0,53	0,55	0,57	0,59	0,60	0,62	0,64	0,66	0,67	0,69	0,70	0,73	0,74	0,74	0,78	
5,9	0,52	0,54	0,56	0,58	0,59	0,61	0,63	0,64	0,66	0,68	0,70	0,71	0,73	0,74	0,76	
6,0	0,52	0,53	0,55	0,57	0,58	0,60	0,62	0,63	0,65	0,67	0,68	0,70	0,72	0,73	0,75	
6,1	0,51	0,52	0,54	0,56	0,57	0,59	0,61	0,62	0,64	0,66	0,67	0,68	0,70	0,72	0,74	
6,2	0,50	0,51	0,53	0,55	0,56	0,58	0,60	0,61	0,63	0,64	0,66	0,68	0,69	0,71	0,72	
6,3	0,49	0,50	0,52	0,54	0,55	0,57	0,59	0,60	0,62	0,63	0,65	0,67	0,68	0,70	0,71	
6,4	0,48	0,50	0,51	0,53	0,55	0,56	0,58	0,59	0,61	0,62	0,64	0,66	0,67	0,69	0,70	
6,5	0,48	0,49	0,50	0,52	0,54	0,55	0,57	0,58	0,60	0,61	0,63	0,65	0,66	0,68	0,69	
6,6	0,47	0,48	0,49	0,51	0,53	0,54	0,56	0,58	0,59	0,60	0,62	0,64	0,65	0,66	0,68	
6,7	0,47	0,48	0,49	0,50	0,52	0,54	0,55	0,57	0,58	0,60	0,61	0,63	0,64	0,66	0,67	
6,8	0,46	0,47	0,48	0,50	0,52	0,53	0,54	0,56	0,57	0,59	0,60	0,62	0,63	0,65	0,66	
6,9	0,45	0,47	0,48	0,49	0,51	0,52	0,54	0,55	0,57	0,58	0,60	0,61	0,62	0,64	0,65	
7,0	0,44	0,46	0,47	0,49	0,50	0,51	0,53	0,54	0,56	0,57	0,59	0,60	0,61	0,63	0,64	
7,1	0,43	0,45	0,46	0,48	0,49	0,50	0,52	0,54	0,55	0,56	0,58	0,59	0,60	0,62	0,63	
7,2	0,43	0,44	0,46	0,47	0,48	0,50	0,51	0,53	0,54	0,55	0,57	0,58	0,60	0,61	0,62	
7,3	0,42	0,43	0,45	0,46	0,48	0,49	0,51	0,52	0,53	0,54	0,56	0,58	0,59	0,60	0,62	
7,4	0,42	0,43	0,44	0,46	0,47	0,48	0,50	0,51	0,53	0,54	0,55	0,57	0,58	0,59	0,61	
7,5	0,41	0,42	0,43	0,45	0,47	0,48	0,50	0,51	0,52	0,53	0,54	0,56	0,57	0,58	0,60	
7,6	0,40	0,42	0,43	0,44	0,46	0,47	0,49	0,50	0,51	0,52	0,54	0,55	0,56	0,58	0,59	
7,7	0,40	0,41	0,42	0,44	0,46	0,47	0,48	0,49	0,51	0,52	0,53	0,54	0,56	0,57	0,58	
7,8	0,39	0,41	0,42	0,43	0,45	0,46	0,48	0,49	0,50	0,51	0,52	0,54	0,55	0,56	0,58	
7,9	0,39	0,40	0,42	0,43	0,44	0,46	0,47	0,48	0,49	0,50	0,52	0,53	0,54	0,56	0,57	
8,0	0,39	0,40	0,41	0,42	0,44	0,45	0,46	0,47	0,49	0,50	0,51	0,52	0,54	0,55	0,56	

Продолжение

b \ a	4,6	4,7	4,8	4,9	5,0	5,1	5,2	5,3	5,4	5,5	5,6	5,7	5,8	6,0
4,6	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4,7	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4,8	0,96	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4,9	0,94	0,96	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,0	0,92	0,94	0,96	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,1	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,2	0,88	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,3	0,87	0,89	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,4	0,85	0,87	0,89	0,90	0,92	0,94	0,96	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,5	0,84	0,85	0,87	0,89	0,90	0,93	0,94	0,96	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,6	0,82	0,84	0,85	0,88	0,89	0,91	0,92	0,94	0,97	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0
5,7	0,81	0,82	0,84	0,86	0,88	0,89	0,91	0,92	0,95	0,97	0,98	1,0	1,0	1,0
5,8	0,79	0,81	0,82	0·84	0,86	0,88	0,90	0,91	0,93	0,95	0,97	0,98	1,0	1,0
5,9	0,78	0,80	0,81	0,83	0,84	0,87	0,88	0,90	0,92	0,93	0,95	0,97	0,98	1,0
6,0	0,76	0,78	0,80	0,82	0,83	0,85	0,87	0,88	0,90	0,92	0,93	0,95	0,97	0,98

6,1	0,75	0,76	0,79	0,80	0,82	0,84	0,85	0,87	0,89	0,90	0,92	0,94	0,95	0,97	
6,2	0,74	0,75	0,77	0,79	0,80	0,82	0,84	0,85	0,87	0,89	0,90	0,92	0,94	0,96	
6,3	0,73	0,74	0,76	0,78	0,79	0,81	0,82	0,84	0,86	0,87	0,89	0,90	0,92	0,95	
6,4	0,72	0,73	0,75	0,76	0,78	0,80	0,81	0,82	0,84	0,86	0,88	0,89	0,90	0,94	
6,5	0,71	0,72	0,74	0,75	0,76	0,78	0,80	0,81	0,83	0,84	0,86	0,88	0,89	0,92	
6,6	0,70	0,71	0,73	0,74	0,75	0,77	0,79	0,80	0,82	0,83	0,85	0,86	0,88	0,91	
6,7	0,69	0,70	0,72	0,73	0,74	0,76	0,78	0,79	0,81	0,82	0,83	0,85	0,86	0,90	
6,8	0,68	0,69	0,71	0,72	0,73	0,75	0,76	0,78	0,80	0,81	0,82	0,84	0,85	0,88	
6,9	0,66	0,68	0,70	0,71	0,72	0,74	0,75	0,76	0,78	0,80	0,81	0,83	0,84	0,87	
7,0	0,66	0,67	0,69	0,70	0,71	0,73	0,74	0,75	0,77	0,78	0,80	0,82	0,83	0,86	
7,1	0,65	0,66	0,68	0,70	0,70	0,72	0,73	0,74	0,76	0,77	0,79	0,80	0,82	0,85	
7,2	0,64	0,65	0,67	0,68	0,69	0,71	0,72	0,73	0,75	0,76	0,78	0,79	0,80	0,84	
7,3	0,63	0,64	0,66	0,67	0,68	0,70	0,71	0,72	0,74	0,75	0,77	0,78	0,79	0,82	
7,4	0,62	0,63	0,65	0,66	0,67	0,69	0,70	0,71	0,73	0,74	0,76	0,77	0,78	0,81	
7,5	0,62	0,63	0,64	0,65	0,66	0,68	0,69	0,70	0,72	0,73	0,75	0,76	0,77	0,80	
7,6	0,60	0,62	0,63	0,64	0,66	0,67	0,68	0,70	0,71	0,72	0,74	0,75	0,76	0,79	
7,7	0,60	0,61	0,62	0,64	0,65	0,66	0,67	0,69	0,70	0,71	0,73	0,74	0,75	0,78	
7,8	0,60	0,61	0,62	0,64	0,65	0,66	0,66	0,68	0,69	0,70	0,72	0,73	0,74	0,77	
7,9	0,58	0,60	0,60	0,62	0,63	0,64	0,66	0,67	0,68	0,70	0,71	0,72	0,73	0,76	
8,0	0,58	0,59	0,60	0,61	0,62	0,64	0,65	0,66	0,68	0,69	0,70	0,71	0,73	0,75	

Продолжение

b \ a	6,2	6,4	6,6	6,8	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8
4,6	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4,7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4,8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
4,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,3	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,5	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,6	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,7	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,8	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
5,9	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
6,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

6,1	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
6,2	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
6,3	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
6,4	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
6,5	0,95	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
6,6	0,94	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
6,7	0,93	0,95	0,98	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
6,8	0,92	0,94	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
6,9	0,90	0,93	0,96	0,99	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
7,0	0,88	0,92	0,94	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
7,1	0,87	0,90	0,93	0,96	0,99	1,0	1,0	1,0	1,0
7,2	0,86	0,89	0,92	0,94	0,97	1,0	1,0	1,0	1,0
7,3	0,85	0,88	0,90	0,93	0,96	0,99	1,0	1,0	1,0
7,4	0,84	0,86	0,89	0,92	0,95	0,97	1,0	1,0	1,0
7,5	0,83	0,85	0,88	0,91	0,94	0,96	0,99	1,0	1,0
7,6	0,83	0,84	0,87	0,90	0,93	0,95	0,97	1,0	1,0
7,7	0,81	0,83	0,86	0,88	0,92	0,94	0,96	0,99	1,0
7,8	0,80	0,82	0,85	0,87	0,90	0,93	0,95	0,97	1,0
7,9	0,79	0,81	0,84	0,86	0,89	0,92	0,94	0,96	0,99
8,0	0,78	0,80	0,82	0,85	0,88	0,90	0,93	0,95	0,97

ТАБЛИЦА 22

Определение величины (значения R выражены в процентах с точностью до 1%)

R_2 \ R_1	0,02		0,06		0,1		0,14		0,18		0,22		0,26		0,3		0,34		0,38		0,42	
		0,04		0,08		0,12		0,16		0,2		0,24		0,28		0,32		0,36		0,4		0,44
0,02	2	3	3	4	4	5	5	6	6	6	7	7	7	7	8	8	8	8	9	9	9	9
0,04	3	4	5	6	6	7	7	8	8	9	9	10	10	11	11	11	12	12	12	13	13	13
0,06	3	5	6	7	8	8	9	10	10	11	11	12	12	13	13	14	14	15	15	15	16	16
0,08	4	6	7	8	9	10	11	11	12	13	13	14	14	15	15	16	16	17	17	18	18	19
0,10	4	6	8	9	10	11	12	13	13	14	14	15	16	17	17	18	18	19	19	20	20	21
0,12	5	7	8	10	11	12	13	14	15	15	16	17	17	18	19	20	20	21	21	22	22	23
0,14	5	7	9	11	12	13	14	15	16	17	18	18	19	20	20	21	22	22	23	23	24	24
0,16	6	8	10	11	13	14	15	16	17	18	19	20	20	21	22	23	23	24	25	25	26	26
0,18	6	8	10	12	13	15	16	17	18	19	20	21	22	22	23	24	25	25	26	27	27	28
0,20	6	9	11	13	14	15	17	18	19	20	21	22	23	24	24	25	26	27	28	28	29	30
0,22	7	9	11	13	14	16	18	19	20	21	22	23	24	25	26	26	27	28	29	30	30	31
0,24	7	10	12	14	15	17	18	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	32	32
0,26	7	10	12	14	16	17	19	20	22	23	24	25	26	27	28	29	30	30	31	32	33	34
0,28	7	11	13	15	17	18	20	21	22	24	25	26	27	28	29	30	31	32	32	33	34	35
0,30	8	11	13	15	17	19	20	22	23	24	26	27	28	29	30	30	31	32	33	34	35	35
0,32	8	11	14	16	18	20	21	23	24	25	26	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	37
0,34	8	12	14	16	18	20	22	23	25	26	27	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	38
0,36	8	12	15	17	19	21	22	24	25	27	28	29	30	32	33	34	35	36	37	38	39	40
0,38	9	12	15	17	19	21	23	25	26	28	29	30	31	33	34	35	36	37	38	39	40	41
0,40	9	13	15	18	20	22	24	25	27	28	30	31	32	33	35	36	37	38	39	40	41	42
0,42	9	13	16	18	20	22	24	26	27	29	30	32	33	34	35	37	38	38	40	41	42	43
0,44	9	13	16	19	21	23	25	26	28	30	31	32	34	35	36	37	38	40	41	42	43	44

0,46	10	14	17	19	21	23	25	27	29	30	32	33	34	36	37	38	39	41	42	43	44	45
0,48	10	14	17	20	22	24	26	28	29	31	32	34	35	37	38	39	40	42	43	44	45	46
0,50	10	14	17	20	22	24	26	28	30	32	33	35	36	37	39	40	41	42	44	45	46	47
0,52	10	14	18	20	23	25	27	29	30	32	34	35	37	38	39	41	42	43	45	46	47	47
0,54	10	15	18	21	23	25	27	29	31	33	34	36	37	39	40	42	43	44	45	47	47	48
0,56	11	15	18	21	24	26	28	30	32	33	35	37	38	40	41	42	44	45	46	48	48	49
0,58	11	15	19	21	24	26	28	30	32	34	35	37	39	40	42	43	44	45	47	49	49	50
0,60	11	15	19	22	24	27	29	31	33	35	36	38	39	41	42	44	45	46	47	49	50	51
0,62	11	16	19	22	25	27	29	31	33	35	37	38	40	42	43	44	46	47	48	50	51	52
0,64	11	16	20	23	25	28	30	32	34	36	37	39	41	42	44	45	46	48	49	51	51	53
0,66	11	16	20	23	26	28	30	32	34	36	38	40	41	43	44	46	47	48	50	51	52	54
0,68	12	16	20	23	26	29	31	33	35	37	38	40	42	44	45	46	48	49	50	52	53	55
0,70	12	17	20	24	26	29	31	33	35	37	39	41	42	44	46	47	48	50	51	53	54	55
0,72	12	17	21	24	27	29	32	34	36	38	40	42	43	45	46	48	49	51	52	54	55	56
0,74	12	17	21	24	27	30	32	34	36	38	40	42	44	45	47	48	50	51	53	54	56	57
0,76	12	17	21	25	28	30	33	35	37	39	41	43	44	46	47	49	50	52	54	55	57	58
0,78	12	18	22	25	28	30	33	35	37	39	41	43	45	46	48	50	51	53	55	56	57	59
0,80	13	18	22	25	28	31	33	36	38	40	42	44	45	47	49	50	52	54	55	57	58	59
0,82	13	18	22	26	29	31	34	36	38	40	42	44	46	48	49	51	53	54	56	57	59	60
0,84	13	18	22	26	29	32	34	37	39	41	43	45	46	48	50	51	53	55	57	58	59	60
0,86	13	19	23	26	29	32	35	37	39	41	43	45	47	49	50	52	54	55	57	59	60	61
0,88	13	19	23	26	30	32	35	38	40	42	44	46	47	49	51	53	55	56	58	59	60	62
0,90	13	19	23	27	30	33	35	38	40	42	44	46	48	50	52	54	55	57	58	60	61	63
0,92	14	19	23	27	30	33	36	38	41	43	45	47	48	50	52	54	56	58	59	60	62	64
0,94	14	19	24	27	31	34	36	39	41	43	45	47	49	51	53	55	57	58	60	61	63	64
0,96	14	20	24	28	31	34	37	39	42	44	46	48	50	51	53	55	57	59	60	62	63	65
0,98	14	20	24	28	31	34	37	40	42	44	46	48	50	52	54	56	58	69	61	63	64	66
100	14	20	24	28	32	35	37	40	42	45	47	49	51	53	55	57	58	60	62	63	65	66

r_2 \ r_1	0,46	0,48	0,5	0,52	0,54	0,56	0,58	0,6	0,62	0,64	0,66	0,68	0,7	0,72	0,74	0,76	0,78	0,8	0,85	0,9	0,95	1,0
0,02	10	10	10	10	10	11	11	11	11	11	11	12	12	12	12	12	12	13	13	13	14	14
0,04	14	14	14	14	15	15	15	15	16	16	16	16	17	17	17	17	18	18	18	19	19	20
0,06	17	17	17	18	18	18	19	19	19	20	20	20	20	21	21	21	22	22	23	23	24	24
0,08	19	20	20	20	21	21	21	22	22	23	23	23	24	24	24	25	25	25	26	27	28	28
0,1	21	22	22	23	23	24	24	24	25	25	26	26	26	27	27	27	28	28	29	30	31	32
0,12	23	24	24	25	25	26	26	27	27	28	28	29	29	29	30	30	30	31	32	33	34	35
0,14	25	26	26	27	27	28	28	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	33	34	35	36	37
0,16	27	28	28	29	29	30	30	31	31	32	32	33	33	34	34	35	35	36	37	38	39	40
0,18	29	29	30	30	31	32	32	33	33	34	34	35	35	36	36	37	37	38	39	40	41	42
0,2	30	31	32	32	33	33	34	35	35	36	37	37	37	38	38	39	39	40	41	42	44	45
0,22	32	32	33	34	34	35	35	36	37	37	38	38	39	40	40	41	41	42	43	44	45	47
0,24	33	34	35	35	36	37	37	38	38	39	40	40	41	42	42	43	43	44	45	46	48	49
0,26	34	35	36	37	37	38	39	39	40	41	41	42	42	43	44	44	45	45	46	48	49	51
0,28	36	37	37	38	39	40	40	41	42	42	43	44	44	45	45	46	46	47	48	49	51	53
0,3	36	37	38	39	39	40	41	42	42	43	44	44	45	46	46	47	47	48	50	52	53	55
0,32	38	39	40	41	42	42	43	44	44	45	46	46	47	48	48	49	50	50	52	54	55	57
0,34	39	40	41	42	43	44	44	45	46	46	47	48	48	49	50	50	51	52	53	55	57	58
0,36	41	42	43	44	44	45	45	46	47	48	48	49	50	51	51	52	53	54	55	57	59	60
0,38	42	43	44	45	45	46	47	47	48	49	50	50	51	52	53	54	55	55	57	58	60	62
0,4	43	44	45	46	47	48	49	49	50	51	51	52	53	54	54	55	56	57	59	60	61	63
0,42	44	45	46	47	47	48	49	50	51	51	52	53	54	55	56	57	57	59	60	61	63	65
0,44	45	46	47	47	48	49	50	51	52	53	54	55	55	56	57	58	59	59	61	63	65	66
0,46	46	47	48	49	50	50	51	52	53	54	55	56	57	58	58	59	60	60	62	64	66	68

0,48	47	48	49	50	51	52	53	54	55	55	56	57	58	59	60	60	61	62	64	66	68	69
0,5	48	49	50	51	52	53	54	55	55	56	57	58	59	60	60	61	62	63	66	68	69	70
0,52	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	60	61	62	63	64	65	68	70	71	72
0,54	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	61	62	63	64	65	67	68	70	72	73
0,56	50	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	61	62	63	64	65	66	68	70	72	73	74
0,58	51	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	65	66	67	68	71	72	74	76
0,6	52	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	65	66	67	68	69	71	73	75	77
0,62	53	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	70	72	75	77	79
0,64	54	55	56	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	70	72	73	75	78	80
0,66	55	56	57	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	75	77	79	81
0,68	56	57	58	60	61	61	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	76	78	80	82
0,7	57	58	59	60	61	62	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	77	79	82	84
0,72	58	59	60	61	62	63	65	65	67	68	69	70	71	72	73	74	75	77	79	82	84	85
0,74	58	60	61	62	63	64	65	66	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	80	82	84	86
0,76	59	60	61	63	64	65	66	67	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	82	84	85	87
0,78	60	61	62	63	65	66	67	68	70	70	72	73	74	75	76	77	78	79	82	84	86	88
0,8	60	62	63	64	66	67	68	69	70	71	73	74	75	76	77	78	79	80	82	85	87	89
0,82	61	63	64	65	67	68	69	70	71	72	73	74	76	77	78	79	80	81	83	86	88	90
0,84	62	63	64	66	67	68	70	71	72	73	74	75	77	78	79	80	81	82	84	87	89	90
0,86	63	64	65	67	68	69	71	72	73	74	75	76	77	78	80	81	82	83	85	88	90	93
0,88	64	65	66	67	69	70	71	72	74	75	76	77	78	79	81	82	83	84	86	89	91	94
0,9	65	66	67	68	70	71	72	73	75	76	77	79	80	80	83	84	85	85	87	91	92	95
0,92	65	66	67	69	70	71	73	74	75	76	78	79	80	81	83	84	85	86	88	91	93	96
0,94	66	67	68	69	71	72	74	75	76	77	79	80	81	82	84	85	86	87	89	92	94	97
0,96	67	68	69	70	72	73	75	76	77	78	80	80	82	83	84	85	87	88	90	93	95	98
0,98	67	69	70	71	73	74	75	76	78	79	80	81	83	84	85	86	87	88	91	94	96	99
1,0	68	69	70	72	73	74	76	77	79	80	81	82	84	85	86	87	88	89	92	95	97	100

К очищенному вирусу ящура при температуре 17—18° добавляют сернокислый аммоний из расчета получения конечной концентрации 2,05 моля [на 100 мл экстракта вируса добавляют 27 г $(NH_4)_2SO_4$]. После растворения навески сернокислого аммония раствор для формирования осадка помещают в холодильник при 4° на 18 часов. Осадок отделяют центрифугированием при 5—6 тыс. об/мин в течение 20 минут и растворяют физиологическим раствором pH 7,6. Количество физиологического раствора, необходимое для ресуспендирования осадка, рассчитывают, исходя из навески вируссодержащей ткани и требуемой концентрации антигена. Если исходная навеска вируссодержащей ткани составляла 100 г, то для получения антигена, концентрированного в 10 раз, осадок ресуспендируют в 10 мл физиологического раствора.

После ресуспендирования полученную суспензию вновь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 минут. Надосадочную прозрачную жидкость, представляющую собой антиген, сливают и инактивируют при температуре 58° в течение 4 часов.

После инактивации антиген проверяют на вирулентность на белых мышатах-сосунах. Для этого 2—3 мл приготовленного антигена диализируют в течение 24 часов при 4° против физиологического раствора. После диализа антиген в дозе по 0,2 мл вводят подкожно пяти мышатам-сосунам 5—7-дневного возраста. Инокулированные мышата должны оставаться здоровыми. В случае их гибели из тушек готовят антигены и проверяют в РСК с антисыворотками тех штаммов вируса, из которых приготовлен преципитирующий антиген. При положительной РСК полученный антиген выбраковывают. При отрицательной реакции связывания комплемента антиген повторно контролируют на вирулентность и выпускают для практического использования только в том случае, если он при повторной проверке окажется авирулентным.

Контроль антигена на активность и типовую специфичность осуществляют в реакции диффузионной преципитации с использованием неразведенных преципитирующих антигенов и комплементсвязывающих сывороток морских свинок на гомологичный и гетерологичные типы вируса. Контролируемый антиген помещают в центральную лунку, а периферические лунки наполняют типоспецифическими сыворотками. Реакцию учитывают через 24 часа. Линии преципитации должны обнаруживаться только между лункой с антигеном и лункой с антисывороткой гомологичного типа. В случае обнаружения положительной реакции антигена с антисыворотками других типов антиген выбраковывают.

Сыворотки. В качестве испытуемых сывороток используют сыворотки переболевших ящуром животных (крупный рогатый скот, овцы, свиньи и др.), полученные не ранее 10 дней после переболевания. Сыворотки берут в неблагополучных по ящуру хозяйствах у переболевших животных, не иммунизированных ранее противоящурной вакциной из лапинизированного вируса.

Сыворотки крови животных, дважды переболевших ящуром различных типов, для исследования в реакции диффузионной преципитации непригодны.

В качестве контрольных сывороток в РДП используют сыворотки крупного рогатого скота, переболевшего ящуром после заражения заведомо известным типом вируса. Контрольные сыворотки для РДП высылает научно-исследовательское учреждение.

Постановка реакции. В центральные лунки семи шестиугольных систем на агаровых пластинках наливают соответственно преципитирующие антигены различных типов. В периферические лунки помещают пробы испытуемых и контрольных сывороток крови реконвалесцентов. После постановки реакции агаровые пластинки выдерживают во влажной камере при температуре 37°. Реакцию учитывают через 16, 24, 48 и 72 часа после постановки.

Положительная реакция характеризуется образованием четкой, белого цвета, одной или двух линий преципитации между лункой с антигеном и антисывороткой.

Вирус ящура относят к тому типу, с антигеном которого испытуемая сыворотка дает положительную реакцию.

В связи с тем, что иногда в сыворотке реконвалесцентов обнаруживаются гетеротипичные антитела, для более объективной оценки реакции исследуют сыворотки крови не менее чем от 10 переболевших ящуром животных. Если в сыворотках обнаружены преципитирующие антитела к двум и более типам, вирус относится к тому типу, с антигеном которого испытуемые сыворотки дают наибольший процент положительных реакций (А. И. Собко, и др., 1970).

Примечание. Сыворотки реконвалесцентов, ранее иммунизированных вакциной из лапинизированного вируса, дают нетипоспецифическую реакцию с антигеном, изготовленным из лапинизированного вируса ящура. При исследовании таких сывороток используют преципитирующие антигены из вируса ящура, адаптированного к организму мышат-сосунов. Методика приготовления таких антигенов тождественна методике изготовления антигенов из лапинизированного вируса (А. И. Собко и др., 1970).

Если ящур среди животных возник через три и более месяцев после прививки лапинизированной вакциной, сыворотки крови таких животных можно исследовать в реакции диффузионной преципитации с антигеном из лапинизированного вируса.

Определение типа вируса ящура в патологическом материале при помощи реакции диффузионной преципитации. Компоненты реакции. *Антигены* испытуемые — лимфа невскрывшихся афт больных ящуром животных (крупного рогатого скота, овец, свиней, морских свинок). Для постановки реакции используют лимфу в нативном, неразведенном виде. Кроме того, можно использовать поджелудочные железы павших от ящура животных. В реакции используют 50%-ную суспензию поджелудочной железы на физиологическом растворе pH 7,6.

Для контроля берут антигены из очищенного и концентрированного вируса ящура различных типов, которые получают из научно-исследовательского учреждения и типоспецифические гипериммунные сыворотки морских свинок.

Постановка реакции. В центральные лунки шестиугольных систем на агаровых пластинках помещают испытуемые и контрольные антигены. В периферические лунки помещают гипериммунные сыворотки морских свинок различных типов. После этого агаровые пластинки выдерживают во влажной камере при температуре 37°. Реакцию учитывают через 16, 24, 48 и 72 часа после ее постановки.

Положительная реакция характеризуется образованием четкой, белого цвета, одной или двух линий преципитации между лункой с антигеном и антисывороткой. Вирус ящура относят к тому типу, в сыворотке которого испытуемый антиген дает положительную реакцию.

Применение реакции диффузионной преципитации для сравнительного изучения антигенных свойств эпизоотических штаммов вируса ящура. Компоненты реакции. *Антигены* двух взятых для сравнительного изучения эпизоотических штаммов вируса ящура одного типа, которые предварительно адаптируют к организму 2-дневных крольчат. Антигены для реакции готовят из лапинизированного вируса по вышеописанной методике.

Сыворотки. В реакции используют гипериммунные сыворотки морских свинок, полученные на изучаемые эпизоотические штаммы вируса ящура. Гипериммунные сыворотки морских свинок получают по той же методике, по которой готовят и контролируют ящурные сыворотки и антигены, используемые в качестве компонентов РСК при определении типов и подтипов вируса ящура.

Постановка реакции. В верхнюю лунку справа двух треугольных систем на агаровых пластинках помещают антиген одного из испытуемых штаммов вируса. В верхнюю лунку слева двух треугольных систем помещают антиген изучаемого штамма. В нижнюю лунку первой треугольной системы помещают гипериммунную сыворотку первого из изучаемых штаммов, а в нижнюю лунку второй треугольной системы — гипериммунную сыворотку другого изучаемого штамма.

После постановки реакции агаровые пластинки выдерживают во влажной камере при температуре 37°. Реакцию учитывают через 24, 48, 72, 96 часов и последующие 2—3 дня.

Изучаемые штаммы считаются идентичными, если образовавшиеся линии преципитации между лунками с антигенами и сывороткой сливаются и имеют вид дуги.

Штаммы не идентичны, если образовавшиеся линии преципитации представляют собой дугу, от вершины которой отходят линии в виде «шпоры».

Описанную методику постановки РДП можно использовать для изучения соответствия эпизоотических и производственных штаммов вируса ящура.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

При дифференциальной диагностике ящура необходимо исключить катаральную лихорадку овец (блютанг), везикулярный стоматит и везикулярную экзантему свиней. К вирусу катаральной лихорадки овец морские свинки невосприимчивы; при интрадермальном заражении слизистой оболочки языка типичных для ящура афт не бывает. Вирус везикулярного стоматита может вызвать поражение ротовой полости у лошади, чего никогда не наблюдалось в отношении вируса ящура.

Везикулярную экзантему свиней можно отличить от ящура биопробой на морских свинках и с помощью РСК с испытуемым антигеном и заведомо позитивными сыворотками.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА*

Ретроспективная диагностика с целью определения типа и варианта вируса ящура, вызвавшего в прошлом заболевание животных, основана на исследовании (точнее идентификации) антител в реакциях: серозащиты, диффузионной преципитации (см. стр. 33) и серонейтрализации.

Реакция серонейтрализации. Технически данный тест проводят следующим образом. Испытуемую неразведенную сыворотку разливают по 0,2 мл в пробирки и добавляют равное количество разведенного (десятикратно) вируса. На каждое разведение вируса используют по четыре пробирки с сывороткой. Смеси вирус-сыворотка инкубируют в водяной бане при 37° в течение 30 минут, а затем инокулируют внутрибрюшинно мышатам 7—8-дневного возраста в дозе 0,05 мл. За мышатами наблюдают в течение 14 дней после заражения. Дозу вируса, вызывающую гибель 50% привитых мышей, определяют по методу Рида и Менча. Индекс серонейтрализации вычисляют по разнице между титром вируса и титром вирус+сыворотка. Результаты реакции серонейтрализации учитывают по следующей форме (табл. 23).

Индексы серонейтрализации для типов О, А и С вируса ящура у крупного рогатого скота, зараженного (или естественно переболевшего) вирусом типа О.

ТАБЛИЦА 23

Форма учета данных реакции серонейтрализации

Индекс серонейтрализации показан с сывороткой, собранной в интервалах после заражения вирусом (или естественного переболевания, в днях)

№ животного	тип О			тип А			тип С		
	10	20	40	10	20	40	10	20	40
1	>4,2	4,2	>5,6	0,6	0,8	0	2,5	2,5	2,5
2	>4,2	4,2	5,3	2,3	3,3	2,5	3,0	2,5	3,2
3	3,7	4,2	>5,6	0	0,8	0,2	2,2	2,0	2,3
4	3,7	4,2	5,2	0,7	1,3	1,0	3,0	3,0	3,0

Примечание. Цифры выражают $\log_2$ титра антител.

В сыворотке реконвалесцентов удается постоянно обнаруживать антитела при помощи теста нейтрализации.

В ретроспективной диагностике тест серозащиты более предпочтителен для идентификации иммунологического типа полевого вируса, когда уже невозможно получить инфекционный материал для выделения вируса. В этом случае при помощи теста серонейт-

* Ретроспективную диагностику по исследованиям сывороток реконвалесцентов можно проводить там, где не проводили специфическую противоящурную вакцинацию скота (исследование парных сывороток с интервалом в 15 дней).

трализации невозможно точно определить тип вируса в течение первых трех недель после заражения.

Реакция нейтрализации в культуре клеток свиной почки с испытуемыми полевыми сыворотками животных и заведомо известными (по вирулентности и типовой принадлежности) штаммами pH с этой целью ставят с различными разведениями испытуемой сыворотки и постоянной дозой вируса. Сыворотки разводят с коэффициентом $1/2$ на растворе Хенкса с ГЛА. Вирус берут в постоянной дозе 100 $ЦПД_{50}$/мл. Смесь аа разведений сыворотки и постоянной дозы вируса (100 $ТЦД_{50}$/мл) по 1 мл выдерживают 24 часа при 20° и заражают культуры клеток СП, пробирки с которой содержат по 1,8 мл среды Хенкса ГЛА и 1% инактивированной сыворотки теленка, лишенной противоящурных антител. Инокулированные пробирки с культурой клеток помещают в барабан при 37° на 72 часа, после чего учитывают цитопатические изменения.

Контроли. Для контроля вируса каждого типа берут его по 100 $ТЦД_{50}$ на пробирку. Контроль сыворотки — на токсичность. Контроль среды — на токсичность и питательную полноценность. Контроль со стандартными антисыворотками каждого типа (контроль на аномалию реакции).

С этой же целью реакция нейтрализации в культуре может быть несколько упрощена и применяется в виде теста подавления цитопатогенного действия вируса в культуре клеток сыворотками, высушенными на фильтровальной бумаге (Адлер и др., 1968).

Для этого испытуемыми сыворотками крови пропитывают диски фильтровальной бумаги диаметром 5 мм, затем высушивают над смесью силикагеля и безводного хлористого кальция в течение 2—3 дней или при 37°. При постановке теста подавления на первичную культуру клеток почки эмбриона крупного рогатого скота, выращенную в плоских флаконах, инокулируют вирус в достаточно большой дозе и сразу после адсорбции наносят на монослой расплавленное агаровое покрытие с нейтральным красным. Бумажные диски с высушенной сывороткой помещают на агаровое покрытие. Реакцию учитывают через 96 часов (инкубирование при 37°). Антитела, содержащиеся в сыворотке, диффундируя через агар, задерживают развитие ЦПД в определенной зоне ткани вокруг дисков. Зона хорошо заметна при визуальном просмотре; размер ее зависит от содержания антител в испытуемой сыворотке.

Специфичность теста подавления оказалась удовлетворительной; чувствительность его была в 2—3 раза ниже, чем при исследовании сывороток во время постановки реакции нейтрализации в пробирочных культурах. Пробы сыворотки, высушенные на фильтровальной бумаге, сохраняют способность нейтрализовать ЦПД вируса ящура на протяжении 4 месяцев при сохранении их при 4°. Тест подавления можно использовать для идентификации вируса ящура по сывороткам переболевших животных. Он позволяет обнаруживать антитела в сыворотках крови крупного рогатого скота на протяжении $4^1/_2$ месяцев после переболевания и решить проблему сохранения сывороток. Учет реакции весьма прост; возможна визуальная читка и оценка результатов реакции по величине зоны подавления ЦПД. Для получения достаточно четких результатов нужно использовать флаконы с хорошо сформированным монослоем клеток. Для исключения бактериального загрязнения можно рекомендовать предварительное пропитывание стерильных бумажных дисков антибиотиками (пенициллин и стрептомицин), которые препятствуют развитию бактериальной микрофлоры. Использование данного метода постановки реакции в серологической практике имеет значительные преимущества перед применением жидких сывороток крови. Описываемый тест с успехом применяется Международной референс-лабораторией для прогнозирования предполагаемых вспышек ящура.

Поствакцинальный иммунитет и его серологическая оценка. Животные, переболевшие ящуром, как правило, приобретают иммунитет; крупный рогатый скот — на 2—3 года; свиньи — на 3 месяца; овцы — до двух лет. Для активной иммунизации животных против ящура в СССР широко применяют лапинизированную гидроокисьалюминиевую вакцину, которую готовят из вируса, расположенного в организме новорожденных крольчат, а также гидроокисьалюминиевую вакцину из вируса, культивируемого в переживающей ткани слизистой

оболочки языка неиммунного к ящуру крупного рогатого скота (метод Френкеля).

Обе вакцины содержат инактивированный формалином вирус и сообщают иммунитет взрослым животным до 4 месяцев. В настоящее время с целью повышения иммуногенных свойств лапинизированная ГОА-вакцина в качестве адъюванта содержит сапонин и выпускается в концентрированном виде.

В целях получения данных об эффективности вакцинации лабораториям, занимающимся изучением ящура, необходимо использовать метод определения уровня иммунитета у привитых животных по титру антител в сыворотке крови крупного рогатого скота и овец*. Для этого из каждой возрастной группы под наблюдение подбирается 10—15 клинически здоровых, ранее не болевших ящуром животных. Для исследования от них отбирают пробы до вакцинации и затем через 20—25 дней после повторного введения вакцины. В последующем пробы крови отбирают через 30 дней на протяжении 6—8 месяцев.

Полученную сыворотку крови от 3—5 животных равными объемами соединяют в одну пробу и исследуют в реакции нейтрализации.

Для представления о напряженности иммунитета у животных различных возрастных групп необходимо исследовать пробы сыворотки крови от взрослого крупного рогатого скота, от молодняка в возрасте до одного года, от молодняка в возрасте от одного года до 2 лет.

При снижении титра антител в исследуемых сыворотках крови животных до 1 : 16 и тем более до 1 : 8 животных данного стада необходимо ревакцинировать, если есть на то эпизоотологические предпосылки. Сыворотку крови животных можно доставлять для исследования во Всесоюзный научно-исследовательский ящурный институт.

Кроме учета эффективности вакцины по титрам антител, у животных необходимо анализировать эффективность препарата по эпизоотологическим наблюдениям.

---

* Рекомендации по учету эффективности вакцинации разработаны Всесоюзным научно-исследовательским ящурным институтом.

БЕШЕНСТВО
(RABIES)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Бешенство — остро протекающая инфекционная болезнь человека и животных, проявляющаяся в двух формах: буйной, характеризующейся состоянием сильного возбуждения, за которым следует развитие параличей и гибель, и тихой, паралитической, для которой характерно развитие параличей, предшествующих смерти.

Для собак наиболее типична буйная форма, включающая периоды предвестников, возбуждения и параличей. Первый период продолжается 1—3 суток. В это время отмечается незначительное изменение в поведении животного, апатия, стремление укрыться в темное место, отсутствие реакции на зов, иногда беспричинная раздражительность. Иногда в этот период собаки становятся чрезвычайно подвижными, беспокойными. С развитием болезни извращается аппетит. Собаки часто проглатывают посторонние предметы (сено, солому, камни и др.). В это же время развивается парез мускулатуры глотки. Прием воды становится затрудненным, лай хриплым, отрывистым, слюноотделение усиливается.

В период возбуждения, продолжающийся около 3 дней, выражены припадки бешенства, собаки проявляют агрессивность (стремятся убежать, нападают на других животных и людей), которая сменяется состоянием депрессии. Постепенно развивается паралич отдельных групп мышц, изменяется голос вследствие паралича мускулатуры гортани. Наступают локомоторные расстройства, косоглазие, одновременное сужение зрачка и расширение другого.

В период параличей и депрессии (продолжающийся 4—5 дней) развивается афония, паралич мускулатуры задних конечностей, хвоста, мочевого пузыря и прямой кишки, паралич передних конечностей, общая слабость, исхудание. Животное гибнет.

При тихой (паралитической) форме бешенства, наряду с явлениями депрессии, появляются парезы и параличи мускулатуры нижней челюсти, глотки и задних конечностей, сильное слюнотечение и затрудненное глотание, вызывающее подозрение, что животное подавилось костью. При такой форме переболевания собаки не реагируют на раздражение и погибают обычно в течение 2—4 дней.

Иногда заболевание в тихой форме проявляется геморрагическим гастроэнтеритом.

В районах Крайнего Севера встречается атипичная форма бешенства собак, песцов, лисиц, волков, называемая дикованием.

Симптомы бешенства у животных других видов (волки, кошки, лошади, крупный и мелкий рогатый скот, свиньи) описаны в учебниках эпизоотологии, монографиях В. П. Назарова «Бешенство животных» (1961) и М. А. Селимова «Пути ликвидации гидрофобии» (1963), а также других руководствах по инфекционным болезням сельскохозяйственных животных. Гистопатологические изменения при данной инфекции изложены ниже, в разделе «Лабораторная диагностика болезни».

ВИРУС

Вирус точно не классифицирован. Вирионы имеют диаметр 100—150 ммк, морфологически они сходны с частицами миксовирусов. При размножении в инфицированных клетках нервной ткани развиваются внутриклеточные включения — тельца Бабеша—Негри, природа которых до сих пор не расшифрована: являются ли они скоплениями вирусных частиц или продуктом защитной реакции клетки на внедрение вируса.

ТАБЛИЦА 1

Основные отличия уличного и фиксированного вируса бешенства (М. А. Селимов, 1963)

Свойства	Уличный вирус бешенства	Фиксированный вирус бешенства
Инкубация у кроликов при внутримозговом заражении	12—25 дней	3,5—7 дней
Клиническая форма болезни	Буйная или паралитическая	Паралитическая
Инфекционный титр вируса в центральной нервной системе (при внутримозговом титровании на мышах)	10^{-2}—$10^{-5.5}$	10^{-5}—10^{-7}
Патогенность для кроликов при подкожном введении	Высокая	Отсутствует
Тельца Бабеша—Негри (типичные)	Обнаруживаются	Не обнаруживаются
Выделение вируса из ткани слюнных желез	Выделяется	Не выделяется
Содержание вируса в периферических нервах	Постоянно («септиневрит»)	Редко

Устойчивость вируса к физико-химическим воздействиям. Вирус довольно устойчив к воздействию различных физических, химических и биологических факторов. Низкие температуры действуют на него консервирующе. При 23° он погибает через 28—53 дня; при 35° — через 20—22 дня; при 50° — через один час; при 60° — через 5—10 минут; при 70° — мгновенно. При высушивании вирус погибает через 10—14 дней; солнечный свет при температуре воздуха 5—6° обезвреживает вирус через 5—7 дней, при 16—18° — через 3—4 дня, при 37° — через 40 часов. Раствор формалина (1—5%-ный) инактивирует вирус через 5 минут; 0,1%-ный раствор сулемы — через 2—3 часа; 1%-ный раствор фенола — через 2—3 недели; эфир убивает его через 60—120 часов.

Важное практическое значение имеет резистентность вируса-фикс к действию фенола. Для каждого штамма вирус-фикс существует свой режим инактивации под действием фенола.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Оптимальной реакцией среды для фиксированного вируса является слабокислая (pH 6,4—7,0). Наилучшим консервантом для уличного вируса служит 50%-ный глицерин на буферном растворе, имеющем pH 7,2—7,4.

Локализация в организме. Вирус концентрируется главным образом в центральной нервной системе, преимущественно в сером веществе головного мозга, а также в слюнных железах и слюне. Выделяется вирус главным образом со слюной и мочой. У экспериментально зараженных собак он выделяется таким путем уже со второго дня.

Антигенные свойства. В антигенном отношении вирус бешенства не имеет вариантов. Однако по спектру патогенного действия, вирулентности, устойчивости и другим признакам установлена значительная вариабельность полевых штаммов этого вируса.

Культивирование в лабораторных условиях. Эпизоотические штаммы вируса можно пассировать на мелких лабораторных животных путем интрацеребрального заражения; вирус-фикс — на кроликах, белых мышах или овцах. Специально адаптированные вакцинные штаммы (Флури, Келев) пассируют на куриных эмбрионах, зараженных в желточный мешок.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

В типичных случаях клиническая картина бешенства животных весьма характерна, и диагностика не вызывает затруднений, однако на практике часто встречаются случаи атипичного течения болезни.

В лабораторной практике бешенство диагностируют только посмертно, по морфологическим, биологическим и иммунохимическим показателям: по обнаружению в мозгу погибших животных телец Бабеша—Негри, специфического антигена (метод флуоресцирующих антител) и инфекционного вируса (метод биопробы на лабораторных животных). Серологическая диагностика инфекции пока не получила широкого применения и ограничивается главным образом реакцией диффузионной преципитации. За последние годы появились обнадеживающие перспективы прижизненной диагностики бешенства при помощи иммунофлуоресцентного исследования отпечатков роговицы.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфологические исследования бешенства состоят в исследовании головного мозга погибших от бешенства животных. Патоморфологические показатели бешенства включают: 1) реактивные изменения воспалительного и дегенеративного характера (картина рассеянного энцефаломиелита с поражением оболочек, сосудов и вещества мозга) и 2) наличие специфических внутриклеточных включений — телец Бабеша—Негри.

Взятие материала. Трупы животных вскрывают с соблюдением мер предосторожности: в резиновых перчатках, проверенных на целостность, очках-консервах или масках на все лицо из целлофана или органического стекла. Черепную полость вскрывают обычным способом, но с соблюдением правил асептики. Мозг извлекают прокипяченным или прокаленным на огне инструментом и кладут основанием на стерильный лоток. Во избежание загрязнения мозга вначале стерильными ножницами берут материал для биологической пробы — кусочек (0,5—1 см) из разных отделов: коры больших полушарий, мозжечка, продолговатого мозга и аммонова рога (Ю. Н. Мастюкова, 1967). Для морфологических исследований используют участок мозга в области аммонова рога, а также мозжечка, в клетках которого тельца встречаются более постоянно. Аммонов рог расположен в нижнем роге бокового желудочка на медиальной стороне в виде дугообразного возвышения и может быть обнаружен двумя способами (Ю. Н. Мастюкова, 1967).

Первый способ. Тупой стороной лезвия скальпеля, погруженной в центральную извилину больших полушарий, отодвигают кору в сторону, до появления под ней аммонова рога.

Второй способ. Скальпелем делают крестообразный разрез, вначале продольный, вдоль наружного края центральной извилины, а затем поперечный, посредине полушария головного мозга, толщу коры отслаивают и под ней обнаруживают аммонов рог. Если трудно разобраться в структуре мозга, то в поисках аммонова рога нужно ориентироваться по сосудистому сплетению (Р. М. Шен, Н. Н. Носик, 1965).

Из аммонова рога и мозжечка вырезают небольшие кусочки толщиной 3—4 см и помещают их в фиксирующую жидкость. Для биологической пробы кусочки мозга помещают в стерильную, плотно закрывающуюся банку с неразведенным нейтральным стерильным глицерином или разведенным пополам физиологическим раствором, которую держат во льду. Отдельно в пробирки без фиксатора берут кусочки мозга для мазков и отпечатков.

Методы обработки диагностических материалов на бешенство в гистологических срезах и мазках-отпечатках приведены ниже (Р. М. Шен, Н. Н. Носик, 1965).

Фиксирующие жидкости. Жидкость Дюбоск—Бразиль—Буэна: пикриновая кислота — 1 г, 80° этиловый спирт — 150 мл, формалин (неразведенный) — 60 мл, ледяная уксусная кислота — 15 мл. Пикриновую кислоту растворяют в спирте, затем добавляют остальные компоненты. Кусочки ткани опускают примерно в десятикратный объем фиксатора. Продолжительность фиксации кусочка размером 2×3 см — 2—3 суток; для более мелких меньше. Данный фиксатор длительно сохраняется при комнатной температуре и хорошо фиксирует почти все ткани животного происхождения. Основное преимущество фиксирующей смеси — возможность длительного выдерживания в ней тканей. Перед обработкой материала для заливки в парафин из фиксированного объекта вырезают кусочки толщиной 2—2,5 мм, которые снова погружают в жидкость на 24 часа и затем подвергают общепринятой проводке.

Сулемовые фиксаторы пригодны для фиксации тонких объектов небольших размеров, так как они медленно проникают в ткани. Для удаления из тканей кристаллических и аморфных осадков, образованных ртутью, материал несколько раз обрабатывают спиртовым раствором йода (60 мл 70° спирта, 1 мл 10%-ной йодной настойки и 10 мл раствора Люголя). О полном удалении сулемы судят по прекращению обесцвечивания йода. Следы йода, присутствие которого препятствует окрашиванию срезов анилиновыми красителями, удаляют проводкой через 0,25%-ный раствор гипосульфита (15—30 минут).

Чаще применяют сулемовые фиксаторы Ценкера и Гелли—Максимова.

Смесь Ценкера: сулема — 5 г, двухромовокислый калий — 2,5 г, сульфат натрия — 1 г, дистиллированная вода — 100 мл. Перед употреблением добавляют 5 мл ледяной уксусной кислоты. Небольшие кусочки фиксируют не более 24 часов, затем промывают 24 часа проточной водой и подвергают йодированию.

Смесь Гелли—Максимова: сулема — 5 г, двухромовокислый калий — 2,2 г, дистиллированная вода — 100 мл. Перед употреблением добавляют 10 мл формалина и 10 мл 2%-ного раствора осьмиевой кислоты. Фиксацию ведут в течение 12—24 часов; последующая обработка такая же, как при фиксации смесью Ценкера (Р. М. Шен, Н. Н. Носик, 1965).

Смесь Адуцкевича: 80%-ная уксусная кислота — 1 часть, хлороформ — 2 части, 96° этиловый спирт — 6 частей.

Ацетон. Берут не толстые кусочки ткани и помещают в ацетон на 12—15 часов (не более 18 часов). Фиксированные кусочки в течение 15—20 минут обрабатывают смесью, состоящей из ацетона и ксилола, взятых в равных количествах, затем в чистом ксилоле 15 минут. После такой обработки обезвоженные кусочки погружают в расплавленный парафин с последующим приготовлением парафиновых блоков. Кусочки ткани можно фиксировать в ацетоне в течение 1—2 часов при 37° (С. Я. Гайдамович, Н. Н. Гращенков и др., 1954). Вместо ксилола или толуола применяют хлороформ.

Заливку и приготовление парафиновых срезов проводят по следующей схеме: а) уплотнение и обезвоживание в спиртах восходящей концентрации: 70° —

4 часа, 96° — 18 часов и 100° — дважды (1—2 часа); б) пропитывание парафина растворителями (ксилолом или другими) — 3—4 часа; в) пропитывание парафином в течение нескольких часов при 56°; г) заливка кусочков и приготовление срезов толщиной 5 мк.

Можно также использовать быстрый метод приготовления парафиновых срезов по методике Р. М. Шен. Для этого небольшие кусочки толщиной 1 мм фиксируют в жидкости Буэна в течение 30 минут при комнатной температуре и 30 минут при 57°. Затем проводят обезвоживание спиртами, начиная с 96° (96° — 30 минут, 100° — дважды по 30 минут). В ксилоле материал выдерживают дважды по 30 минут. Вся проводка осуществляется при 57°. Кусочек в течение часа пропитывается парафином, после чего из него готовят блок. Таким образом, вся обработка материала продолжается $4^1/_2$ часа.

Реактивные изменения и тельца-включения Бабеша—Негри. Из реактивных изменений с большим постоянством отмечаются поражения сосудов, главным образом в области аммонова рога и среднего мозга. Сосуды сильно расширены и наполнены кровью. В ткани мозга часто видны точечные кровоизлияния. Эндотелий сосудов набухший, стенки инфильтрированы воспалительными элементами. Вокруг мелких сосудов заметны муфточки, достигающие иногда значительных размеров. Весьма характерны воспалительные очаги в самой ткани мозга, там можно обнаружить так называемые узелки Бабеша, состоящие из элементов крови, глиальных клеток (олигодендроглия и микроглия), а также разрушенных соседних нейронов. Дегенеративные изменения нервных клеток наблюдаются уже на ранних этапах инфекции. Характер клеточных поражений разнообразен — иногда поражается только ядро (набухание, кариолиз) либо резко поражается цитоплазма с разрушением структур Ниссля, вакуолизацией, хроматолизом. Иногда наблюдается сморщивание всей клетки. Постоянно отмечают явления нейронофагии (Н. Н. Носик, Р. М. Шен, 1965).

Обнаружение цитоплазматических включений — телец Бабеша—Негри является достоверным показателем диагностики бешенства. Тельца Бабеша—Негри — оксифильные, полиморфные образования со сложной базофильной внутренней структурой. Размеры их колеблются от 0,25—1 до 20—25 мк, имеют четко ограниченные контуры. В хорошо окрашенных препаратах тельца окружены световым кольцом. В одной клетке может быть несколько телец разной формы и величины. Они расположены в цитоплазме нейрона; много мелких включений имеется в отростках. Тельца Бабеша—Негри обнаруживаются в хорошо сохранившихся нейронах разных отделов центральной нервной системы. Их можно регулярно найти в крупных нейронах аммонова рога и центрального ядра зрительного нерва, а также в пирамидальных клетках коры мозга и клетках Пуркинье мозжечка. Тельца постоянно находят в период клинического проявления болезни (до 95% случаев) и за 3—4 дня до заболевания (Н. Н. Носик и Р. М. Шен, 965).

Следует отметить, что отсутствие телец Бабеша—Негри не исключает бешенства, и требуется провести биологические испытания на лабораторных животных.

Исследования на наличие телец Бабеша—Негри проводят как в гистологических срезах из ткани, так и в мазках-отпечатках. В мазках включения выявляются легко в тех случаях, когда они в большом количестве содержатся в исходном материале, поэтому отрицательные материалы неубедительны (Н. Н. Носик, Р. М. Шен, 1965). В гистологических срезах выявляются даже единичные включения. В срезах можно учесть и реактивные тканевые изменения, что имеет известное значение при наличии недостаточно типичных телец. Обычно рекомендуют исследовать материалы на бешенство одновременно в мазках и срезах.

Методы окрашивания. Для выявления телец Бабеша—Негри в гистологических срезах и мазках-отпечатках применяют большое количество различных методов окрашивания, дающих хорошие результаты.

Окраска по Романовскому—Гимза. Рабочий раствор красителя готовят перед употреблением из расчета 1 мл маточного раствора красителя на 15 мл свежедистиллированной воды (для уменьшения кислотности воду перед приготовлением раствора кипятят в незакупоренном сосуде и охлаждают). Для приготовления красителя используют сосуды фарфоровые или темного стекла. Препараты погружают в раствор красителя на 48 часов и выдерживают их на холоде без доступа света. Затем окрашенные препараты тщательно промывают в дистиллированной воде, обезвоживают спиртами и осторожно дифференцируют либо смесью гвоздичного масла с абсолютным спиртом в отношении 1 : 9, либо подкисленным 96° спиртом до тех пор, пока срез не примет фиолетово-розовый оттенок; хорошим опознавательным признаком достаточной дифференциации является яркая окраска эритроцитов. Абсолютным спиртом удаляют остатки гвоздичного масла, проводят через толуол и заключают в канадский бальзам. Фон препарата светло-сиреневый, ядра светло-синие, ядрышки фиолетовые, включения темно-розовые (Р. М. Шен и Н. Н. Носик, 1965).

Для ускоренной диагностики бешенства применяют метод окраски Романовского—Гимза в модификации Р. М. Шен. На депарафинированные препараты наливают несколько капель неразведенной краски. Через 10 минут сюда же добавляют 20—30 капель дистиллированной воды. Дальнейшую обработку проводят, как описано выше. При таком окрашивании тельца Бабеша—Негри приобретают розовый цвет с фиолетовым оттенком, ядра — сине-фиолетовый.

Окраска по Манну. Депарафинированные препараты красят свежеприготовленной смесью, состоящей из 17 мл 1%-ного водного раствора метилового синего, 23 мл 1%-ного водного раствора эозина и 40 мл дистиллированной воды в течение 4 часов при 37° и 20 часов при комнатной температуре. После тщательной промывки препараты дифференцируют щелочным спиртом до приобретения ими светло-розового оттенка (препараты проводят через три раствора щелочного спирта нисходящей концентрации — на 30 мл 100° спирта добавляют по 30, 20 и 10 капель 1%-ного спиртового раствора каустической соды), промывают абсолютным спиртом для удаления следов щелочи и дифференцируют подкисленным спиртом (одна капля ледяной уксусной кислоты на 30 мл абсолютного спирта). Затем следует обезвоживание препарата и заключение в канадский бальзам. Фон препарата светло-синий, ядра слегка фиолетовые, эритроциты оранжево-красные, включения ярко-красные.

Окраска по Николау—Копчиевской. Раствор А: кислый фуксин — 1,5 г, метиловый спирт — 35 мл, глицерин — 5 мл, 6%-ный раствор щавелевой кислоты — 2 мл, дистиллированная вода — 60 мл. Раствор Б: метиловый синий — 1,5 г, метиловый спирт — 35 мл, глицерин — 5 мл, 6%-ный раствор щавелевой кислоты — 2 мл, дистиллированная вода — 60 мл. Красители растворяют в смеси спирта и воды, затем добавляют глицерин и щавелевую кислоту.

Депарафинированные препараты окрашивают раствором А в течение 1—2 часов, краску сливают и, не промывая, окрашивают раствором Б в течение 20—30 минут, затем тщательно промывают 60° спиртом, 100° спиртом, проводят через кселол и заключают в бальзам. Фон препарата сине-фиолетовый, ядрышки

темно-красные, тельца Бабеша—Негри ярко-красные (Николау—Колчиевская, 1937).

Окраска по Е. Н. Туревичу. Быстрая фиксация материала ацетоном, окраска железным гематоксилином Вейгерта с 10%-ным раствором кислого фуксина. Метод можно применять для окраски срезов ткани, фиксированной и другими жидкостями, но не содержащими формалина. Краску готовят ex temporе из равных объемов 1%-ного раствора гематоксилина и полуторахлористого железа; 1%-ный раствор гематоксилина готовят на 96° спирте. После созревания в течение 2—3 недель в сосуде с открытым горлышком краску фильтруют и хранят в темном флаконе. Полуторахлористое железо готовят на дистиллированной воде из расчета 4 мл полуторахлористого железа и 1 мл крепкой соляной кислоты на 95 мл воды. Оба раствора стойки и могут храниться длительное время, но смесь их нестойкая, поэтому готовить ее надо перед употреблением. Через 20—30 секунд после смешивания растворов смесь приобретает фиолетовый оттенок, и ее можно применять для окраски. Срезы красят в течение 2 минут до появления серого оттенка, промывают водой, докрашивают в течение минуты 1%-ным водным раствором кислого фуксина, промывают и дифференцируют насыщенным раствором пикриновой кислоты, смешанной с 96° спиртом в равном объеме, в течение 20—30 секунд. После удаления пикриновой кислоты тщательной промывкой (во избежание обесцвечивания) препарат проводят через спирты, ксилол и заключают в бальзам. Под микроскопом фон препарата серовато-желтый, ядра и ядрышки черные, эритроциты красные, тельца Бабеша—Негри рубинового цвета с четко выраженной внутренней структурой (Р. М. Шен, Н. Н. Носик, 1965).

Окраска йодистым эозин-метиленовым синим по Л. М. Турбиной. Метод основан на некотором сродстве телец Бабеша—Негри к препаратам йода. После обработки йодом включения более интенсивно адсорбируют эозин. Йодистый эозин готовят по прописи Нери: 0,1 г кристаллического йода и 0,2 г йодистого калия растворяют в 50 мл дистиллированной воды (вначале 10—15 мл, затем добавляют остаток); 1 г водорастворимого эозина также растворяют в 50 мл воды. Затем оба раствора после полного растворения ингредиентов смешивают. Краситель выдерживают для созревания 5—7 дней. В хорошо закупоренных флаконах краска может храниться долгое время. На дне флакона образуется небольшой осадок, в связи с чем перед употреблением краску обязательно фильтруют через бумажный фильтр.

Препараты красят 20—30 минут, промывают и докрашивают водным раствором метиленового синего 1 : 600—1 : 1000 в течение 3—5 минут до приобретения препаратом фиолетового (но не синего) оттенка, дифференцируют 96° спиртом до приобретения синеватого оттенка; далее обезвоживают и заключают в нейтральный канадский бальзам. Фон препарата сине-розовый, эритроциты оранжевые, ядрышки фиолетовые, включения ярко-красные, хорошо видна их внутренняя структура (Р. М. Шен, Н. Н. Носик, 1965).

Окраска мазков и отпечатков. Мазки и отпечатки чаще окрашивают по методу С. Н. Муромцева или Селлерса. Мазки и отпечатки готовят из нефиксированного мозга (лучше из свежего, но можно и из хранившегося в глицерине и даже разложившегося мозга) на тщательно очищенных и обезжиренных стеклах. Кусочек мозга из области аммонова рога растирают в ступке и пестиком делают 5—6 мазков на стекле. Для приготовления отпечатков из аммонова рога вырезают тонкую пластинку ткани размером в 1—2 мм и кладут на сложенную в 4—6 слоев фильтровальную бумагу. Прикладывая обезжиренное стекло к ткани мозга и слегка надавливая, получают отпечатки.

Невысохшие мазки и отпечатки фиксируют около 2 часов в смеси спирта с эфиром или в других фиксаторах.

Окраска по С. Н. Муромцеву. Мазки фиксируют этиловым или метиловым спиртом в течение 1—2 часов, промывают дистиллированной водой, красят 5—10 минут синькой Монсона в разведении 1 : 40. Без предварительного промывания дифференцируют 5—10%-ным раствором таннина — 10 минут до приобретения препаратом голубого оттенка. Затем мазки промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой, проводят через смесь спирта с ацетоном (аа) или спирта с ксилолом, снова высушивают фильтровальной бумагой и заключают

в канадский бальзам. Фон препарата голубой, ядра нервных клеток синие, ядрышки темно-синие, эритроциты оранжево-красные, тельца Бабеша—Негри фиолетовые с розовым оттенком (С. Н. Муромцев, 1926).

Окраска по Селлерсу. При этом способе не нужно предварительно фиксировать препарат. На влажный отпечаток или мазок наносят на 4—5 секунд смесь реактива А (метиленовый синий — 2 г, метиловый спирт без следов ацетона — 100 мл) и реактива В (основной фуксин — 0,5 г, этиловый спирт без следов ацетона — 100 мл). Рабочий раствор красителя состоит из 15 мл реактива А, 2—4 мл реактива В и 25 мл метилового спирта. Сначала смешивают спирт с раствором метиленового синего, затем добавляют раствор фуксина. Смесь хорошо сохраняется на холоде в плотно закрытых флаконах. После окраски препарат промывают проточной водой и высушивают. Цитоплазма нейронов ярко-синяя, ядрышки темно-синие, эритроциты кирпично-красные, тельца Бабеша—Негри пурпурно-красные с отчетливо видной базофильной структурой телец (Селлерс, 1927).

Окраска по Михину. Мазки или отпечатки фиксируют в смеси спирта с эфиром (аа) в течение 5—10 минут, затем просушивают фильтровальной бумагой и окрашивают в течение 30—40 минут краской Гимза (1—2 капли на 1 мл дистиллированной воды), быстро промывают подкисленным спиртом (одна капля ледяной уксусной кислоты на 30 мл 96° спирта), а затем водой, просушивают фильтровальной бумагой и исследуют. Если материал сохраняли в глицерине, его предварительно хорошо прополаскивают в воде и просушивают фильтровальной бумагой.

При микроскопировании основной фон препарата красный с фиолетовым оттенком. Если преобладает синий тон фона, мазок снова отмывают подкисленным спиртом и промывают водой. Пирамидальные нервные клетки синеватые с интенсивно черным ядром, а тельца Бабеша—Негри розовато-красные с точечными включениями темно-синего цвета.

Окраска по Борману—Гайнуллиной. Тонкие мазки или отпечатки в течение 5 минут фиксируют в смеси следующего состава: спирта и эфира (аа) — 98 мл, ледяной уксусной кислоты — 2 мл; после фиксации мазки погружают на 5 минут в 10%-ный раствор кристаллической соды, а затем промывают водой и просушивают на воздухе.

Фиксированные мазки в течение 2 минут окрашивают краской, приготовленной ex tempore (насыщенного раствора метиленовой сини — 3 капли, насыщенного раствора фуксина — 2 капли, водопроводной воды — 20 мл). Раствор краски наливают на мазок, фиксируют над пламенем горелки, затем краску оставляют на мазке еще 1 минуту, после чего промывают водой и просушивают фильтровальной бумагой. В окрашенном препарате основной фон ярко-красный, протоплазма нервных клеток красновато-синяя, а ядра темно-синие, тельца Бабеша—Негри землянично-красного цвета с типично гранулярной структурой. Эритроциты имеют вид неокрашенных кружочков.

Кажал с сотр. (1955) предложили ускоренный метод диагностики бешенства при помощи фазовоконтрастной микроскопии. Исследуемую ткань мозга фиксируют смесью Дюбоск—Бразиль—Буэна в течение 5 минут при 60° или в кипящем 10%-ном формалине в физиологическом растворе (также 5 минут). Затем готовят замороженные срезы и просматривают их в фазовоконтрастном микроскопе. Весь процесс приготовления и исследования препарата длится не более 15 минут (Р. М. Шен, Н. Н. Носик, 1965).

Частота обнаружения телец Бабеша—Негри в мозгу и их размеры зависят от продолжительности инфекционного процесса: в инкубационном периоде (тельца появляются за 3—4 дня до развития первых клинических симптомов) и в самом начале болезни телец немного и они мелкие; к концу болезни количество их возрастает и в размере тельца достигают наибольшей величины. При

этом чем длиннее был инкубационный период инфекции, тем интенсивнее развиваются включения: больше их количество, величина; резче выражена внутренняя структура. У животных, погибших от бешенства после короткого инкубационного периода (2—3 недели), тельца малочисленны, мелкие или могут вовсе отсутствовать (Ю. Н. Мастюкова, 1967).

При буйной форме бешенства у собак в максимальном количестве тельца локализуются в клетках аммонова рога, при паралитической — в продолговатом и спинном мозге.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Биопроба. При отсутствии в исследуемом материале телец Бабеша—Негри ставят биологическую пробу. Для этого из различных отделов центральной нервной системы в стерильных условиях берут кусочки и готовят из них 10%-ную суспензию. Если нет уверенности, что материал стерилен, к нему добавляют антибиотики (500 ЕД пенициллина и 500 ЕД стрептомицина на 1 г ткани) и через 30 минут используют для заражения животных.

Биологическую пробу рекомендуют проводить на белых мышах весом 9—10 г путем внутримозгового заражения. Инкубационный период 8—14 дней и более. Заражают не менее 10—12 мышей, у которых, как правило, развивается паралитическая форма бешенства. Исход заражения животных учитывают по комплексу клинических и морфологических изменений.

Если у зараженных мышей симптомы бешенства не проявляются в течение 25 дней, мышей уничтожают.

Для посмертного диагноза бешенства при помощи биопробы можно использовать как нативный, свежий материал, так и кусочки мозга, длительно хранившегося в 50%-ном нейтральном глицерине (Р. М. Шен, Н. Н. Носик, 1965). Для ускоренного прижизненного диагноза биологическую пробу можно проводить со слюной подозрительных на бешенство животных (М. М. Турбина, 1956).

При просмотре срезов мозга зараженных белых мышей следует учитывать присутствие специфических телец Бабеша—Негри только в нейронах аммонова рога или клетках Пуркинье мозжечка. Известно, что у белых мышей в нейронах головного мозга довольно часто встречаются спонтанные цитоплазматические оксифильные включения типа α и β, описанные Николау и сотр. Включения типа α выявляются в нейронах области третьего желудочка, а типа β — в зрительном бугре (Р. М. Шен и Н. Н. Носик, 1965).

Л. М. Турбина (1956) рекомендует биологическую пробу проводить на мышатах не старше двух недель (вес 4—5 г). Повышенная возрастная чувствительность молодых животных к бешенству, помимо быстрого развития симптомов болезни, выражается и в более раннем появлении у них специфических телец Бабеша — Негри (Л. М. Турбина, 1956).

Зараженных мышат исследуют морфологически в динамике развития инфекции, начиная с 4-го дня от момента заражения, по одному животному ежедневно. Специфические включения обычно выявляются с 4—5-го дня. Таким образом, лабораторный диагноз бешенства по биологической пробе можно сократить на 6—7 дней по сравнению с обычными методами исследования (Р. М. Шен и Н. Н. Носик, 1965).

Биопроба на кроликах. Берут четырех кроликов весом не менее 1,5 кг каждый. Двух кроликов заражают интрацеребрально (по 0,2 мл) и двух — внутримышечно в области бедра (по 0,2 мл). При положительном результате кролики заболевают через 16—21 день. Бешенство у кроликов протекает в тихой, паралитической форме со смертельным исходом. У павших животных извлекают головной мозг и дальнейшее исследование проводят так же, как и при заражении мышей. Наблюдают за кроликами 45—50 дней. По истечении указанного срока их уничтожают.

МЕТОДЫ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ

Метод флуоресцирующих антител для диагностики бешенства предложен сравнительно недавно и широкого практического применения пока не получил. Однако этот метод высокочувствителен, специфичен и по результатам совпадает с биологической пробой. Он позволяет получить ответ в день исследования материала и может заменить биопробу. Метод флуоресцирующих антител основан на микроскопии специфически обработанных тканей антирабической сывороткой, «меченной» флуоресцирующими красителями.

Применяют прямой иммунофлуоресцентный метод, непрямой иммунофлуоресцентный метод, когда флуорохромом метят глобулины, содержащие антитела к антителам, и метод окраски флуорохромом комплемента. Принцип последнего метода заключается в том, что на мазки или срезы, содержащие антиген, наслаивают комплемент (свежую сыворотку крови морских свинок), а затем меченные флуорохромом антитела.

При использовании метода флуоресценции окрашенные структуры соответствуют тельцам Бабеша—Негри. Данный метод пригоден и для обнаружения вируса в слюнных железах больных животных. Для приготовления мазков-отпечатков можно использовать как свежую ткань железы, так и хранящуюся в глицерине (тщательно отмывают от последнего), и даже ткани, растертые в порошок. Желто-зеленая флуоресценция антигена видна довольно отчетливо, несмотря на присутствие большого количества аутофлуоресцирующего материала (Р. М. Шен, Н. Н. Носик, 1965).

Техника приготовления флуоресцирующих антител и использования их для выявления антигена заключается в следующем (Р. М. Шен и Н. Н. Носик, 1965). Антирабический гамма-глобулин конъюгируют красителем. В качестве флуорохрома наиболее ши-

роко применяют изотиоционат-флуоресцин с максимумом н 550 ммк. Оба ингредиента разводят в смеси фосфатного буфер (pH 7,3) с физиологическим раствором из расчета 6—8 мг изо ционата-флуоресцеина на 1 г белка. Конъюгацию проводят на хо лоде в течение 16—18 часов при постоянном перемешивании. По лученный конъюгат очищают на колонке при помощи сефадекса, а затем обрабатывают однократно порошком из печени и мозга мыши для снижения неспецифической флуоресценции. Обработан ный таким образом материал используют для окраски препара тов с последующим исследованием под люминесцентным микро скопом.

Метод флуоресцирующих антител позволяет получить ответ уже через четыре дня. Он по своей чувствительности не уступает биопробе (Е. В. Клюева, Е. В. Семенова и М. А. Селимов, 1963). Авторы используют прямой метод окраски антирабическим лошадиным гамма-глобулином с высоким титром антител, конъюгированных изоционатом-флуоресцеином из расчета 1—2 мг флуорохрома на 100 мг белка.

При прямом методе иммунофлуоресценции препараты можно обрабатывать коммерческим антирабическим лошадиным гамма-глобулином, конъюгированным флуорохромом по общепринятой методике. При непрямом методе препараты первоначально обрабатывают тем же, но не маркированным гамма-глобулином, а затем маркированным антилошадиным гамма-глобулином, полученным иммунизацией петухов или кроликов нормальной лошадиной сывороткой или приготовленным из нее гамма-глобулином.

При люминесцентной микроскопии нормальная ткань мозга флуоресцирует тусклым темноватым светом. Антиген вируса бешенства выявляется в препаратах в виде ярких желтовато-зеленых или зеленых гранул различной формы и величины — от едва заметных до имеющих 15—20 мк в диаметре. В зависимости от вида препарата антиген располагается в протоплазме клеток (гистологические срезы, отпечатки) или свободно, среди тускло люминесцирующего детрита ткани (мазки, отпечатки). Специфичность выявленной флуоресценции проверяют введением соответствующих контролей (Ю. Н. Мастюкова, 1967).

ПРИЖИЗНЕННАЯ ДИАГНОСТИКА ПРИ ПОМОЩИ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ОТПЕЧАТКОВ РОГОВИЦЫ

Установлено, что за несколько дней до клинического проявления болезни вирус бешенства проникает в роговицу глаза. В лабораторной практике показателем для взятия отпечатков роговицы служит подозрение на покус бешеным животным (подозрение в заражении).

Для взятия отпечатков используют узкие обезжиренные предметные стекла (размер 12×60 мм), которыми, отступя 0,5 см от

конца, сильно надавливают на слегка выпяченное глазное яблоко. На одном стекле делают два отпечатка, по одному с каждого конца. Середину стекла предварительно зачищают наждаком, она служит для записи номера животного и времени взятия отпечатков.

Препараты-отпечатки высушивают на воздухе, фиксируют в течение 4 часов в ацетоне при 4° или 10—15 секунд над пламенем горелки и исследуют прямым методом флуоресценции по Кунсу *.

В положительных случаях при иммунофлуоресцентном исследовании отпечатков в протоплазме эпителиальных клеток роговицы обнаруживают светящиеся гранулы, разной формы, зеленовато-желтого цвета и размером от еле заметных пылевидных точек до 2 мк и более. Одна клетка обычно содержит 1, реже 2—3 гранулы. Протоплазма эпителиальных клеток светится тусклым желтовато-зеленоватым светом. Животные, находящиеся в инкубационном периоде болезни и показавшие отрицательные результаты при иммунофлуоресцентном исследовании роговицы, вируса со слюной не выделяют. В связи с выявлением неспецифически светящихся гранул (от 2 до 9%) в эпителиальных клетках роговицы здоровых животных данный метод рассматривается как ориентировочный (Н. А. Ковалев, А. С. Шашенко, 1970).

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

Реакция диффузной преципитации. Реакцию преципитации в агаре при диагностике бешенства применяют для обнаружения специфического рабического антигена в неконсервированном головном мозге животных, павших от уличного бешенства, или от животных, на которых ставили биопробу **.

Для выполнения РДП на бешенство необходимо иметь: а) осветитель, позволяющий получить направленный пучок света; б) агаровый гель, приготовленный по прописи: сухой агар-агар — 12—15 г, химически чистый хлористый натрий — 8,5 г; 1%-ный раствор метилоранжа (фильтрованный) на 50° спирте — 5—10 мл; мертиолат — 0,01 г; вода дистиллированная — 1,0 л; в) диагностический антирабический глобулин (сухой); г) контрольный положительный антиген: д) контрольный отрицательный антиген.

Для приготовления агарового геля любой агар (японский, архангельский, одесский и др.) предварительно обрабатывают. Для этого агар помещают в марлевый мешочек, выдерживают под проточной водой двое суток и затем столько же времени вымачивают в дистиллированной воде при шестикратной

---

* Вначале на препараты-отпечатки наносят несколько капель разбавленного в соответствии с рабочим разведением конъюгированного изотиоцианата антирабического гамма-глобулина и выдерживают 20 минут при 25—27° в закрытом сосуде с увлажненным дном. Затем окрашенные препараты в течение 1 часа дважды отмывают в 0,01М растворе фосфатного буфера (pH 7,2—7,4), споласкивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Препараты исследуют на микроскопе МЛ-2А с возбуждающими фильтрами СФ-1-4; СЗС-7-2; СЗС-24-4 и запирающим фильтром № 1. В каждом отпечатке просматривают по 100 эпителиальных клеток.

** Методика утверждена Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР от 27 февраля 1970 г.

ее смене. Затем агар высушивают на воздухе и используют по мере надобности. Перед использованием его растворяют (по прописи) при нагревании в соответствующем объеме дистиллированной воды (в колбе или эмалированной посуде), добавляют чистый хлористый натрий и мертиолат, устанавливают pH 7,2—7,4 и фильтруют через двойной слой фильтровальной бумаги до полной прозрачности среды (в коховском аппарате или автоклаве при текучем паре). В профильтрованный агар добавляют указанное количество метилоранжа. Для длительного хранения агаровый гель разливают во флаконы и укупоривают.

Мертиолат обладает бактериостатическим и бактерицидным действием, а краска метилоранж придает среде оранжевый цвет, улучшающий видимость белых линий преципитации.

Диагностический антирабический глобулин (сухой) готовят из антирабической сыворотки лошадей или ослов. Перед употреблением готовят исходный раствор глобулина (к содержимому одной ампулы добавляют 3 мл дистиллированной воды) и используют для постановки в реакции в разведениях, указанных ниже.

Контрольный положительный антиген предназначен для проверки специфичности реакции. Это гомогенизированный и лиофилизированный головной мозг 1—2-месячных щенят (котят, ягнят), павших после интрацеребрального заражения вирусом-фикс (можно использовать для заражения обычную антирабическую вакцину), и консервированный мертиолатом 1 : 5000. Перед употреблением ампулу вскрывают, в нее добавляют 3 мл дистиллированной воды и через 20—30 минут эту тканевую суспензию используют в качестве положительного контрольного антигена.

Контрольный отрицательный антиген используют для проверки специфичности самой реакции преципитации. Готовят его аналогично контрольному положительному антигену из мозга здоровых собак (котят, ягнят). Методика использования отрицательного антигена аналогична методике применения контрольного положительного антигена.

Постановка реакции. На обезжиренное, слегка подогретое (над пламенем) предметное стекло наносят каплю расплавленного агара, делают мазок (наподобие мазка крови) и на застывший агар наливают сверху еще 2,5 мл среды, которую равномерно распределяют по поверхности стекла слоем толщиной приблизительно 2 мм (эта часть работы выполняется на горизонтальной поверхности). Затем стекла после застывания агара попарно вносят в чашки Петри, куда с двух сторон помещают кусочки ваты, смоченные водой, или стекла с агаром хранят во влажном эксикаторе над слоем воды для предотвращения высыхания агара. Стекла с агаром используют в течение 7 дней после приготовления.

Лунки в агаре пробивают тонкостенной металлической (стеклянной) трубочкой с внутренним диаметром 4—5,6 мм (можно использовать гильзу патрона мелкокалиберной винтовки), располагая их согласно трафарету.

Трафарет предварительно вычерчивают на бумаге и помещают под стекло. Образовавшиеся «пыжи» извлекают острым концом ученического пера. Луночки не оплавляют. Необходимо следить за тем, чтобы агаровый гель не отслаивался от стекла, так как в этом случае антиген и антитела подтекают под слой агара и линий преципитации может не образоваться.

При исследовании головного мозга крупного рогатого скота, лошадей, верблюдов, собак, лисиц, кроликов и других животных

необходимо проверять в реакции следующие отделы мозга: кору полушарий левой и правой стороны (А, Б), аммоновы рога — левый и правый (С, Д), мозжечок (Е) и продолговатый мозг (Ж).

Исследуя мозг крыс, сусликов, морских свинок, хомяков и др., рекомендуется проверять в реакции три каких-либо отдела. От мышей исследуют весь головной мозг, гомогенизированный до пастообразной консистенции.

Луночки, обозначенные цифрами 1, 2, 3, 4 (рис. 5), заполняют преципитирующим глобулином в разведениях 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8; 1 : 16 (от исходного разведения) на физиологическом растворе.

Контроли с положительными и отрицательными антигенами ставятся одновременно, но каждый на отдельном стекле, в том же агаре, по тому же трафарету. При этом достаточно заполнить две лунки положительным и отрицательным антигенами, а лунки вокруг — глобулином в указанных разведениях.

После помещения в лунки исследуемой мозговой массы, контрольных положительного и отрицательного антигенов и глобулина в соответствующих разведениях предметные стекла помещают в чашки Петри с кусочками влажной ваты или во влажный эксикатор и ставят в термостат при 37—38° на 6 часов. Затем чашки оставляют при комнатной температуре еще на 18 часов.

Реакцию учитывают через 3, 6 и 24 часа после постановки. Часто положительная реакция отмечается уже через 2,5—3 часа (+) и соответствует образованию одной и реже 2—3 линий преципитации между ближайшими лунками, содержащими антиген и глобулин. Окончательно реакцию учитывают через 24 часа.

Линии преципитации могут образоваться вокруг лунки с антигеном со всеми разведениями глобулина и нередко с исследуемым материалом из всех отделов мозга; в других случаях реакция бывает положительной с материалом только из некоторых отделов мозга и с отдельными разведениями глобулина. Это объясняется содержанием неодинакового количества антигена в различных участках исследуемого мозга. Для постановки положительного диагноза достаточно образования линии преципитации с материалом из одного отдела головного мозга с одним разведением глобулина. Образовавшиеся линии преципитации видимы визуально при просвечивании стекол осветителем снизу вверх под углом приблизительно 45°.

При положительной реакции преципитации в прозрачном агаре между лунками с глобулином и антигеном могут образоваться одна, две и очень редко три параллельно расположенные линии преципитации. При отрицательных показаниях реакции преципитации проводят биопробу на 5—10 белых мышах или двух морских свинках путем интрацеребрального их заражения. За зараженными животными наблюдают не менее $1^1/_2$ месяцев.

Павших после заражения животных (мыши, морские свинки) обследуют при помощи реакции преципитации и в зависимости от ее показаний ставят окончательный диагноз.

Для постановки реакции преципитации можно брать головной мозг животных, хранящийся в течение месяца при комнатной температуре.

Нервная ткань, консервированная глицерином, формалином, ацетоном или спиртом, для исследования при помощи реакции преципитации непригодна.

Реакция преципитации является экспрессным методом диагностики, позволяющим в течение суток поставить диагноз на бешенство более чем в 95% случаев по материалу, взятому от павших животных, что всегда может быть подтверждено последующей биопробой.

Диагностировать бешенство при помощи РДП можно независимо от наличия или отсутствия в патологическом материале телец Бабеша—Негри.

Реакция связывания комплемента. В практике диагностической работы наиболее приемлемой является РСК как ориентировочный тест при постановке диагноза.

Для проведения данной реакции необходимо иметь очищенные активные антигены из диагностического материала, а также гипериммунные сыворотки лабораторных животных, не обладающие антикомплементарными свойствами.

Антигены из исследуемой ткани мозга получают по методу В. И. Ильенко или Казалса. В последнем случае препараты сохраняют выраженную инфекционность, поэтому работа с ними должна вестись в соответствии с режимом, установленным для особо опасных инфекций. Эфирные антигены (по В. И. Ильенко) полностью инактивированы, не уступают по своей активности живому антигену (Р. М. Шен, Н. Н. Носик, 1965). Антигены из слюнных желез или смывов ротовой полости больных бешенством животных непригодны для серодиагностики бешенства при помощи РСК.

Перед иммунизацией сыворотку каждого донора (кролик, морская свинка, крыса) проверяют на антикомплементарность. Перед постановкой РСК сыворотки прогревают при 60° в течение 20 минут. Реакцию ставят по общепринятой методике с титрованием комплемента по А. А. Смородинцеву.

При использовании активных мозговых антигенов положительные данные по РСК в большем проценте случаев совпадают с результатами морфологических и биологических исследований того же материала (Л. М. Турбина, 1956).

КОМПЛЕКСНАЯ ДИАГНОСТИКА*

В связи с тем, что в степных зонах Казахстана ведущая роль в передаче бешенства принадлежит лисам и корсакам, в нервных клетках которых и мозге покусанных ими животных телец Бабе-

* Комплексная диагностика бешенства предложена Т. А. Коломакиным, Т. Д. Барминовой, М. М. Смирновой и М. С. Тимониной (1968).

ша—Негри, как правило, не образуется, предложено проводить диагностику бешенства комплексно: окрашивать мазки из разных отделов мозга по Селлерсу, делать парафиновые срезы для гистодиагностики по Туревичу, а также ставить РДП с пробами нефиксированного мозга разных отделов с антирабическим γ-глобулином или применять метод люминесцирующих антител. По их данным, комплексная диагностика с применением указанных методов позволила в течение 5 суток подтвердить диагноз заболевания в 378 случаях.

ВЕЗИКУЛЯРНЫЙ СТОМАТИТ
(SORE MOUTH)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Везикулярный стоматит — остро протекающая вирусная болезнь лошадей и мулов, крупного рогатого скота и свиней, клинически проявляющаяся образованием везикул в ротовой полости, поражением сосков вымени, реже — межкопытной щели, венчика и мякишей; болезнь обычно протекает в виде энзоотических вспышек или эпизоотий.

Из-за исключительного сходства клинических признаков везикулярный стоматит долго смешивали с ящуром и с пустулезным стоматитом (оспа лошадей). Специальными исследованиями доказано, что эти болезни вызывают совершенно разные вирусы.

В естественных условиях болезнь зарегистрирована и постоянно диагностируется в странах Северной и Южной Америки (США, Канада, Аргентина, Венесуэла). Описаны единичные вспышки инфекции среди лошадей и мулов в Южной Африке и Европе (Франция, Англия, Италия), куда она была завезена из США и Канады вместе с воинскими лошадьми. В Советском Союзе везикулярный стоматит не регистрируется.

Экспериментально можно инфицировать животных почти всех видов. Прежде везикулярный стоматит был известен преимущественно как болезнь лошадей, теперь он чаще встречается у крупного рогатого скота. Возможно случайное заражение людей в лабораторных условиях или в результате прикосновения руками к пораженным соскам вымени больных коров. У людей болезнь может протекать в латентной форме или напоминать грипп.

ВИРУС

Возбудителем везикулярного стоматита является морфологически необычный, РНК-содержащий вирус, имеющий форму сигары, относящийся к группе арбовирусов. Размеры вириона, по данным электронной микроскопии, 210×60 или 176×69 ммк. Наряду с типичными сигаровидными частицами встречаются овальные или шарообразные частицы. Вирионы окружены двойной липопротеиновой оболочкой.

Вирус свободно фильтруется через фильтры Беркефельда V и Шамберлена L_2—L_7, а также через фильтры Зейтца.

Устойчивость. Вирус является фоточувствительным и легко инактивируется видимым светом, а также УФ-лучами. Он чувствителен к эфиру и дезоксихолату натрия, устойчив в широкой зоне pH (pH 4,0—10,0), но быстро разрушается при pH 3,0. Оптимальная зона pH 6,0—8,0. При 56—58° вирус инактивируется в течение 20—30 минут, при 100° — мгновенно. При 37° инфицированная аллантоисная жидкость сохраняет активность в течение 3—4 дней. В фосфатном буферном растворе (pH 7,6—7,2) при 37° вирус сохраняет активность 52 часа, при 4° — 100 часов. Он хорошо переносит многократное замораживание и оттаивание, а также лиофилизацию. В 0,85%-ном растворе NaCl при минус 20° вирус инактивируется через 21 день. Вирус устойчив к спирту, 0,5%-ному фенолу и глицерину; 0,5%-ный формалин инактивирует вирус менее чем за 48 часов. В клетках пораженной ткани вирус более устойчив к действию

различных факторов, чем в лимфе. Добавление сыворотки способствует защите вируса от неблагоприятных воздействий.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Вирус хорошо сохраняется в замороженном (минус 20° и ниже) и лиофилизированном состоянии. В 50%-ном забуференном растворе глицерина (pH 7,5) при 4—6° вирусные материалы сохраняют активность около 4 месяцев.

Локализация в организме. У больных животных вирус содержится в высоких концентрациях (10^5—10^7) в лимфе пузырей и в их стенках, а также в слюне. По мере развития инфекции активность вируса изменяется. Наибольшей инфекционностью обладает лимфа, собранная из везикул в первые 24 часа после их появления. В более поздние сроки (24—72 часа) активность лимфы значительно снижается, хотя и после трех дней инфекционность стенок пузырьков и их содержимого остается еще довольно высокой.

Антигенные свойства и вариабельность. Вирус везикулярного стоматита вызывает появление в крови переболевших животных специфических вируснейтрализующих и комплементсвязывающих антител. Нейтрализующие антитела обнаруживаются на 7—10-й день болезни.

У крупного рогатого скота и лошадей комплементсвязывающие антитела можно обнаружить на 6—8-й день после заражения, к 9—16-му дню они достигают максимума и, постепенно снижаясь, к 50—110-му дню исчезают. Нейтрализующие антитела в достаточно высоких титрах у некоторых животных могут сохраняться до 13 и даже до 48 месяцев. Выздоровевшие животные с высоким уровнем нейтрализующих антител, но отрицательно реагирующие по РСК, чувствительны к повторному заражению гомологичным вирусом.

В опытах перекрестного заражения, а также при помощи реакции нейтрализации выявлены два основных серотипа вируса —«Индиана» и «Нью-Джерси», которые различаются как в иммунологическом, так и в антигенном отношениях. Однако в РСК и реакции камедьагглютинации эти типы дают перекрестные реакции, что свидетельствует о наличии у них общего антигена. При помощи РДП в агаровом геле также удалось выявить наличие общего для обоих серотипов растворимого антигена.

Вирус везикулярного стоматита не имеет антигенного и иммунологического родства с вирусом ящура и с вирусом везикулярной экзантемы.

Спектр патогенности. В естественных условиях вирус патогенен для крупного рогатого скота, лошадей, мулов, свиней, овец, а также для енотов и, вероятно, для оленей. В экспериментальных условиях можно инфицировать животных почти всех видов. Крупный рогатый скот, лошадей, свиней, овец легко удается заразить при введении вируса в язык или в десну, а также при втирании вирусного материала в скарифицированные слизистые оболочки. При внутримышечном заражении крупный рогатый скот не заболевает, а при аэрозольном заражении клинически выраженного заболевания не развивается, хотя у животных отмечают появление специфических антител. Контактное заражение в эксперименте удается не всегда.

Из лабораторных животных к вирусу чувствительны морские свинки весом 500—600 г, которых легко заразить почти любым штаммом вируса, при различных методах инокуляции (интраплантарно, в язык, интрацеребрально). Кроликов удается заразить в язык (не всеми штаммами), а также при введении вирусного материала интрацеребрально. Мыши 3—4-недельного возраста чувствительны к вирусу при интрацеребральном заражении. Мышат-сосунов 7—10-дневного возраста можно легко заразить как при интрацеребральном, так и при интраперитонеальном введении вирусного материала. Вирус размножается также на куриных эмбрионах 7—8-дневного возраста при введении на хорионаллантоисную мембрану и инкубировании их при 35°. С возрастом чувствительность эмбрионов к вирусу снижается. Молодых цыплят удается заразить интрацеребрально, но непрерывное серийное пассирование вируса на них не удается (Скиннер, 1957). Других домашних птиц, особенно уток и гусей, можно заражать при введении материала в язык и в плантарную поверхность лапок.

Культивирование в лабораторных условиях проводят на куриных эмбрионах 7—8-дневного возраста (заражение на хорионаллантоис),

мышатах-сосунах 7—10-дневного возраста (интрацеребрально и интраперитонеально), а также в первичных культурах фибробластов куриного эмбриона и клетках почечной ткани морских свинок, крупного рогатого скота и свиней. Вирус удается также культивировать во многих перевиваемых линиях клеток различного происхождения (L, HeLa, КВ и др.). Размножение вируса в культурах клеток сопровождается развитием цитопатических изменений. В монослойных культурах почечных клеток под агаром вирус вызывает образование бляшек.

К вирусу наиболее чувствительны куриные эмбрионы 7—8-дневного возраста, а также мышата-сосуны 7—10-дневного возраста при интрацеребральной инокуляции материала (Феллоус и др. 1956). Титры вируса в этих системах могут достигать $10^{7,5}$—$10^{9,0}$ ID_{50}/мл. При интрацеребральном заражении мышата более чувствительны к вирусу, чем куриные эмбрионы, а при внутрибрюшинном заражении мышат чувствительность этих двух систем одинакова.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Клинически везикулярный стоматит протекает примерно так же, как ящур, везикулярная экзантема свиней и др. Поэтому симптомы болезни и патологоанатомические изменения не могут служить основой для эффективной диагностики этой инфекции.

Наряду с обязательным тщательным анализом эпизоотической ситуации, следует использовать комплекс различных лабораторных методов исследования, основными из которых являются:

1) выделение и идентификация вируса из патологических материалов от больных животных;

2) биологическая проба на морских свинках и лошадях.

Для подтверждения диагноза ставят также РСК и реакцию нейтрализации в культуре ткани или на куриных эмбрионах.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материалов. Для выделения возбудителя везикулярного стоматита используют ткань нелопнувших или свежелопнувших пузырьков, а также жидкость из неразорвавшихся пузырьков. Можно использовать также слюну, собранную от недавно заболевших животных. Наибольшую ценность представляет материал, взятый в течение первых суток после появления пузырей. Чаще всего и в наиболее высоких титрах (до 10^7 ID_{50}) вирус удается выделить из жидкости и стенок целых везикул.

Содержимое везикул собирают стерильным шприцем и помещают в стерильную пробирку, закрытую резиновой пробкой и завернутую в черную бумагу, чтобы исключить губительное действие света.

Кусочки ткани нелопнувших или свежелопнувших везикул помещают в стерильную посуду из темного стекла, содержащую 50%-ный раствор забуференного глицерина (pH 7,4—7,6). При обильном слюнотечении слюну недавно заболевших животных собирают в стерильную банку.

Материал и пробы слюны обрабатывают по обычной методике и используют для выделения вируса.

Заражение животных. Мышат-сосунов 7—10-дневного возраста или мышей 3—4-недельного возраста обычно заражают интрацеребрально по обычной методике, используя по 6—8 животных на каждый материал и вводя его непосредственно в мозг в дозе 0,03 мл. Мышатам-сосунам материал можно вводить интраперитонеально (в этом случае объем дозы может составлять 0,05—0,1 мл).

За зараженными животными наблюдают в течение 10—14 дней. Гибель в течение первых 24 часов после заражения считают неспецифической. В положительных случаях у мышей развивается типичный энцефалит с характерными симптомами поражения нервной системы (взъерошивание шерсти, дрожание, атаксия, спастический паралич задних конечностей). При наличии в исследуемом материале достаточно активного вируса мыши погибают в основном между 48 и 72 часами после заражения. В наибольших количествах вирус содержится у них в мозгу и в мышечной ткани.

Для выделения вируса на морских свинках материал вводят интраплантарно в подошвенную поверхность задних лапок взрослым животным весом 500—600 г (более молодые животные менее чувствительны и реагируют не так четко). За зараженными животными наблюдают в течение 8 дней. В положительных случаях у них через 44—50 часов после заражения появляются первичные везикулы, наполненные вирусной лимфой и напоминающие первичные ящурные афты. Через 4—10 дней после заражения примерно у 50% животных появляются вторичные везикулы на плантарных поверхностях других конечностей, изредка на языке. Прозрачная жидкость пузырьков быстро резорбируется, и на протяжении 8—10 дней животные выздоравливают. Первичные пузырьки не разрываются. Материалом для дальнейших исследований служат лимфа и стенки везикул.

Через 2—5 дней после интрацеребрального заражения у свинок развивается энцефалит, характеризующийся общей слабостью, подавленностью, развитием пареза задних конечностей, который через 2—3 дня переходит в полный паралич. Около 60% морских свинок, зараженных интрацеребрально, погибают.

Для выделения вируса используют 7—8-дневные куриные эмбрионы. Исследуемый материал в дозе 0,2 мл инокулируют на хориоаллантоисную мембрану, используя по 8—10 эмбрионов на каждый материал. Зараженные эмбрионы инкубируют при 35° ежедневно в течение 10 дней, проводя овоскопию для выявления погибших. В положительных случаях эмбрионы погибают от действия вируса через 2—3 дня. Максимальное накопление вируса в тканях куриного эмбриона отмечают через 40—48 часов после инокуляции. В наибольших количествах вирус содержится в головном мозге, коже, печени, в хориоаллантоисной оболочке и в аллантоисной жидкости.

Для дальнейших пассажей используют аллантоисную жидкость и хориоаллантоисную оболочку, которую измельчают, готовят 10%-ную суспензию, затем центрифугируют и после добавления

антибиотиков используют для заражения новой партии эмбрионов. С каждым материалом проводят 4—6 серийных пассажей.

Культуры клеток также можно использовать для выделения и культивирования вируса везикулярного стоматита, но они пока еще не находят широкого применения.

Чаще применяют культуры клеток почки теленка или морской свинки, а также фибробластов куриного эмбриона, которые получают и выращивают по обычной методике. В качестве поддерживающей среды используют 0,5%-ный гидролизат лактальбумина на растворе Хэнкса (pH 7,2—7,4) без сыворотки или с 2% нормальной сыворотки крупного рогатого скота. Зараженную культуру инкубируют на протяжении 4—5 дней. В положительных случаях через 48—96 часов после инокуляции в культуре отмечают появление очагов округлых клеток, которые затем отслаиваются от стекла. При гистологическом исследовании обнаруживают сокращение цитоплазмы, пикноз и грануляцию ядер. При высоких концентрациях вируса в исследуемом материале максимальные титры вируса в культуре (обычно $10^{6,2}$—$10^{6,5}$ $ТЦД_{50}$/мл) обнаруживают через 24 часа, затем титры вируса начинают быстро снижаться и к 48 часам после инокуляции могут понизиться на 1,5—2,0 единицы lg.

Культуральный вирус является хорошим комплементсвязывающим антигеном и может быть использован для постановки РСК. Его можно применять также для постановки реакции нейтрализации. Хранят его в замороженном состоянии при минус 20—70°.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

В связи с тем, что везикулярный стоматит сходен с ящуром и везикулярной экзантемой свиней, дифференциальная диагностика этих болезней при возникновении подозрений на везикулярный стоматит весьма сложна, и требуется обязательное проведение серологических методов исследования.

В настоящее время для этого часто используют РН и РСК. Кроме того, можно проводить биопробу на естественно восприимчивых животных (лошади, крупный рогатый скот, свиньи), а также заражать куриные эмбрионы и молодых цыплят. Более подробно эти методы будут рассмотрены при описании дифференциальной диагностики.

Серологическая идентификация

Для серологической идентификации обычно используют РН и РСК. Можно проводить также реакцию камедьагглютинации, основанную на том, что антитела к этому вирусу адсорбируются частицами ионообменной смолы, в результате чего покрытые антителами частицы камеди агглютинируются в присутствии вируса.

Реакцию нейтрализации (РН) ставят на куриных эмбрионах или в культуре ткани, используя штаммы вируса, хорошо адаптированные к той или иной системе культивирования. Для идентификации вируспецифического антигена необходимо наличие стандартных моноспецифических антисывороток к двум основным

серотипам вируса («Индиана» и «Нью-Джерси»), а для выявления нейтрализующих антител — наличие стандартных лабораторных штаммов вируса двух этих типов.

В качестве антигена используют вируссодержащие аллантоисные жидкости или культуральный вирус, которые сохраняют при минус 20°. Специфическую антисыворотку получают от морских свинок весом 500—600 г, выздоровевших после интраплантарного заражения вирусом везикулярного стоматита известных серотипов. Кровь для приготовления сывороток берут через 14—21 день после заражения. Полученую антисыворотку проверяют на типоспецифичность в перекрестной реакции нейтрализации со стандартными штаммами вируса везикулярного стоматита известных серотипов, после чего расфасовывают и хранят до использования в замороженном состоянии (минус 20—30°).

Пробы сыворотки от переболевших животных, направляемые для серологического исследования, обычно берут через 2—3 недели после начала заболевания или в более поздние сроки. Для облегчения транспортирования в лабораторию можно посылать пробы сыворотки, адсорбированной на дисках или полосках фильтровальной бумаги. Если возможно, особенно в энзоотически неблагополучных по везикулярному стоматиту районах, желательно для исследования направлять сыворотки от одних и тех же животных, взятые в острой фазе болезни и через 2—3 недели.

Пробы испытуемых сывороток, доставленных в жидком виде, хранят до использования замороженными, а пробы, адсорбированные на фильтровальной бумаге,— в сушильном шкафу.

Перед использованием на каждый диск наносят по 0,6 мл бульона или среды для тканевых культур, чтобы элюировать нейтрализующие антитела. Жидкие пробы сывороток предварительно прогревают при 56° в течение 30 минут. Загрязненные сыворотки и гемолизированную кровь фильтруют или центрифугируют при 3000—5000 об/мин 30 минут и обрабатывают антибиотиками (по 1000 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 мл).

Для реакции нейтрализации на куриных эмбрионах используют 8-дневные эмбрионы. При постоянном разведении сыворотки и различных дозах вируса серийные 10-кратные разведения суспензии вируса смешивают с равными объемами разведенной 1 : 5 инактивированной сыворотки каждого типа. Смесь встряхивают и инкубируют в водяной бане при 25° в течение 30 минут, после чего охлаждают в водяной бане со льдом. По 0,15—0,2 мл смеси вводят в аллантоисную полость куриных эмбрионов, используя по пять эмбрионов на разведение. Параллельно вирус титруют в тех же разведениях в смеси с нормальной сывороткой. Эмбрионы инкубируют при 35°, ежедневно на протяжении четырех дней просматривая их и учитывая все погибшие эмбрионы. Гибель эмбрионов в течение первых суток считают обусловленной неспецифическими признаками и не учитывают в расчетах. LD_{50} рассчитывают по Риду и Менчу. Вируснейтрализующую активность сыво-

роток выражают в виде индекса нейтрализации по разнице в титрах вируса в присутствии нормальной и иммунной сыворотки. Сыворотки считают положительными, если их индекс нейтрализации равен 2,5.

При постановке реакции с серийными разведениями сыворотки и постоянной дозой вируса используют по четыре эмбриона на разведение. Разведение вируса подбирают на основании результатов предварительного титрования таким образом, чтобы в дозе 0,1 мл он вызывал гибель эмбрионов через 48—72 часа. Сыворотку обычно берут в разведениях 1 : 4, 1 : 16, 1 : 64 и 1 : 256. Методика постановки аналогична описанной выше.

Параллельно ставят реакцию с антисыворотками или стандартными штаммами, соответствующими двум основным иммунологическим типам вируса («Индиана» и «Нью-Джерси»).

При небольшом объеме серологических исследований реакцию нейтрализации в культуре клеток ставят по обычной методике, используя монослойные культуры первично трипсинизированных клеток почечной ткани крупного рогатого скота, выращенные в пробирках. При массовых исследованиях реакцию ставят с использованием цветного теста с суспензией клеток в нетоксичных винипластовых пластинках с лунками.

Реакцию нейтрализации в культурах ткани ставят обычно с постоянной дозой вируса (100 $ТЦД_{50}$) и четырехкратными серийными разведениями сывороток (от 1 : 4 до 1 : 256) на растворе Хэнкса или среде для тканевых культур.

Ниже приведена методика постановки реакции нейтрализации с использованием цветной пробы.

Для приготовления разведений сыворотки 0,2 мл испытуемой сыворотки добавляют к 0,6 мл разбавителя в первой пробирке, после чего переносят 0,2 мл в следующую пробирку, содержащую 0,6 мл разбавителя, и т. д. Из последнего разведения 0,2 мл жидкости выливают. Затем в каждую пробирку с соответствующим разведением сыворотки добавляют 0,6 мл рабочего разведения вируса, содержащего 100 $ТЦД_{50}$. Смесь встряхивают и выдерживают 30 минут при 37°, после чего ее переносят по 0,5 мл из пробирок в лунки пластинок, используя по две лунки на разведение. Затем в те же лунки добавляют по 0,5 мл суспензии первично трипсинизированных клеток почки крупного рогатого скота с концентрацией 200 000 клеток в 1 мл (суспензию готовят на 0,5%-ном растворе гидролизата лактальбумина с 2% нормальной телячьей сыворотки, предварительно проверенной на отсутствие антител к обеим серотипам вируса везикулярного стоматита антибиотиками и феноловым красным). Лунки, в которые добавлена только суспензия клеток, служат нормальными контролями культуры. Клеточные суспензии, которые добавлены в лунки, содержащие вирус без сыворотки, используют в качестве контроля вируса. Лунки запечатывают сверху клейкой целлофановой лентой и пластинки инкубируют в термостате при 37°. Результат учитывают макроскопически через 48, 72 и 96 часов. В контроле культуры и в лунках, где сыворотка нейтрализовала вирус, цвет среды становится желтым. В контроле вируса и в лунках, где антитела к вирусу в сыворотках отсутствуют или содержатся в недостаточном количестве, чтобы предотвратить действие вируса, цвет среды остается красным, клетки отделены от дна лунки и плавают в среде. При микроскопическом исследовании их можно обнаружить сокращение цитоплазмы, пикноз ядра, грануляции.

Титр вируснейтрализующих антител определяют по Риду и Менчу или Керберу.

По данным Вэдламэди и Хэнсона (1963), куриные эмбрионы и культуры ткани одинаково чувствительны для выявления вирусснейтрализующих антител к вирусу везикулярного стоматита в сыворотках крови переболевших животных.

Реакцию связывания комплемента применяют для идентификации вируса и для проведения серологических исследований по определению комплементсвязывающих антител с целью ретроспективной диагностики болезни.

В первом случае используют стандартные моноспецифические антисыворотки к известным типам вируса везикулярного стоматита («Индиана» и «Нью-Джерси»), которые получают от морских свинок по методике, аналогичной описанной выше применительно к антисывороткам для реакции нейтрализации. Во втором случае используют антиген известного серотипа в постоянном титре. Однако недостатком последнего метода является позднее выявление антител в сыворотках реконвалесцентов и снижение титров через два месяца после заражения у крупного рогатого скота и через три месяца — у лошадей.

В качестве антигена для РСК чаще используют кусочки стенок лопнувших и нелопнувших везикул, собранных от животных, заболевших в естественных условиях, а также различные материалы, полученные в результате лабораторных исследований по выделению вируса (мозг и мышцы погибших мышат, экстраэмбриональные жидкости и хориоаллантоисные оболочки инфицированных куриных эмбрионов, культуральный вирус).

Для приготовления антигена из измельченных тканей готовят 10%-ную взвесь на триптозо-фосфатном бульоне или забуференном физиологическом растворе (pH 7,4). Суспензию центрифугируют 20 минут при 2000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость прогревают 30 минут при 56 или 60° для инактивации вируса (прогретый антиген обладает почти такой же комплементсвязывающей активностью, но совершенно безопасен) (Димопулос и др., 1957), после чего готовят серийные двукратные разведения на физиологическом растворе.

Реакцию ставят по обычной методике. Все компоненты в реакции берут в объеме 0,25 мл. Прогретый антиген обычно работает в разведениях 1 : 8—1 : 16, непрогретый — 1 : 16—1 : 32.

Для приготовления антигена из вируса, выращенного на куриных эмбрионах, вируссодержащую аллантоисную жидкость, обработанную антибиотиками (по 1000 ЕД пенициллина и стрептомицина), в дозе 0,15—0,2 мл вводят в аллантоисную полость 8-дневных эмбрионов и инкубируют их при 35°. Эмбрионы, погибшие между 16 и 28 часами после заражения, выдерживают в течение ночи при 4°, а затем вскрывают, при помощи вакуумного отсоса собирают аллантоисную жидкость и помещают ее на лед. Затем асептически извлекают хориоаллантоисную оболочку; 1 часть хориоаллантоисной оболочки и 4 части инфицированной аллантоисной жидкости измельчают в размельчителе в течение 4 минут. Этот

маточный вирусный антиген расфасовывают, замораживают и хранят до использования при минус 60°. Непосредственно перед постановкой реакции его быстро размораживают, центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10 минут и используют для приготовления серийных двукратных разведений. Приготовленные по этой методике антигены имеют титр 1 : 128 и выше. Они сохраняют свою активность без изменения по крайней мере в течение 5 месяцев. При проверке титра инфекционности такого материала на 8-дневных куриных эмбрионах он обычно составляет около $10^{8,5}$ $ЭД_{50}$/0,15—0,2 мл.

Контрольный антиген для исключения неспецифической комплементсвязывающей активности готовят аналогичным образом, для чего смешивают 1 часть хориоаллантоисной оболочки незараженных 9-дневных куриных эмбрионов с 4 частями нормальной аллантоисной жидкости.

Гелета и Холбрук (1961) рекомендуют использовать в качестве разбавителя для РСК вероналовый буфер по Бруксби, но без кальция и хлористого магния, а суспензию бараньих эритроцитов хранить в модифицированном растворе Альсвера (0,42 г NaCl, 1,2 г цитрата натрия и 2,05 г декстрозы на каждые 100 мл раствора) при 4°. При титровании антигена серийные двукратные разведения его титруют против разведенной 1 : 5 стандартной гипериммунной сыворотки морской свинки. Для постановки РСК основной антиген мембран разводят 1 : 5. Контрольный антиген также разводят 1 : 5.

При использовании РСК для определения сывороточных антител берут сыворотки от переболевших животных, которые замораживают и хранят при минус 60° или консервируют, добавляя 0,5% фенола и хранят при 4°. Все проверяемые образцы разводят 1 : 5 забуференным вероналовым физиологическим раствором и инактивируют нагреванием в водяной бане в течение 30 минут (сыворотки крови крупного рогатого скота — при 56°, сыворотки крови лошади — при 58°). Из прогретой сыворотки готовят двукратные серийные разведения на забуференном вероналовом физиологическом растворе и по 0,25 мл вносят в три ряда пробирок, куда добавляют затем по 0,25 мл комплемента и по 0,25 мл разведенного 1 : 5 исходного антигена. В пробирки первого ряда вносят гомологичный антиген, в пробирки второго — антиген вируса второго типа, а в пробирки третьего — нормальный антиген. Смеси тщательно встряхивают и инкубируют в водяной бане при 37° в течение 2 часов, после чего добавляют по 0,5 мл суспензии сенсибилизированных эритроцитов и дополнительно инкубируют при 37° еще 30 минут.

Контроли реакции: контроль антигена, контроли проверяемых сывороток, контроль сенсибилизированных эритроцитов. Параллельно для контроля ставят РСК с известными типоспецифическими иммунными сыворотками к вирусу типа «Нью-Джерси» и «Индиана» и соответствующими стандартными штаммами.

Результаты РСК учитывают визуально, оценивая их от — (полный гемолиз) до ++++ (отсутствие гемолиза). Конечная точка

титрования антител — наивысшее разведение сыворотки, дающее связывание более чем на ++. Титры КС-антител через 14 дней после заражения могут достигать 1 : 40 и выше у крупного рогатого скота и 1 : 80 и выше у лошадей.

Прочие методы идентификации вируса. В последние годы появляются сведения (Нарделли и др., 1968), свидетельствующие о возможности ориентировочной дифференциации вируса везикулярного стоматита от возбудителей сходных инфекций (ящур, везикулярная экзантема свиней) на основании различий их по некоторым физико-химическим свойствам, в частности по устойчивости в кислой среде (pH 5,0) и чувствительности к эфиру (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1

Вирус	Стабильность при pH 5,0	Устойчивость к эфиру
Вирус везикулярного стоматита	+	—
Вирус ящура	—	+
Вирус везикулярной экзантемы свиней	+	+

Условные обозначения: +устойчив; — неустойчив.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

При постановке окончательного диагноза на везикулярный стоматит следует иметь в виду особую трудность дифференциации этой инфекции от сходных с нею болезней, в особенности от ящура и везикулярной экзантемы свиней.

Для исключения этих инфекций в настоящее время обычно пользуются данными РСК и перекрестной реакции нейтрализации. Однако часто приходится прибегать к постановке биопробы, которую ставят на крупном рогатом скоте, лошадях и свиньях.

Для дифференциации везикулярного стоматита от ящура и везикулярной экзантемы свиней содержимое свежих, нелопнувших везикул вводят двум свиньям внутрикожно в пятачок, одной лошади — в язык, одной корове — интрадермолингвально и второй — внутримышечно. Если испытуемый материал содержит вирус везикулярного стоматита, он вызовет заболевание у зараженных внутрикожно коровы, лошади и свиней. При наличии в нем вируса везикулярной экзантемы свиней заболеют только свиньи; при наличии в исследуемом материале вируса ящура должны заболеть коровы и свиньи, а лошадь остается здоровой (табл. 2).

Для дифференциации везикулярного стоматита от везикулярной экзантемы свиней можно использовать цыплят, которые чувствительны к вирусу везикулярного стоматита при заражении в язык и не чувствительны к вирусу везикулярной экзантемы. Вирус везикулярной экзантемы свиней не размножается на куриных эмбрионах, тогда как возбудитель везикулярного стоматита легко удается выделять и культивировать на 7—8-дневных куриных

эмбрионах при заражении их в аллантоис. Поэтому куриные эмбрионы можно использовать в качестве дополнительной лабораторной модели для дифференциации возбудителей этих инфекций.

Оспу лошадей исключают биопробой на кроликах.

ТАБЛИЦА 2

Дифференциальная диагностика везикулярного стоматита, ящура и везикулярной экзантемы по результатам биопробы

Название болезни	Свиньи (внутрикожно, пятачок)	Крупный рогатый скот		Лошади (интрадермолингвально)
		интрадермолингвально	внутримышечно	
Везикулярная экзантема	+	—	—	±
Ящур	+	+	+	—
Везикулярный стоматит	+	+	—	+

Условные обозначения: + чувствительность; — нечувствительность.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Переболевшие животные приобретают стойкий иммунитет только против определенного типа вируса на срок от 6 до 12 месяцев. Диагноз на прошедшую инфекцию ставят при помощи РН и РСК, однако исчезновение комплементсвязывающих антител через 2—3 месяца после переболевания позволяет использовать эту реакцию только для диагностики относительно свежих случаев болезни.

В противоположность этому, вируснейтрализующие антитела сохраняются длительное время (до 4 лет; возможно, дольше), что делает использование реакции нейтрализации особенно полезным для ретроспективной диагностики, а также для выяснения общей эпизоотологической ситуации путем массовых серологических обследований скота.

В энзоотических районах нейтрализующие антитела можно обнаружить у лошадей — до 100%, у крупного рогатого скота — до 50%, у свиней — до 75% обследованных животных. В неэнзоотических районах в межэпизоотический период антитела у свиней не обнаруживают, однако у коров и лошадей той возрастной группы, которая перенесла болезнь во время последней эпизоотии, антитела могут встречаться. По данным Хэнсона и Брендли (1957), через 7 лет после эпизоотии антитела можно обнаружить у 50% животных.

Вопрос о корреляции уровней антител у реконвалесцентов с устойчивостью к повторному заболеванию изучен недостаточно, однако известно, что выздоровевшие животные с высоким уровнем нейтрализующих антител, но отрицательно реагирующие по РСК, чувствительны к повторному заражению гомологичным вирусом.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

Вопросы специфической профилактики не разработаны. Средств специфической профилактики нет.

БОЛЕЗНЬ АУЕСКИ
(PSEUDORABIES)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Болезнь Ауески (псевдобешенство, ложное бешенство) — остро протекающая энзоотическая болезнь домашних и некоторых диких животных, пушных зверей и грызунов, характеризующаяся симптомами поражения центральной нервной системы, которые выражаются в возбуждении и появлении парезов и параличей, предшествующих гибели. Одним из наиболее характерных симптомов, встречающихся, однако, не у всех видов животных, являются сильный зуд и обусловленные им расчесы кожи. Клинические проявления болезни у сельскохозяйственных животных разных видов имеют значительные отклонения.

У свиней болезнь часто протекает латентно, однако у поросят-отъемышей она сопровождается симптомами расстройства центральной нервной системы и нередко воспалением и отеком легких. В отличие от крупного рогатого скота и животных других видов у свиней болезнь Ауески не сопровождается зудом и расчесами.

ВИРУС

Возбудитель болезни Ауески сравнительно крупный ДНК-содержащий вирус, относящийся к группе вирусов герпеса. Размер вирионов около 200 ммк. Вирус проходит только через крупнопористые фильтры Беркефельда N, V и W, Шамберлана L_2 и L_3, а также фильтры Зейтца СФ.

Устойчивость. Вирус чувствителен к эфиру, быстро инактивируется желчью, однако стабилен в довольно широком диапазоне pH (pH 5,0—9,0); 3%-ный раствор фенола инактивирует вирус в течение 5—10 минут, 1—2%-ный раствор формальдегида — за 15—20 минут. Вирус устойчив к глицерину, хорошо переносит лиофилизацию. При 60° он инактивируется в течение 45—50 минут, но в лиофилизированном состоянии устойчив к действию сухого жара (102—104°) в течение 2 минут.

Хранение и консервирование вируссодержащих материалов. Вирус хорошо сохраняется в замороженном (минус 30°) и в лиофилизированном состоянии, а также при 4°. В 50%-ном забуференном растворе глицерина на холоде он остается жизнеспособным не менее 3 лет. Добавление к вирулентной мозговой эмульсии инактивированной нормальной телячьей сыворотки способствует сохранению активности вируса. В насыщенном растворе NaCl вирус хорошо сохраняет активность в течение 2—3 месяцев.

Локализация в организме. Возбудитель болезни Ауески обладает пантропным действием и содержится в различных отделах головного и спинного мозга, в легочной ткани, селезенке, почках, слюнных железах и других органах. У свиней вирус часто содержится в тканях носовой полости и может быть обнаружен в носовой слизи на 4—6-й день заболевания.

В пораженных участках мозга вирус распределяется неравномерно, вследствие чего часто обнаруживают «авирулентные» области в центральной нервной системе. Концентрация его в мозговой и легочной тканях может достигать 10^6—10^7 кроличьих LD_{50}/г. В крови вирус можно обнаружить лишь в начале заболевания, причем виремия кратковременна.

Антигенные свойства. В крови переболевших животных появляются вируснейтрализующие и комплементсвязывающие антитела. Штаммы вируса, выделенные во многих странах от животных разных видов, идентичны как в антигенном, так и в иммунологическом отношении. Установлено наличие группового антигена, общего для вируса болезни Ауески и вируса герпеса.

Спектр патогенности. В естественных условиях вирус болезни Ауески патогенен для всех домашних и диких млекопитающих. Особенно восприимчивы к нему грызуны.

В лабораторных условиях болезнь легко может быть вызвана как у естественно восприимчивых, так и у лабораторных животных (кролики, морские свинки, белые мыши) при различных методах заражения (табл. 1). Наилучшие результаты обычно получают при интрацеребральном введении вируссодержащего материала.

ТАБЛИЦА 1

Методы заражения животных

Животные	Метод введения материала				
	подкожно	внутримышечно	через рот	интраназально	интрацеребрально
Свиньи (поросята)	+	+	+	+	+
Крупный рогатый скот	+	+			
Собаки			+	+	+
Кошки			+	+	+
Лошади	—	—			
Кролики	+	+	—	—	+
Белые мыши	+	+			+
Морские свинки	+	+			+

В экспериментальных условиях удается также заражать птиц (цыплята, голуби, утки).

Из лабораторных животных к вирусу Ауески наиболее чувствительны кролики. Белые мыши и морские свинки менее чувствительны. В связи с этим кролик служит селективной моделью для выделения и изучения возбудителя болезни Ауески. В зависимости от способа заражения болезнь Ауески у кроликов протекает различно. У кроликов, погибших после экспериментального заражения, вирус можно регулярно выделять из тканей различных отделов головного мозга и паренхиматозных органов, в особенности из легких и печени. Титры вируса могут достигать 10^6—10^7 ID_{50}/г ткани.

Чувствительность белых мышей к вирусу Ауески зависит от способа заражения. Наиболее чувствительны мыши к интрацеребральному заражению, однако клиническая картина болезни в этом случае выражена менее четко, чем при внутримышечном заражении; к тому же при интрацеребральном введении материала мыши часто могут погибать от неспецифических причин. При внутримышечном заражении клиническая картина болезни у мышей бывает выражена хорошо, но сам метод значительно менее чувствителен, чем предыдущий.

Заражение морских свинок удается не всегда.

Культивирование в лабораторных условиях. Для культивирования вируса в лабораторных условиях используют взрослых кроликов. Материал вводят внутримышечно, подкожно или интрацеребрально.

Вирус хорошо размножается на 10—12-дневных куриных эмбрионах при инокуляции на хорионаллантоис или в желточный мешок, вызывая их гибель на четвертый день после заражения. Отдельные штаммы вируса требуют, однако, предварительной адаптации, которая оказывается особенно успешной при проведении 2—3 перемежающихся пассажей кролик—куриный эмбрион.

Вирус размножается и в первичных культурах фибробластов куриного эмбриона, клеток почечной ткани свиней, крольчат, крупного рогатого скота и

обезьян, клеток легочной ткани эмбриона свиней, а также в перевиваемых культурах клеток HeLa и L. Размножение вируса сопровождается появлением характерных цитопатических изменений; в культурах под плотным покрытием вирус вызывает образование бляшек, причем имеются сообщения, что менее вирулентные штаммы образуют более крупные бляшки.

В клетках инфицированных куриных эмбрионов или культур ткани могут быть обнаружены эозинофильные внутриядерные тельца-включения.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

До последнего времени с целью лабораторной диагностики проводили биопробу на кроликах. В настоящее время в результате увеличения количества случаев болезни требуется использовать более быстрые и дешевые методы лабораторной диагностики. Было показано, что культуры клеток так же чувствительны к вирусу Ауески, как и кролики (Мак-Ферран и Дау, 1962); к тому же они могут быть использованы для лабораторной диагностики атипичного течения болезни, при котором опыты по определению наличия вируса в мозгу свиней путем заражения кроликов дают отрицательные или нетипичные результаты (Сент-Ивани, 1960). Кроме того, для ранней лабораторной диагностики болезни Ауески начинают применять метод флуоресцирующих антител (Тейлинг и Витш, 1967) и реакцию нейтрализации в культуре клеток или на кроликах.

Таким образом, в настоящее время ранняя лабораторная диагностика болезни Ауески основана на комплексном использовании для выделения и идентификации вируса из патологических материалов различных методов исследования, основными из которых являются: выделение вируса путем биопробы на кроликах; выделение вируса в культуре клеток; идентификация вируса при помощи реакции нейтрализации, РСК и метода флуоресцирующих антител.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материалов. Для выделения возбудителя болезни Ауески используют головной мозг, кусочки легких, селезенки, печени и других паренхиматозных органов, полученных при вскрытии погибших животных. При жизни больных свиней вирус можно выделить из секретов носовых полостей, в которых он появляется на 4—6-й день болезни и сохраняется в течение 5—11 дней после выздоровления.

При сборе материалов для вирусологического исследования следует помнить о неравномерном распределении вируса в различных участках мозга. Поэтому, чтобы избежать ошибок при постановке диагноза, следует брать минимум по 2—3 фрагмента из различных участков мозга, расположенных на некотором расстоянии друг от друга. Обычно при вскрытии отбирают фрагменты мозжеч-

ка, продолговатого мозга, кусочки из разных мест больших полушарий головного мозга.

Все собранные материалы сразу же погружают в стерильный 40—50%-ный забуференный раствор глицерина (pH 7,2—7,4) или в раствор Хэнкса с антибиотиками и помещают в холодильник при 4° или в термос со льдом.

Секреты носовой полости собирают стерильными ватными тампонами, которые вводят в носовые ходы, а затем погружают в пробирки с раствором Хэнкса, содержащим антибиотики.

Доставленные в лабораторию материалы обрабатывают обычными методами: готовят 10%-ную суспензию, центрифугируют при 3000—5000 об/мин в течение 15—30 минут. Материалы, консервированные глицерином, предварительно отмывают от него.

Для большей вероятности выделения вируса и уменьшения количества исследуемых образцов кусочки из различных отделов мозга от одного животного объединяют в общую пробу, которую затем измельчают, обрабатывают и исследуют. Для лучшей сохраняемости вируса в суспензии к ней можно добавить 1—2% нормальной инактивированной сыворотки крови телят.

Все материалы, в особенности суспензии ткани легкого, проверяют на бактериальную загрязненность. До использования их лучше хранить в замороженном состоянии (минус 30°) или при 4°.

Заражение животных. В качестве лабораторной модели для выделения вируса Ауески из патологических материалов обычно используют взрослых кроликов, которым внутримышечно или подкожно вводят по 1 мл 10%-ной суспензии исследуемого материала. Инкубационный период в этом случае продолжается 36—48 часов. Иногда он может длиться до 4—6, а в некоторых случаях даже до 12 дней.

Различают энцефалитическую, менингеальную, паралитическую, зудневую и стертую формы болезни. Течение экспериментальной инфекции во многом зависит от способа заражения.

Энцефалитическая форма начинается беспокойством, переходящим в сильное возбуждение — животное бегает по клетке, боязливо оглядываясь; у него отмечают расширение зрачков, повисание ушей, скрежетание зубами, обильное истечение слюны изо рта. Возбуждение сменяется депрессией — больные кролики лежат на боку или на животе, задние ноги часто вытянуты; при попытках встать животные теряют равновесие и падают. Смерть наступает в период приступа возбуждения или угнетения; гибели часто предшествуют параличи конечностей.

Зудневая форма наиболее характерна для кроликов при внутримышечном или подкожном введении материала. В положительных случаях у животных после 2—3-дневного инкубационного периода появляется сильный зуд в месте инокуляции. Вначале отмечают общее беспокойство, животное часто вздрагивает, оглядываясь на место введения материала, затем начинает лизать и вырывать шерсть в этой области. Часто можно наблюдать, как кролик с ожесточением грызет кожу и подлежащие мышечные ткани на месте укола. Иногда зуд отмечают и на других участках тела, что приводит к особенно сильному беспокойству. Кролик падает на бок и может погибнуть внезапно, без развития параличей, или же они появляются незадолго до смерти.

Менингеальная форма характеризуется сильным возбуждением, скрежетом зубов и опистотонусом. Животное падает на бок и погибает при наличии кло-

нических судорог. Однако при вскрытии в менингеальных оболочках макроскопически иногда не обнаруживают никаких следов воспаления. Они могут быть выявлены лишь гистологически (следы лимфоцитарного менингита).

При стертых и молниеносных формах болезни Ауески у большинства кроликов не проявляется никаких симптомов болезни. Погибают они обычно ночью. Вечером, накануне гибели, животное кажется вполне нормальным, а утром обнаруживают его труп в характерном положении — на боку.

Для подтверждения диагноза проводят дополнительные пассажи на кроликах инокуляцией материала в переднюю камеру глаза (в этом случае болезнь проявляется в характерной зудневой форме) или выделение вируса в культуре фибробластов куриного эмбриона или клеток почки поросенка.

Материалом для выделения вируса от погибших кроликов служат ткани головного и спинного мозга, а также паренхиматозные органы (легкие, печень).

Выделение вируса в культуре клеток. Для выделения вируса обычно используют первично-трипсинизированные культуры фибробластов 10—11-дневного куриного эмбриона, клеток почечной ткани поросят 3—6-недельного возраста или эмбрионов свиней, крольчат 2—20-дневного возраста. Высокочувствительны к вирусу субкультуры первого пассажа клеток почки поросенка или крупного рогатого скота.

Культуры клеток получают общепринятыми методами. При приготовлении фибробластов куриного эмбриона трипсинизируют цельные эмбрионы, концентрацию клеток в суспензии доводят до 2×10^6 клеток в 1 мл, используя в качестве ростовой среды 0,5%-ный гидролизат лактальбумина на растворе Хэнкса с 2% сыворотки крови крупного рогатого скота. При такой концентрации клеток сплошной монослой формируется через 24—48 часов, после чего культура готова для заражения.

В качестве поддерживающей среды используют 0,5%-ный гидролизат лактальбумина на растворе Эрла (pH 7,4—7,6) с 2% нормальной сыворотки крови теленка или ягненка, или совсем без сыворотки.

На испытание каждого материала берут по 4—6 пробирок с культурой. Доза заражения — 0,2 мл. Адсорбция — 1 час при 37°. После адсорбции в каждую пробирку добавляют 0,8—1 мл поддерживающей среды и помещают их в термостат при 37°. При первичном выделении вируса из патологического материала лучше помещать пробирки во вращающийся барабан, что способствует сокращению сроков появления цитопатогенного действия.

Для выявления цитопатогенного действия пробирки на протяжении 5 дней ежедневно просматривают под микроскопом. При отсутствии цитопатических изменений на 5-й день культуры подвергают однократному замораживанию и оттаиванию, после чего вносят по 0,2 мл культуральной жидкости в несколько пробирок со свежей культурой. Каждый материал пассируют 3—5 раз. Для идентификации выделенного в культуре вируса заражают кроли-

ков, у которых при наличии в культуральной жидкости вируса Ауески развивается типичная картина болезни.

Характеристика цитопатических изменений, вызываемых вирусом. При первичном выделении вируса первые признаки цитопатогенного действия появляются на 4—5-й день после инокуляции. В последующих пассажах сроки появления цитопатогенного действия сокращаются до 15—20 часов, причем оно становится более выраженным. Характер цитопатических изменений в различных культурах может быть неодинаковым, что обусловлено различным действием вируса на клетки эпителиального и фибробластического типа.

В культуре клеток почки поросенка, эмбриона свиней или крольчонка цитопатическое действие вируса выражается в образовании синцития. Вначале в культуре появляются очаги округлых клеток, границы между которыми исчезают, а ядра перемещаются к центру и образуют конгломераты, окруженные общей оболочкой. Через несколько часов группы этих клеток принимают шарообразную форму, в протоплазме их появляется зернистость. Затем происходит обильное слущивание клеток с поверхности стекла.

В культуре фибробластов куриного эмбриона цитопатогенное действие вируса проявляется в округлении клеток, появлении зернистости и вакуолизации протоплазмы с последующим отслоением клеток от поверхности стекла.

Титры вируса в период максимального развития цитопатогенного действия обычно достигают $10^{6,5}$—$10^{7,5}$ $ТЦД_{50}$/мл.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Серологическая идентификация

Для идентификации вируса болезни Ауески используют в основном реакцию нейтрализации в культуре клеток или на кроликах, а также метод флуоресцирующих антител. Кроме того, для этой цели можно использовать РСК, однако из-за нестандартности антигена и непостоянства результатов самой реакции она не нашла широкого применения.

Реакция нейтрализации — удобный и надежный метод диагностики болезни Ауески. Чаще всего ее используют для идентификации возбудителя, однако ее можно применять и для обнаружения специфических вирусонейтрализующих антител в сыворотках крови переболевших животных (при ретроспективной диагностике).

В зависимости от имеющихся условий и адаптации штамма вируса реакция может быть поставлена на культурах клеток почки поросенка, крольчонка или фибробластов куриного эмбриона. Если невозможно работать с тканевыми культурами, реакцию можно поставить на кроликах (в этом случае из-за дороговизны кроликов ее обычно используют только для идентификации вируса).

Для идентификации вируса реакцию нейтрализации ставят с постоянным разведением сыворотки и разными разведениями вируса. С постоянной дозой вируса и разными разведениями сыворотки реакцию нейтрализации используют преимущественно для обнаружения антител при ретроспективной диагностике и для оценки поствакцинального иммунитета.

Компоненты реакции. *Антиген.* В качестве антигена для постановки реакции нейтрализации в культуре ткани используют вирус, хорошо адаптированный к той или иной культуре клеток, с предварительно определенной активностью ($10^{6,5}$—$10^{7,5}$ $ТЦД_{50}$/мл). Для сохранения активности вирус хранят замороженным (минус 30°). Если вирус выращивают на бессывороточной среде, то для лучшей сохраняемости к культуральной жидкости перед замораживанием можно добавить 2% нормальной сыворотки крови теленка. Перед постановкой реакции культуральный вирус размораживают, центрифугируют в течение 30 минут при 2500—3000 об/мин, после чего собирают надосадочную жидкость и в соответствии с титром вирусного материала разводят до содержания 100—1000 $ТЦД_{50}$/0,1 мл. Допускаются отклонения от 32 до 32000 ТЦД.

Для постановки реакции нейтрализации на кроликах обычно используют суспензию (1 : 50) головного мозга и селезенки кролика, погибшего после биопробы при наличии симптомов болезни, характерных для болезни Ауески.

Антисыворотка. Ее получают от 2—3 свиней, переболевших болезнью Ауески, через четыре недели после выздоровления. Гипериммунные сыворотки готовят путем иммунизации взрослых свиней, которым с двухнедельным интервалом подкожно вводят вирус в нарастающих дозах (50 и 100 мл) с последующим введением двух таких же доз внутривенно. Кровь для получения сыворотки берут через две недели после последней иммунизации. Полученная сыворотка в разведении 1 : 90 нейтрализует от 1000 до 3160 $ТЦД_{50}$ вируса.

Кроликов использовать для получения антисывороток нельзя, так как они очень чувствительны к вирусу Ауески.

Сыворотки крови от здоровых и переболевших животных сохраняют до использования в замороженном состоянии (минус 20—30°). Перед постановкой реакции их размораживают, инактивируют прогреванием в водяной бане при 56° в течение 30 минут, после чего готовят серийные двукратные разведения от 1 : 2 до 1 : 256 (при постановке реакции в культуре ткани с постоянной дозой вируса), используя в качестве разбавителя поддерживающую среду. При идентификации вируса используют гипериммунную сыворотку в разведении 1 : 5. При постановке реакции на кроликах используют неразведенную сыворотку от переболевших животных.

Постановка реакции. Реакцию нейтрализации в культуре клеток ставят по обычной методике. Титры вируснейтрализующих антител в сыворотках свиней обычно находятся в пределах от 1 : 32 до 1 : 256.

Методика постановки РН на кроликах заключается в том, что 0,1 мл суспензии вируса (суспензия мозга и селезенки кролика, погибшего после заражения вирусом, разведенная 1 : 50 поддерживающей средой или раствором Хэнкса) смешивают с 2 мл сыворотки крови, взятой от 2—3 переболевших свиней. Смесь тщательно встряхивают и выдерживают в термостате при 37° в течение 2 часов, после чего вводят подкожно двум кроликам. Параллельно ставят контроль, прибавляя такое же количество вирусной суспензии к 2 мл нормальной сыворотки крови свиней с последующим выдерживанием в термостате и инокуляцией двум кроликам. Кролики, которым введена смесь вируса с иммунной сывороткой, остаются здоровыми, а контрольные погибают через 60—72 часа после инокуляции при наличии характерных признаков болезни Ауески. Один миллилитр сыворотки переболевших свиней, полученной через четыре недели после выздоровления, может нейтрализовать 25 кроличьих LD_{50} вируса.

Реакция связывания комплемента не нашла широкого применения при диагностике болезни Ауески и идентификации возбудителя в связи со сложностью приготовления антигена и громоздкостью постановки. Положительные резуль-

таты РСК удается получить только при использовании специального метода изготовления антигена. Ниже описывается методика приготовления антигена для РСК.

Мозг кролика, погибшего после интрацеребрального заражения вирулентным штаммом вируса Ауески, гомогенизируют в физиологическом растворе и добавляют 2% нормальной инактивированной сыворотки крови морской свинки. Полученную суспензию выдерживают 12—18 часов при 4—6°, а затем центрифугируют 30 минут при 2500 об/мин. Надосадочную жидкость замораживают в смеси спирта с сухим льдом и выдерживают 15 минут, после чего размораживают в водяной бане при 37° (выдерживают тоже 15 минут). Процедуру замораживания-размораживания повторяют 7 раз. После последнего размораживания жидкость центрифугируют в течение одного часа при 8000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость используют в качестве антигена для РСК. Антиген консервируют раствором мертиолята 1 : 5000. При хранении в рефрижераторе его можно использовать в течение 3 месяцев.

В наибольших количествах комплементсвязывающий антиген содержится в головном мозге и мозжечке; в продолговатом и спинном мозге количество его незначительно.

Специфические комплементсвязывающие антитела появляются в крови свиней через три дня; после экспериментального заражения титр их не снижается в течение 30—40 дней после переболевания. Максимальную активность сыворотки в РСК наблюдают при исследовании образцов, собранных между 20—25-м днями после начала заболевания; между 30 и 50-м днями активность их значительно снижается. Титры комплементсвязывающих антител в сыворотках иммунных свиней составляют 1 : 10—1 : 20.

При использовании антигена, приготовленного по описанной выше методике, РСК с сыворотками от свиней с тяжелой инфлюэнцеподобной формой болезни в условиях естественной инфекции является достаточно чувствительной (76,6% положительных сывороток). Реакция достаточно специфична.

Реакция иммунофлуоресценции (прямой метод флуоресцирующих антител) используют для быстрой индикации и идентификации антигена вируса Ауески в клетках культур ткани, инфицированных материалом, содержащим вирус, а также в замороженных срезах ткани мозга кроликов, зараженных суспензией патологического материала, или поросят, заболевших в естественных условиях.

Приготовление меченых флуоресцирующих антител. Для выделения глобулиновой фракции используют сыворотку свиньи, гипериммунизированной вирусом Ауески (титр вируснейтрализующих антител в сыворотке при проверке против 100 $ТЦД_{50}$ вируса должен быть не ниже 1 : 126). Осаждение гаммаглобулина и его конъюгацию с изоцианатом флуоресцеина проводят по общепринятой методике. Непосредственно перед использованием конъюгат обрабатывают лиофилизированным порошком, приготовленным из почечной ткани свиней (Мейлинг и Бич, 1967).

Подготовка и окрашивание образцов. Блоки толщиной 2—3 мм вырезают из различных отделов головного мозга. Вскрывать трупы с целью взятия материалов для иммунофлуоресцентного исследования необходимо как можно быстрее после гибели животных, так как четкие результаты будут получены только при исследовании свежих образцов и замороженных в криостате или в смеси сухого льда со спиртом.

Препарат исследуют при помощи флуоресцентного микроскопа, используя конденсор темного поля и ртутную лампу высокого давления.

В положительных случаях в срезах из различных частей мозга обнаруживают специфическую флуоресценцию. В головном мозге поражаются главным образом нейроны коры. При малом увеличении можно видеть широкие полоски флуоресцирующих нейронов между белым веществом и молекулярным слоем, в которых заметны только отдельные флуоресцирующие клетки. В срезах мозжечка пораженные клетки распределены более беспорядочно. Часто они видны как флуоресцирующие фокусы в зернистом слое. Иногда в них оказываются вовлеченными единичные клетки Пуркинье, но особого афинитета вируса к этим клеткам обычно не наблюдают.

Распределение флуоресценции внутри клеток может варьировать в широких пределах. Иногда вирусный антиген обнаруживают как в цитоплазме, так и в ядре, но обычно свечение ядра выражено сильнее. Часто флуоресцирующие массы имеют вид светящейся пыли или мелких гранул. В отдельных случаях удается обнаружить внутриядерные включения типа А Каудри, однако форма их более неправильна, чем в препаратах, фиксированных и окрашенных обычными методами. Иногда светится только цитоплазма, причем степень свечения и характер распределения также варьируют. Часто обнаруживают скопление светящихся гранул вокруг ядер. В некоторых районах можно заметить мелкие светящиеся частицы вдоль аксонов.

Специфичность флуоресцентного окрашивания подтверждают серологически по подавлению свечения при обработке препаратов конъюгатом, который разводят в неконъюгированной антисыворотке к вирусу Ауески. Такая обработка приводит к значительному ослаблению свечения инфицированных нейронов.

В зависимости от комбинаций различных фильтров аутофлуоресценция тканей бывает голубой или зеленовато-коричневой. Инфицированные нейроны имеют ярко-зеленое свечение, которое легко отличить от неспецифической аутофлуоресценции тканей.

Результаты иммунофлуоресцентного исследования хорошо согласуются с данными биопробы на кроликах и результатами выделения вируса в культуре клеток.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

При дифференциальной диагностике следует исключить бешенство, чуму свиней, болезнь Тешена и другие вирусные полиоэнцефаломиелиты свиней, грипп, рожу, листериоз, паратифозную инфекцию, геморрагическую септицемию и отравление поваренной солью.

При дифференциации от бешенства проводят биопробу, микроскопическое исследование на выявление телец Негри и используют результаты иммунофлуоресцентного теста с соответствующими специфическими антисыворотками.

Для исключения чумы свиней ставят биопробу на кроликах. Болезнь Тешена и другие полиоэнцефаломиелиты свиней вирусной этиологии также исключают на основании отрицательных результатов биопробы на кроликах. Для исключения гриппа свиней

проводят биопробу на кроликах и исследуют выделенный вирус в РГА.

Рожу, листериоз и другие бактериальные инфекции исключают на основании данных бактериологических исследований, при проведении которых нужно помнить, что многие из них, в особенности паратифозная инфекция и геморрагическая септицемия, нередко могут быть секундарным осложнением болезни Ауески.

Отравление поваренной солью исключают по данным биопробы и результатам лабораторного исследования по определению содержания хлоридов.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагноз на прошедшую инфекцию ставят при помощи реакции нейтрализации в культуре ткани, определяя титры вируснейтрализующих антител к вирусу Ауески в сыворотках крови реконвалесцентов.

Для более точной диагностики лучше исследовать парные сыворотки, взятые с интервалом в 3—4 недели. Титры антител у переболевших животных могут колебаться в широких пределах (1 : 32—1 : 256). У поросят и подсвинков, зараженных вирусом Ауески, специфические вируснейтрализующие антитела появляются к 6—8-му дню после заражения, достигая максимума через 3—4 недели. Через 100 дней после заражения титры вируснейтрализующих антител начинают снижаться, а через 135 дней антител уже обычно не находят. У естественно больных и переболевших подсвинков вируснейтрализующие антитела удается установить примерно в те же сроки, хотя в сыворотках переболевших свиней их иногда удается обнаруживать в течение $4^1/_2$ лет. Антитела также находят и у свиней, перенесших бессимптомную инфекцию.

Вопросы динамики вируснейтрализующих антител у животных других видов изучены недостаточно.

Между напряженностью иммунитета и высотой титров вируснейтрализующих антител прямой корреляции не установлено.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

Для специфической профилактики болезни Ауески применяют гидроокисьалюминиевую формолвакцину, предложенную П. С. Соломкиным, и гидроокисьалюминиевую формолэмбриовакцину ГНКИ (П. М. Базылев и М. Г. Скурская). Живые вакцины из аттенуированного вируса находятся в стадии экспериментального изучения.

В крови вакцинированных животных обнаруживают вируснейтрализующие антитела, которые могут быть выявлены при исследовании сывороток от вакцинированных животных реакцией нейтрализации. В крови крупного рогатого скота через 2—5 недель после иммунизации титры антител могут колебаться от 1 : 4 до 1 : 64. Вопросы динамики появления и угасания антител у вакцинированных животных изучены недостаточно, и требуются дополнительные исследования.

ЧУМА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
(RINDERPEST)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Острая контагиозная болезнь, протекающая в виде септицемии и сопровождающаяся катаральным или геморрагическим воспалением и некротическими изменениями слизистых оболочек.

Инкубационный период в естественных условиях продолжается 3—5 дней, реже 9. Болезнь чаще протекает остро, реже подостро. Острое течение характеризуется высокой температурой (40,5—41,5°), появлением узелков на слизистой оболочке ротовой полости, слабостью, угнетением, анорексией, сухостью зеркальца. Шерсть взъерошивается; обильное слюнотечение; на слизистой оболочке губ заметны серовато-желтые узелки. В дальнейшем они увеличиваются в размере, легко снимаются, на их месте образуются эрозии. Поражается слизистая оболочка губ, щек, реже спинки языка, твердого нёба, глаз. Наблюдаются припухлость век, слезотечение, мелкие кровоизлияния на слизистой оболочке носа, кашель, поверхностное дыхание. Через 2—3 дня появляется профузный понос со слизью, а иногда с примесью крови и дифтеритическими пленками. Животное худеет, становится безучастным, на 8—10-й день болезни погибает.

Подостро чума протекает там, где она носит стационарный характер, или в зонах нерегулярной вакцинации. Симптомы болезни при этом выражены слабо. Болезнь длится 2—3 недели. Большинство животных выздоравливает.

Патологоанатомические изменения обнаруживаются главным образом на слизистых оболочках органов пищеварения и характеризуются воспалительно-некротическими поражениями слизистой оболочки ротовой полости, сычуга, желчного пузыря, боуденовой заслонки и прямой кишки. На слизистой оболочке ротовой полости видны серовато-желтые наложения, после снятия которых обнаруживаются эрозии. Наиболее характерны изменения в сычуге: слизистая оболочка, особенно ее пилорическая часть, усеяна полосчатыми кровоизлияниями, содержимое с примесью крови и зловонным запахом. Желчный пузырь увеличен, желчь темного цвета с ихорозным запахом, на слизистой — точечные кровоизлияния. Стенки тонких кишок отечны и инфильтрированы. Почти в 100% случаев поражаются солитарные фолликулы и пейеровы бляшки с характерными некротическими поражениями терминальных центров. На слизистой оболочке прямой кишки полосчатые кровоизлияния.

ВИРУС

Вирус чумы крупного рогатого скота относится к классу Ivanovskya, порядку Pneumotropialles, семейству Polynosaceae, роду Polynosa (В. М. Жданов, С. Я. Гайдамович, 1966). Это РНК-содержащий вирус, сходен с вирусом кори, чумы собак, болезни Ньюкасля и гриппа. Средний диаметр вирионов 120—300 ммк. Вирус проходит через крупнопористые фильтры Шамберлана L_1 и L_2, Беркенфельда V и Зейтца ЕК. Обладает гемагглютинирующими свойствами.

Устойчивость к физическим и химическим факторам. Вирус быстро теряет активность при высушивании в полевых условиях, легко разрушается под влиянием химических веществ, чувствителен к эфиру, устойчив при 4° в зоне pH 7,2—8,8, но почти мгновенно разрушается при pH 3,0 или 11,0;

нагревание до 60° инактивирует его за несколько минут. Вирус быстро погибает в гниющем материале, поэтому летом в трупах через 20—30 часов его уже не находят; в навозе и моче он сохраняется не более 30 часов. Поваренная соль консервирует вирус; в соленом мясе он может сохраняться более месяца.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Лимфатические узлы и селезенку можно хранить при минус 20° в течение 60 дней, при минус 40° — в течение 6 месяцев, при 2—4 — не более 7 дней. В кусочках размером 1—2 см, помещенных в 10%-ный раствор хлористого натрия, вирус сохраняется при 2° в течение 15—30 дней. Вируссодержащая цитратная кровь в условиях комнатной температуры сохраняет активность 4—6 дней, при 5° — одну неделю, при 0° — 3—4 недели. В лиофильно высушенном материале, находящемся в ампулах под вакуумом при минус 20°, вирус выживает более 5 лет, а при 2—4 — не менее одного года. При лиофилизации в качестве стабилизатора в суспензию добавляют 2% глюкозы и 5% пептона.

Локализация в организме. Вирус обнаруживается в крови в период гипертермии и исчезает с развитием поражений на слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта. Находится он в основном в лейкоцитах и эритроцитах, но не всех. Количество пораженных и нормальных лейкоцитов имеет соотношение 1 : 300. Поэтому для заражения животного необходимо ввести не менее 400—800 лейкоцитов или 600 000 эритроцитов.

В других органах и тканях вирус накапливается также неодинаково; в более высоких титрах его можно обнаружить в лимфатических узлах — ($10^{-5,5}$), селезенке (10^{-5}—10^{-6}), зобной железе ($10^{-6,5}$), слизистой оболочке сычуга ($10^{-5,5}$), легких (10^{-4}), в почках (10^{-3}—10^{-4}). В небольших количествах он есть и в мозговой ткани, поперечнополосатых мышцах и спинномозговой жидкости.

Антигенная вариабельность. Считается, что вирус чумы крупного рогатого скота антигенно однороден. Все штаммы обладают единым типоспецифическим антигеном; некоторые штаммы по антигенной активности отличаются друг от друга.

Антигенная структура. Вирионы в своем составе имеют преципитирующий и комплементфиксирующий антигены. Причем в вируссодержащем материале эти антигены не связаны с вирионами. Вирус обладает очень малой комплементсвязывающей активностью. Она не превышает 10—15% всей антигенной активности препарата. В реакции диффузионной преципитации в агаровом геле вирус не реагирует. Растворимый S-антиген, участвующий в РСК и РДП, идентичен и состоит из термолабильного и термостабильного компонентов. Термолабильный компонент легко разрушается при различных обработках инфекционного материала: при температуре 56° он разрушается за 30 минут, при 4° — за неделю, при —20° — за месяц. В наиболее высокой концентрации комплементсвязывающий и преципитирующий антигены обнаруживаются в селезенке и лимфатических узлах больных животных. Репродукция инфекционных частиц вируса и накопление антигенов в организме больного животного и зараженной культуре ткани не идут параллельно: инфекционный титр вируса нарастает быстрее, чем титр антигена; первый достигает максимума на 5-й, а второй — на 6—7-й день после заражения, при этом инфекционный титр всегда на 1—2 lg выше, чем титр антигена в РСК.

Один из преципитирующих компонентов вируса реагирует в реакции диффузионной преципитации в геле с противокоревой сывороткой. Провост и Боредон (1968) полагают, что гемагглютинины вирусов чумы рогатого скота и кори, являющиеся компонентами вирусной оболочки, антигенно различны, а иммунологическое родство этих вирусов обусловлено наличием общего антигена в их нуклеокапсиде.

Гемагглютинирующие свойства. Вирус чумы крупного рогатого скота содержит гемагглютинин. Последний получают экстрагированием вируссодержащей культуры клеток эмбриона крупного рогатого скота. Экстракт концентрируют в 20 раз диализом. Концентрированный вирус с титром инфекционности не ниже 10^6 способен агглютинировать эритроциты обезьян (Erythro-

cebus patas) и в меньшей степени эритроциты кроликов, морских свинок, мышей и крыс. В инфицированной культуре клеток феномена гемадсорбции не наблюдается. Обработка экстрактов инфицированных клеток по Норби твином-80-эфиром или содовым дезоксихолатом повышает гемагглютинирующую активность вируса, но полностью инактивирует инфекционность. Установлены штаммовые различия в гемагглютинирующей активности вируса. Последняя подавляется специфическими иммунными сыворотками, причем титры антигемагглютининов и вируснейтрализующих антител коррелируют.

Вирус чумы крупного рогатого скота обладает гемагглютинирующей и гемолитической активностью (Провост и Барредон, 1968).

Спектр патогенности. В естественных условиях к вирусу чумы наиболее восприимчивы крупный рогатый скот, зебу и буйволы, иногда заболевают овцы и козы. Яки, верблюды, лани, антилопы, газели, жирафы переболевают легко. Сиамские свиньи могут не только заразиться от больного скота, но и сами служат источником инфекции. Из лабораторных животных к экспериментальной инфекции восприимчивы кролики. На введение вирулентного вируса они реагируют повышением температуры, без видимого клинического переболевания, однако у них можно обнаружить комплементсвязывающий антиген.

Кроме того, к вирусу чумы чувствительны первичные культуры клеток почки крупного рогатого скота, овец, коз, свиней, хомяков, собак, а также многие перевиваемые клеточные линии, полученные из первичных культур тканей человека и животных.

Культивирование вируса. Вирус чумы можно культивировать в организме естественно восприимчивых животных. Для этого заражают здоровых молодых телят в возрасте от 6 до 12 месяцев. При развитии типичной клинической картины в период максимального подъема температуры (6—7-й день после заражения) животное убивают и в качестве вируссодержащего материала используют лимфатические узлы, селезенку, легкие, кровь.

Вирус чумы развивается без предварительной адаптации в монослое растущих клеток почки телят. Цитопатогенное действие вируса в этой культуре проявляется на 4—8-е сутки и характеризуется двумя видами поражения клеток: 1) округление и образование звездчатых рефрактильных клеток; 2) образование гигантских многоядерных клеток симпластов. Округление и образование звездчатых клеток начинается на 4—5-е сутки, а образование симпластов — на 5—6-е сутки. На 8—9-е сутки изменения второго типа достигают максимума.

Цитоплазматические включения появляются на 2—3-й день после заражения в форме ацидофильных зерен в протоплазме клеток. На 4—5-е сутки цитоплазматические включения выделяются из цитоплазмы, и на их месте образуются вакуоли. Поражение ядер клеток начинается на 3—4-е сутки и характеризуется дезинтеграцией хроматина и внутриядерного вещества (Н. И. Митин, 1966).

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ранняя диагностика чумы крупного рогатого скота основана на выделении вируса, идентификации его или специфического антигена при помощи серологических реакций и обнаружения специфических антител у переболевших или вакцинированных животных.

Для лабораторной диагностики чумы крупного рогатого скота диагностические лаборатории должны иметь: вакцинный штамм ЛТ (стандартный) вируса чумы крупного рогатого скота; вакцинный лапинизированный штамм «Накамура-III»; диагностические сыворотки чумы крупного рогатого скота (для РСК, РДП и РН); диагностические антигены (для РСК и РДП); иммунный и неиммунный к чуме крупный рогатый скот и здоровых кроликов.

В культуре клеток выделение вируса возможно на первичной культуре ткани почки телят и эмбриона крупного рогатого скота. Однако только на культуре лейкоцитов крупного рогатого скота можно успешно выделять любой штамм вируса чумы уже в первом пассаже.

Взятие и подготовка материала. Материл для выделения вируса берут от больных (кровь, пунктат лимфатических узлов) или убитых и павших животных (предлопаточные, мезентериальные лимфатические узлы, селезенка). В крови вирус появляется за 12 часов до подъема температуры, поэтому выделение его из крови в ранний период более целесообразно. Кровь берут общепринятым методом. Гепаринизированную кровь в стерильных условиях разливают по пробиркам и центрифугируют при 2500 об/мин в течение 15—20 минут. Образовавшийся слой лейкоцитов между эритроцитами и плазмой в форме суспензии или пленки переносят пастеровской пипеткой в стерильный флакон. Пленку лейкоцитов отмывают от эритроцитов питательной средой и измельчают. Суспензию лейкоцитов в питательной среде используют для заражения культуры ткани.

Заражать культуру ткани можно и цельной кровью. Для этого кровь гемолизируют дистиллированной водой или замораживанием при минус 20° и оттаиванием при 37° и затем наносят на культуру ткани.

Вирус от больных животных можно выделить прижизненно из пунктата предлопаточных лимфатических узлов в инкубационный период за сутки до начала лихорадки, а затем на всем протяжении болезни. Пунктат получают следующим образом: лимфатический узел фиксируют между пальцами левой руки и шприцем с иглой Боброва делают укол с вентральной стороны. Убедившись в том, что игла находится в ткани лимфатического узла, делают несколько круговых вращательных движений и отсасывают в шприц лимфу с разрыхленной лимфатической тканью. Необходимо взять не менее 0,4 мл пунктата. Далее объем последней доводят до 5 мл стерильным физиологическим раствором и гомогенизируют в ступке со стерильным песком. Гомогенат центрифугируют 30 минут при 5000 об/мин. Надосадочную жидкость используют для заражения культуры ткани. Лимфатические узлы и селезенку от убитых или павших животных в стерильных условиях декапсулируют, готовят 10%-ную суспензию на фосфатном буфере pH 7,0 и хранят до заражения при минус 20°.

Выделение и идентификация вируса в культуре ткани по цитопатогенному действию. Культуру ткани почки телят 5—6-дневного возраста готовят в 100-миллилитровых флаконах или пробирках. В каждый флакон наливают по 1 мл суспензии лейкоцитов, полученной от исследуемого животного, и равномерно распределяют по всему клеточному монослою. В пробирки вносят по 0,2 мл сус-

пензии лейкоцитов или испытуемых органов с антибиотиками (пенициллин, стрептомицин, нистатин и полимиксин из расчета по 100—200 ЕД в 1 мл суспензии). Каждым материалом заражают культуру ткани в 2—4 флаконах или 8—10 пробирках. После 2-часового контакта испытуемого материала с культурой клеток в термостате инокулят сливают, культуру дважды промывают стерильным раствором Хенкса и в каждую пробирку вносят по 1—1,5 мл питательной среды (0,5%-ный гидролизат лактальбумина на растворе Хенкса или растворе Эрла с 2,5% бычьей инактивированной сыворотки, pH среды 7,4—7,6). Зараженные культуры на наличие цитопатического эффекта просматривают ежедневно, начиная с 3-го дня после заражения. Обнаружение специфических поражений клеток монослоя (округление, образование звездчатых клеток с рефрактильными отростками, образование многоядерных клеток симпластов, сморщивание, распад и отделение их от поверхности стекла) указывает на присутствие в испытуемом материале вируса. Если через 9—18 дней при просмотре под микроскопом в подопытных и контрольных пробирках (флаконах) нет дегенерации клеток, делают второй («слепой») пассаж аналогичным материалом. Пробирки с зараженной культурой оставляют в термостате до появления четко выраженных цитопатических изменений. Среду меняют через каждые три дня. Из пробирок, где заметно цитопатогенное действие, культуральную жидкость объединяют и хранят до момента постановки реакции нейтрализации с целью идентификации выделенного возбудителя. На выделение вируса в культуре ткани требуется в среднем 20—25 дней.

Реакция нейтрализации. Применяют качественную и количественную реакции нейтрализации. Для установления специфичности вызываемых вирусом поражений клеток проводят качественную реакцию нейтрализации, а для определения количества антител в сыворотке иммунных животных — количественную *.

Качественную реакцию нейтрализации проводят на растущей ткани почки теленка. Каждой пробой заражают культуру ткани в 20 пробирках так же, как при выделении вируса. После контакта вируса с тканью в течение 2 часов в 10 пробирок заливают среду, содержащую 5% специфической иммунной сыворотки, а в 10 других вносят среду, содержащую 5% нормальной сыворотки (контроль). Наблюдение ведут в течение 12 дней. Среду меняют каждые 3—4 дня. При отсутствии цитопатического эффекта в пробирках с иммунной сывороткой реакцию считают положительной, в пробирках же с нормальной сывороткой должно быть специфическое

* Стандартные вируснейтрализующие сыворотки и соответствующие к ним контроли (нормальные сыворотки) получают на крупном рогатом скоте в возрасте 12—18 месяцев взятием сыворотки (контрольной) от них до иммунизации и через 21 день после подкожной прививки им вакцинного штамма ЛТ в количестве 100 иммунизирующих доз (позитивная сыворотка). Такая сыворотка обычно в реакции нейтрализации реагирует положительно в разведении 1 : 40—1 : 80. Полученную сыворотку сохраняют при минус 20° и используют по мере надобности в РСК и РН с испытуемым антигеном в течение 4—6 месяцев.

поражение клеток. В контроле цитопатогенное действие также отсутствует.

Качественную реакцию нейтрализации можно ставить и в другой модификации. Испытуемый материал соединяют с цельной иммунной и неиммунной контрольной сывороткой, смесь выдерживают 18 часов при 4° и ею заражают выросшую монослойную культуру ткани. Это ориентировочная (качественная) реакция нейтрализации дает первое представление о том, имеет ли врач дело с вирусом чумы крупного рогатого скота. Для ускорения получения результатов идентификации вируса реакцию ставят одновременно с заражением культуры на выделение вируса.

Количественную реакцию нейтрализации можно проводить в двух вариантах: 1) с постоянной дозой вируса (200—500 $ТЦД_{50}$) и двукратно возрастающими разведениями сыворотки; 2) с постоянной дозой сыворотки (разведение 1:5—1:10) и десятикратными разведениями вируса от 10^{-1} до 10^{-6}. Количественную реакцию ставят с целью определения титра постинфекционных или поствакцинальных антител. В первом случае титр антител выражают бо́льшим разведением сыворотки, где отмечена нейтрализация; во втором случае активность сыворотки выражается индексом нейтрализации.

Реакция связывания комплемента применяется для прижизненной и посмертной диагностики чумы крупного рогатого скота, для выявления антигена и антител. Эту реакцию проводят при двух температурных режимах: 4—6° в течение 16—18 часов (фаза связывания комплемента) и 37—38° 45 минут (для выявления специфических антител или антигена) в общем объеме 0,5 мл.

Компоненты реакции: *гемолизин; комплемент с активностью не ниже* 1:40; *2,5%-ная взвесь эритроцитов барана на физиологическом растворе; сыворотки;* специфическая, испытуемая и нормальная *; антигены: специфический и нормальный, приготовленный из лимфатических узлов крупного рогатого скота.

Диагностические сыворотки и антигены для РСК при чуме крупного рогатого скота применяют для выявления специфического антигена у больных чумой или павших от этой инфекции животных и выделения антител у переболевших чумой или вакцинированных против нее животных.

Диагностическая сыворотка в РСК реагирует положительно в разведении 1:10—1:20. Консервирование сыворотки введением 0,3% фенола способствует сохранению ее свойств в течение года при температуре 2—4°.

Диагностические антигены для РСК получают из зараженной вакцинным штаммом ЛТ вируса чумы крупного рогатого скота клеточной культуры БП.

При использовании РСК с целью идентификации вируса в культуре ткани в качестве специфического и контрольного антигенов используют культуральную жидкость с зараженной и незараженной культуры ткани. Культуральную жидкость берут на 5—6-й день после заражения и выраженного цитопатогенного действия вируса и используют в реакции без дополнительной обработки. Для установления специфичности реакции берут иммунную и нормальную сы-

* В связи с тем, что испытуемые антигены и сыворотки проявляют различную степень антикомплементарности, при постановке главного опыта используют 9 различных доз комплемента, что исключает необходимость предварительного его титрования. Все сыворотки в реакции используют без предварительной инактивации.

воротки. Нативные антигены и сыворотки до использования в опыте хранят в замороженном состоянии.

Непрогретые парные сыворотки (специфическая и нормальная) уравнивают разведением до тех пор, пока они не будут давать одинаковую задержку гемолиза с нормальным антигеном. В присутствии специфического антигена позитивная сыворотка в найденном разведении должна проявлять специфичность, т. е. сыворотки для РСК в найденном разведении должны обладать либо одинаковой антикомплементарностью в присутствии отрицательного антигена, либо не обладать ею. (См. Руководство по ветеринарной вирусологии, 1966 г. стр. 187—198.)

Реакция диффузионной преципитации, так же как и РСК, используется для прижизненной и посмертной диагностики чумы крупного рогатого скота — для выявления специфических антител. Последние регулярно обнаруживают в лимфатических узлах больных животных, начиная с первого дня температурной реакции. На третий день болезни их обнаруживают у 50% животных. Реакцию диффузионной преципитации ставят по методу Оухтерлони.

Для постановки РДП необходимо иметь 1%-ную агаровую среду; стандартные (специфическая и нормальная) сыворотки; антигены: специфический, стандартный и испытуемый *.

Специфическую сыворотку для реакции диффузионной преципитации готовят на кроликах весом 2—2,5 кг, используя вакцинный штамм «Накамура-III».

Подготовку агара (промывание, сушка и т. п.) проводят общепринятым методом. Из отмытого агара готовят 1%-ный гель на дистиллированной воде с добавлением 8 г хлористого натрия и 10 мг риванола на 1 л среды. Расплавленный агар фильтруют через ватно-марлевый фильтр и доводят pH до 7,2—7,6. Затем в затвердевшем агаре (в чашках Петри слоем 0,5—0,7 см) по трафарету делают 36 лунок диаметром 0,7 см (6 рядов по 6 лунок) на расстоянии 0,3—0,4 см друг от друга. На дно каждой лунки наносят каплю того же расплавленного агара. Полученные таким образом агаровые пластинки через полчаса пригодны для постановки РДП.

РДП можно ставить и на предметных стеклах, для чего на обезжиренное предметное стекло наносят каплю 1%-ного расплавленного агара и тотчас делают равномерный тонкий мазок, затем пастеровской пипеткой наливают тот же агар слоем в 2—3 мм и такие стекла оставляют в комнате до полного затвердевания агара. После этого делают два ряда по шесть лунок диаметром 0,7 см на расстоянии 0,3—0,4 см друг от друга.

---

* Диагностические сыворотки для РДП получают от гипериммунизированного вакцинным штаммом ЛТ крупного рогатого скота. Ее можно приготовить и на кроликах.

Диагностические антигены для РДП готовят из лимфатических узлов крупного рогатого скота, зараженного эпизоотическим вирусом чумы. Антиген инактивируют формальдегидом.

Испытуемый антиген готовят из лимфатических узлов животных, подозреваемых в заболевании.

Титрование стандартных сывороток. Стандартную преципитирующую сыворотку титруют в РДП со специфическим и нормальным антигенами. В качестве контроля берут стандартную нормальную сыворотку в тех же разведениях, что и специфическую. Все сыворотки для РДП берут цельными и в разведениях: 1:2, 1:3, 1:4, и т. д. до 1:16 по 0,1 мл и испытывают с теми же объемами специфического антигена в рабочем титре. Нормальный антиген берут для контроля в том же разведении, что и специфический. Для этого в первый вертикальный ряд лунок трех чашек Петри вносят нормальный антиген; во второй — титруемую сыворотку в соответствующих разведениях; в третий — специфический антиген; в четвертый — нормальную сыворотку в тех же разведениях, что и специфическую, и в пятый — нормальный антиген. Затем чашки Петри закрывают крышками и оставляют при комнатной температуре на 18—20 часов. По истечении этого срока учитывают реакцию. Титром специфической сыворотки считают наименьшее ее количество, которое со специфическим антигеном в рабочем титре через 24 часа образует четкие линии преципитации при отсутствии таковых со всеми другими компонентами. Рабочей дозой специфической сыворотки считается удвоенный титр*.

Титрование стандартных антигенов. Стандартный специфический антиген предварительно проверяют в лаборатории в разведениях: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5 и т. д. до 1:16 со специфической сывороткой в рабочем титре. Для этого в третий вертикальный ряд трех чашек Петри вносят специфическую сыворотку в рабочем титре по 0,1 мл в каждую лунку, а в первый и пятый вертикальные ряды — нормальную сыворотку, в том же количестве и разведении, что и специфическую. Затем во второй ряд вносят специфический, а в четвертый ряд — нормальный антигены в указанных выше разведениях по 0,1 мл. Чашки Петри закрывают крышками и оставляют при комнатной температуре на 18—24 часа, а затем учитывают реакцию.

Титром антигена считают наименьшее его количество, которое со специфической сывороткой через 18—24 часа дает четкие линии преципитации, а со всеми другими компонентами такие линии отсутствуют. Рабочей дозой антигена считается его удвоенный титр**.

Приготовление испытуемых антигенов. Их готовят из лимфатических узлов крупного рогатого скота, подозреваемого в заболевании чумой. При посмертной диагностике материал считается пригодным для приготовления антигенов, если он взят в течение первых двух дней с момента убоя или гибели животных. Из лимфатических узлов готовят 20%-ную суспензию с физиологическим раствором, которую затем центрифугируют 10 минут при 2500 об/мин и надосадочную жидкость используют в качестве испытуемого антигена.

В случаях прижизненной диагностики чумы крупного рогатого скота используют пунктат предлопаточных лимфатических узлов, взятый асептически на второй день подъема температуры. Пунктат в объеме 0,2 мл разбавляют физиологическим раствором, взятым в равном количестве, и растирают в ступке с песком или стеклом. Полученную суспензию центрифугируют 10 минут при 2,5 тыс. об/мин и надосадочную жидкость используют в качестве испытуемого антигена.

РДП ставят одновременно с двумя сыворотками (специфической и нормальной).

Результаты реакции начинают учитывать с контролей, в которых обязательно должны быть линии преципитации между стандартной специфической сывороткой и стандартным специфическим антигеном и отсутствовать линии преципитации между нормальной сывороткой и специфическим антигеном, нормальным антигеном и специфической сывороткой.

Реакцию считают положительной, если между лунками со специфическим и испытуемым компонентами через 18—24 часа имеются одна или две линии

---

* В опытах титрования сывороток шестой вертикальный ряд лунок во всех трех чашках Петри не используют.

** В опытах титрования стандартных антигенов шестой вертикальный ряд лунок всех трех чашек Петри не используют.

преципитации. Линии должны быть тонкими и иметь четкие границы. При отсутствии линий преципитации между указанными компонентами реакцию считают отрицательной.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА ЧУМЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПРОБЕ НА ТЕЛЯТАХ

Идентифицировать вирус чумы можно биопробой на иммунном и неиммунном скоте. Двух животных вакцинируют сухой вирусвакциной из штамма ЛТ (согласно утвержденному наставлению по применению данного препарата). Через 12 дней вакцинированных и двух невакцинированных животных заражают испытуемым материалом (суспензия селезенки, лимфатических узлов и крови). При наличии у невакцинированных животных специфической температурной реакции, характерных клинических признаков болезни и отсутствии таковых у иммунных животных биопроба считается положительной. У заболевших или павших животных обнаруживают специфический антиген в РСК и РДП.

МЕТОД ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ (ПО КУНСУ)

В качестве исследуемого материала используют мазки-отпечатки и гистологические срезы (селезенка, лимфатические узлы, печень, слизистые оболочки ротовой полости и кишечника) из органов и тканей больных животных или инфицированные этими материалами культуры клеток. Методом иммунофлуоресценции возможно улавливать специфические изменения в клетках животного или культуры ткани в более ранние сроки, чем другими методами.

Для обнаружения вируса в культурах клеток используют клетки почки телят, выращенные на стеклышках; клетки инфицируют испытуемыми материалами, инкубируют при 37° в течение 12—24—48 часов. В указанные сроки стеклышки с инфицированной культурой клеток извлекают, просушивают и помещают во флаконы с фиксатором — ледяная уксусная кислота и абсолютный спирт в соотношении 19 : 1 (О. К. Кузнецов, 1968; З. М. Лукьянова, 1966). Фиксацию проводят в течение 30 минут при комнатной температуре. Затем стеклышки вынимают из фиксатора, высушивают и на фиксированные препараты наносят несколько капель меченой сыворотки и оставляют на один час при 37° во влажной камере. Подобным способом обрабатывают мазки-отпечатки из органов и тканей больных животных.

При наличии в испытуемых материалах вируса чумы крупного рогатого скота в препаратах наблюдается специфическое свечение (гранулярное или диффузное) в перинуклеарной зоне и цитоплазме пораженных клеток. В контрольных препаратах свечения нет.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ретроспективную диагностику чумы крупного рогатого скота проводят в постоянных очагах этой инфекции или при атипичном течении ее на вакцинированном поголовье животных, имевших слабый поствакцинальный иммунитет. Ретроспективный диагноз можно поставить при помощи РСК или РН. Четырехкратное увеличение титра комплементсвязывающих и нейтрализующих антител в обоих случаях свидетельствует о наличии прошедшей инфекции среди обследуемого поголовья. Для этого исследуют парные сыворотки не менее чем от 10 животных. Первый раз кровь берут в начале болезни и второй — через две недели. На 3—4-й день после снижения температуры у реконвалесцентов

обнаруживаются комплементсвязывающие антитела в титре от 1 : 10 до 1 : 40. На 21—30-й день они достигают максимума и удерживаются в течение трех месяцев на уровне 1 : 80—1 : 160. Через восемь месяцев титр их составляет 1 : 20—1 : 40. Другие реакции (метод флуоресцирующих антител и РДП) для целей ретроспективной диагностики неприменимы.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

Надежными методами являются РН и РСК. В тех случаях, когда титр вируснейтрализующих и комплементсодержащих антител равен 1 : 10 и выше, то животные, как правило, устойчивы к экспериментальной инфекции вирусом чумы в дозе 10^3 LD_{50}. Однако следует иметь в виду, что отсутствие комплементсвязывающих антител не свидетельствует об отсутствии специфического иммунитета, так как эти антитела у вакцинированных и переболевших животных исчезают раньше, чем специфическая резистентность и вируснейтрализующие антитела. Нет также прямой корреляции между специфической устойчивостью вакцинированных животных и титром вируснейтрализующих антител как в первые дни (3—5-й) после вакцинации (когда резистентность животных обусловлена феноменом интерференции), так и в отдаленный период после вакцинации, когда резистентность животного при отсутствии комплементсодержащих и вируснейтрализирующих антител, видимо, обусловлена механизмами клеточного иммунитета.

У животных, привитых инактивированной гидроокисьалюминиевой формолвакциной, комплементсвязывающие и вируснейтрализующие антитела появляются на 7—14-й день (максимальный титр КС — 1 : 40, а в ВН — 1 : 80) и сохраняются до 60—80 дней. В ответ на прививку живой вирусвакциной из штамма ЛТ, КС и ВН-антитела обнаруживаются на протяжении года. Максимальный титр их через месяц достигает 1 : 80 (для КС-антител) и 1 : 160 — 1 : 640 (для ВН-антител). Через год после прививки титр антител соответственно снижается до 1 : 10—1 : 20 (КС) и 1 : 40—1 : 80 (ВН). В ряде случаев вируснейтрализующие антитела обнаруживаются через 18 месяцев в титре 1 : 160—1 : 320 по отношению 200 $ТЦД_{50}$.

Данных в отношении уровня антител у овец и коз на прививку живой вакциной ЛТ нет.

ИНФЕКЦИОННЫЙ РИНОТРАХЕИТ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
(INFECTIONS BOVINE RHINOTRACHEITIS)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота, инфекционный некротический ринотрахеит, некротический ринит, красный нос, контагиозная бронхопневмония, эмфизематозная бронхопневмония, инфекционный катар дыхательных путей крупного рогатого скота, — остро протекающая контагиозная вирусная болезнь, характеризующаяся в основном поражением респираторного тракта и генитальных путей. Вирус инфекционного ринотрахеита может вызывать проявление разных клинических форм болезни, в зависимости от места локализации. В естественных условиях заболевает крупный рогатый скот всех пород разного возраста.

Это заболевание чаще всего регистрируется в местах концентрации скота среди откормочных групп и молочных гуртов. Поражение животных в этих случаях достигает 100%.

Впервые заболевание зарегистрировано в США (штат Колорадо) в 1950 г. В 1956 г. на культуре ткани почки эмбриона крупного рогатого скота Мак Керчером, Мадином и Иорком был выделен вирус. После этого болезнь была диагностирована в Новой Зеландии, Канаде, Южной Африке, Центральной Африке, Англии, Австралии, Румынии, Нидерландах, Италии, Венгрии, Чехословакии и др.

Инфекционным ринотрахеитом чаще заболевают молодые животные при концентрации сборного поголовья. Болезнь высококонтагиозна, особенно при большой скученности животных. Она может протекать в форме ринотрахеита, вульвовагинита, кератоконъюнктивита, менингоэнцефалита. Наиболее тяжелая форма — респираторная; она характеризуется появлением частого диффузного кашля, двусторонним, весьма обильным истечением из носовых полостей серозного или слизисто-гнойного экссудата, а также может сопровождаться катаральным конъюнктивитом. Слизистая оболочка носовой полости при этом всегда гиперемирована и легко кровоточит при малейшем механическом воздействии; возможно образование серозно-фибринозных пленок и участков некроза.

У молодняка часто наблюдают угнетенное состояние, исчезновение аппетита, повышенную температуру (40—41°), ускоренное и неравномерное дыхание. При обследовании больных животных обнаруживают гиперемию слизистой оболочки носовой полости и конъюнктивы, шумы, характерные для ларинготрахеального стеноза.

При поражении генитальных путей заболевание проявляется сильными воспалительными процессами половых органов и абортами, сопровождающимися метритами и задержкой последа. При экспериментальном заражении стельных коров аборты происходят между 18 и 64-м днями после заражения (Гаспарини, 1966).

У больных быков на половом члене и крайней плоти появляются пустулы, поверхностные изъязвления, кровоизлияния, скопление гноя, а также отечность и болезненность, выявляемая при пальпации. У телят моложе 6-месячного возраста описаны случаи менингоэнцефалита, проявляющегося клинически двигательной атаксией, манежными движениями, тремором всех групп мышц, слепотой, опистотонусом, депрессивными нервными явлениями, повышенной температурой с одновременным появлением конъюнктивита, ринита и двусторонне-

го кератита. У некоторых больных животных наблюдают поражение глаз, вульвы, вагины и респираторного тракта. Клинические признаки болезни отмечают в течение 10—30 дней. Телята, у которых болезнь протекала в форме тяжелого воспаления легких, после осложнений вторичной микрофлорой погибают, а если и выживают, то сильно отстают в росте и развитии.

Патологические изменения (гиперемия, некроз и псевдодифтерийные пленки на поверхности эпителия) локализуются в гортани, глотке и трахее. В трахее и бронхах скопляется слизь; иногда наблюдается темно-красная пятнистость легких. На внутренней стороне рубца и сычуга — многочисленные, мягкие, беловатые узелки диаметром от 1 до 10 мм. Эпителий под такими узелками шероховатый и эрозированный. В печени обнаруживаются множественные беловатые, размером с кончик булавки очажки некроза, рассеянные по всей паренхиме.

ВИРУС

Вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота относится к группе герпес (Herpes)-вирусов. ДНК-содержащий. Размер вибрионов от 120 до 180 ммк. Они усеяны удлиненными полыми протеиновыми субъединицами (капсомеры), окружающими нуклеиновую кислоту. Капсомеры вместе с нуклеиновой кислотой заключены в липопротеиновую оболочку. Тип симметрии кубический. Зрелые вирусные частицы чувствительны к обработке эфиром или хлороформом, которые разрушают инфекционные свойства вируса. Вирус инактивируется в течение 20 минут при температуре 56°, 10 дней при 37° и 50 дней при 22°; устойчив при pH 6,0—9,0, чувствителен к pH 4,0—5,0. Инактивация вируса в растворах формалина 1 : 500, 1 : 1000 и 1 : 5000 наступает через 24, 48 и 96 часов соответственно.

Локализация в организме. В организме больных животных вирус локализуется в слизистой оболочке носовой полости, конъюнктивы, в легких, а также в половых органах (вульва, вагина). При поражении мозга — в мозгу.

Антигенных вариантов этого вируса не обнаружено. Он не обладает гемагглютинирующими и гемадсорбирующими свойствами с эритроцитами животных разных видов.

Спектр патогенности. В естественных условиях инфекционным ринотрахеитом заболевает только крупный рогатый скот. В экспериментальному заражению восприимчив крупный рогатый скот, козы и кролики. Из лабораторных животных в экспериментальных условиях к вирусу невосприимчивы морские свинки, крысы, мыши, новорожденные мышата, хомяки, куриные эмбрионы.

Кролики заболевают при нанесении вируссодержащего материала на скарифицированную кожу, роговицу, а также при введении его интрацеребрально.

Вирус хорошо культивируется в культуре клеток почек новорожденных телят, почек эмбриона крупного рогатого скота, легких и тестикул. Имеются литературные данные по адаптации вируса инфекционного ринотрахеита к перевиваемым линиям клеток.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Лабораторная диагностика основана на выделении и идентификации вируса, а также обнаружении специфических антител.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материала. При выделении вируса от больных животных в качестве исходного материала используют соскобы и смывы из носовой полости, конъюнктивы и половых органов. Тампоны, которые употребляют для взятия слизи, погружа-

ют в сосуды со средой Эрла и встряхивают в течение часа, затем их отжимают и жидкость центрифугируют. Полученный смыв из исследуемой пробы тотчас же центрифугируют (10 минут при 3000 об/мин), надосадочную жидкость отсасывают, добавляют к ней по 1000 ЕД пенициллина, стрептомицина и 500 ЕД нистатина. Пробы выдерживают в течение 2 часов при комнатной температуре или 12 часов в холодильнике, а затем заражают ими культуру клеток почек эмбриона крупного рогатого скота в объеме 0,1—0,3 мл на каждую из четырех пробирок.

При выделении вируса из трупов берут кусочек слизистой оболочки носовой полости или паренхиматозных органов, растирают с песком, добавляют культуральную среду в соотношении 1 : 10, центрифугируют. Дальнейшую обработку проводят аналогично описанной выше.

Заражение культуры ткани. Для выращивания вируса можно использовать первичные и субкультуры клеток почки телят, почки эмбриона крупного рогатого скота, легочной ткани телят. В лабораторной практике чаще применяют первичную культуру клеток почек телят. Ее выращивают на среде с гидролизатом лактальбумина, приготовленной на растворе Эрла или растворе Хенкса с добавлением 10% сыворотки телят.

Цитопатогенное действие может проявляться уже через 24 часа вследствие размножения вируса или токсического повреждения клеток. При наличии вируса в малых концентрациях в первом пассаже цитопатогенного действия можно не обнаружить, поэтому рекомендуется провести 2—3 слепых пассажа (с недельным выдерживанием культуры в термостате).

Цитопатический эффект, вызванный вирусом, проявляется через 36—48 часов (иногда до 5 суток) после заражения культуры и характеризуется зернистостью, округлением клеток, которые располагаются кучками в виде скоплений. Цитопатогенное действие распространяется на весь слой клеток, вплоть до полного его разрушения.

Если проба взята от животного, которое давно пало, или проба транспортировалась без охлаждения, то такие пробы могут оказываться токсичными для культуры клеток. В подобных случаях нужно через 2—3 часа после заражения сменить среду.

При цитологическом исследовании инфицированных культур, окрашенных гематоксилинэозином, встречаются внутриклеточные включения, которые характеризуются уплотнением ядерного (нуклеарного) вещества с эозинофилией и маргинацией хромотинового материала. Внутриядерные тельца-включения типа А-Каудри.

Заражение животных проводят с целью идентификации вируса инфекционного ринотрахеита. Телятам 6—8-месячного возраста патологический материал вводят интраназально, в конъюнктиву, в вагину и под кожу. Если в исследуемом материале есть вирус, у зараженных животных развивается заболевание в виде ринотрахеита с конъюнктивитом. От больных телят вирус выделяют глав-

ным образом из пораженной трахеи и гортани. У зараженных животных развиваются симптомы болезни, сходные с наблюдаемыми при естественном течении болезни. Первые клинические признаки появляются через 20 часов после заражения и регистрируются 7—10 дней. Наиболее характерные симптомы: потеря аппетита, притупление чувствительности, высокая температура, спонтанный кашель, обильные серозные выделения из носовой полости и глаз, а также появление на покрасневшей слизистой оболочки вульвы и влагалища беловатых рассеянных узелков.

На 2—3-й день болезни общее состояние животных ухудшается; носовые выделения становятся слизисто-гнойными, везикулярные шумы шероховатыми, дыхание неровным, в результате стеноза гортани и трахеи появляется одышка. Узелки во влагалище превращаются в пустулы (пустулезный вульвовагинит). В последующие дни симптомы постепенно ослабевают и на 7—10-й день исчезают. Зараженные телята, как правило, выздоравливают и остаются вирусоносителями.

Выделить вирус из носовой полости, влагалища и со слизистой конъюнктивы удается с 5-го по 10-й день, а нейтрализующие антитела — с 5—8-го дня после заражения. Более высокий титр антител наблюдался после 35 дней, затем начинается медленное снижение.

Кроме телят, вирус инфекционного ринотрахеита патогенен для кроликов при нанесении его на скарифицированную кожу, роговицу, интрацеребрально. На скарифицированной коже вирус вызывает диффузный эритематозный дерматит, на конъюнктиве — катаральный конъюнктивит с кратерообразными язвами роговицы; при интрацеребральной инокуляции у 50—60% животных развивается острый менингоэнцефалит с последующими параличами задней части тела.

Возможно и обратное выделение вируса: из конъюнктивального экссудата, кожных струпьев (корочек), а также нервной системы погибших экспериментально зараженных телят и кроликов.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Цитоскопия. В общий комплекс диагностических исследований входит обнаружение внутриядерных телец-включений в клетках эпителия пораженных слизистых оболочек носовой полости, вульвы, вагины и конъюнктивы. Их можно обнаружить и в клетках зараженной культуры ткани, окрашенной гемотоксилинэозином, через 18—20 часов после заражения.

Серологическая идентификация

При серологической идентификации реакция связывания комплемента при данной инфекции не дает положительных результатов. Диагностическое значение имеет реакция нейтрализации, ко-

торая используется для идентификации выделенного вируса и для обнаружения специфических антител у переболевших животных. Реакцию нейтрализации можно ставить, используя или постоянное количество вируса и различные разведения сыворотки (метод *а*), или постоянное разведение сыворотки (гипериммунная) и различные разведения вируса (метод *б*).

Метод *а* больше подходит для обнаружения антител у переболевших животных (ретроспективная диагностика). В этом случае необходимо иметь культуральный вирус с известным титром. Для сохранения активности вируса следует хранить его при температуре минус 65°. Метод *б* служит, как правило, для идентификации изолированного вируса. Сыворотку следует инактивировать при 56° в течение 30 минут. Для идентификации выделенного вируса с помощью реакции нейтрализации в лаборатории должна быть заведомо активная специфическая антисыворотка. Гипериммунную вируснейтрализующую сыворотку готовят на кроликах по следующей схеме: подкожно вводят 1 мл культурального вируса с адъювантом Фрейнда, далее следует трехкратное внутривенное введение вируса в объеме 1 мл с интервалом через 7 дней. Через 10 дней после последней инокуляции вируса кроликов обескровливают, сыворотку замораживают и хранят при минус 30°.

Идентификацию вируса при помощи реакции нейтрализации проводят следующим образом. Готовят два ряда пробирок десятикратных разведений вируса (например, от 10^{-1} до 10^{-7}). В пробирки одного ряда добавляют постоянное количество нормальной сыворотки (разведенной, например 1 : 20) в соотношении 1 : 1, в пробирки другого ряда — гипериммунную сыворотку в том же разведении (лучше сыворотку крови кроликов). Смесь вируса с сывороткой для связывания оставляют на 12 часов при 4°, или на 2 часа при комнатной температуре, или на 1 час при 37° в водяной бане. После связывания вируса с сывороткой смесью инокулируют культуру клеток. Это можно сделать двумя способами: или в каждую пробирку с культурой добавить по 1 мл смеси, предварительно слив старую культуральную среду, или в каждую пробирку, которая содержит поддерживающую среду, добавить по 0,2 мл смеси вирус-сыворотка. Количество культуральной среды должно быть везде одинаковым.

Смесью, соответствующей каждому разведению вируса, заражают культуру клеток в четырех пробирках. Учитывая, что в лабораторных условиях удается получать специфическую сыворотку на вирус инфекционного ринотрахеита с довольно низкой активностью (1 : 2, 1 : 4), в редких случаях достигающей 1 : 16, 1 : 32, можно использовать метод повышения чувствительности реакции нейтрализации, который основывается на использовании в данной реакции 10, 100 и 1000 $ТЦД_{50}$/0,2 мл в соединении со специфическими сыворотками в объеме 0,1—0,2—0,4 мл. При этом методе чувствительность реакции нейтрализации повышается почти в 4 раза. Одновременно ставят контроли: культуры ткани, антигена (вирус заме-

няют культуральной средой) и сыворотки (сыворотку заменяют средой). Кроме того, в реакции нейтрализации каждый раз участвует специфическая и нормальная сыворотка крови кроликов. Результат реакции нейтрализации учитывают на 5—7-й день по цитопатогенному эффекту. Индекс нейтрализации можно подсчитать по методу Рида и Менча или Кербера.

Методы иммунофлуоресценции и диффузной преципитации в агаровом геле также могут быть использованы для диагностики болезни.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

При дифференциальной диагностике необходимо исключить вирусную диарею при помощи реакции нейтрализации в культуре клеток, пикорно-, адено- и реовирусы, а также миксовирусы (парагрипп крупного рогатого скота) и пузырьковую сыпь. Вирус инфекционного ринотрахеита разрушается под действием хлороформа, а пикорно-, адено- и риовирусы устойчивы к нему, что может служить одним из методов идентификации. Для диагностики аденовирусов можно использовать реакцию связывания комплемента, а миксовирусов — реакцию гемагглютинации и гемадсорбции.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ретроспективную диагностику инфекционного ринотрахеита в стаде проводят при помощи реакции нейтрализации в культуре ткани. Для этого исследуют парные сыворотки животных в разных разведениях с постоянным количеством вируса. От каждого животного необходимо иметь хотя бы по две пробы сыворотки: первую пробу берут в начале болезни, вторую — через 4—6 недель. Обычно сыворотки реконвалесцентов нейтрализуют культуральный вирус в разведении 1 : 5—1 : 10 (Мак Керчер, Моултон и др., 1957). Титр нейтрализации антител 1 : 4 считается положительным. Высокие титры — 1 : 32, 1 : 64 — обнаруживаются редко. В неблагополучных по данному заболеванию стадах вируснейтрализующие антитела обнаруживаются у 12% клинически здорового скота.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

Иммунитет у переболевших животных продолжается не менее 6 месяцев. Для специфической профилактики инфекционного ринотрахеита используют живую вакцину (аттенуированный культуральный вирус) и инактивированную формолвакцину. Поствакцинальный иммунитет наступает с 14-го дня и продолжается до одного года. Серологическая оценка напряженности его не разработана. Нет четкой корреляции между титром вируснейтрализующих антител и степенью поствакцинального иммунитета.

ВИРУСНАЯ ДИАРЕЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

(BOVINE VIRAL DIARRHLA)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Вирусная диарея крупного рогатого скота [болезнь слизистых оболочек, диарея крупного рогатого скота (штаммы «Нью-Йорк», «Оригон», «Индиана»), инфекционная диарея крупного рогатого скота, инфекционный энтерит крупного рогатого скота, пневмоэнтерит телят] — контагиозная болезнь преимущественно молодых животных, характеризующаяся эрозивно-язвенным воспалением слизистых оболочек пищеварительного тракта, ринитом и увеличением лимфатических узлов, высокой лихорадкой при наличии общего угнетения и лейкопении, постоянной или перемежающейся диареей, эрозивным и язвенным стоматитом с обильным слюновыделением, появлением слизисто-гнойных истечений из носовой полости; нередко отмечается хромота.

Болезнь зарегистрирована в США, Канаде, Англии, Голландии, Франции, Дании, ГДР, Италии, Швеции, Финляндии, Австралии, Новой Зеландии, в некоторых государствах Африки и других странах. Инфекция, по-видимому, весьма широко распространена среди крупного рогатого скота по всему миру, но не везде еще ее диагностируют.

Заболевает молодняк в возрасте от 2 месяцев до 2 лет; взрослый крупный рогатый скот относительно устойчив к инфекции, но иногда болеют коровы, особенно после первых отелов.

Симптомы болезни, тяжесть переболевания, широта распространения и процент летальности значительно варьируют в зависимости от вирулентности вируса, чувствительности животных и наличия неблагоприятных (стрессорных) факторов.

Чаще отмечают острое течение болезни. Оно характеризуется высокой лихорадкой (39,5—42°) на протяжении 12—60 часов, сильной депрессией, появлением множества эрозий и язв на слизистых оболочках ротовой полости и почти всего пищеварительного тракта. В ротовой полости, особенно на отдельных участках губ, десен, твердого нёба и щек, вначале появляются сильногиперемированные припухлости 10×3—5 мм, из которых затем развиваются везикулы; верхний слой их эпителия легко разрывается, и образуются эрозии, изъязвления с красным основанием и четко очерченными краями. Аналогичные изъязвления часто развиваются и на конечностях в области межкопытной щели, иногда на слизистой оболочке ноздрей, половых органов и вокруг ротовой полости. Развивается ринит. На 7—9-й день обычно отмечают диарею, которая наблюдается постоянно или периодически на протяжении 1—4 недель. Испражнения становятся водянистыми, темными, с обильным содержанием зловонных газов; часто в них обнаруживают слизь и сгустки крови.

Острое течение болезни длится, как правило, от 4 дней до 2 недель и почти всегда заканчивается летально.

Хроническое течение вирусная диарея чаще принимает после острой вспышки болезни. Характерным являются длительная диарея, развитие кахексии. Абортивное течение инфекции, проявляющееся невысокой кратковременной лихорадкой, незначительным истечением из носовой полости, иногда диареей, чаще наблюдают у молодняка старшего возраста и у коров, преимущественно в тех стадах, где регистрируется хроническое течение болезни; болезнь длится 3—4 дня и заканчивается выздоровлением животных.

Наиболее характерные патологоанатомические изменения обнаруживают на слизистых оболочках желудочно-кишечного тракта и верхних дыхательных путей.

Эрозии и изъязвления постоянно находят на слизистой оболочке губ, щек, десен, на боковых поверхностях языка, твердом и мягком нёбе, у основания гортани.

Чаще поражения бывают рассеянными и захватывают лишь поверхностные слои ткани, но иногда сливаются. Аналогичные поражения обнаруживают в рубце и сычуге. В тонком отделе кишечника отмечаются изменения, характерные для катарального, фибринозно-некротического или геморрагического энтерита.

На основании различий в клинических проявлениях вирусную диарею и болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота первоначально рассматривали как совершенно различные болезни. Позднее на основании анализа патологических и гисто-морфологических изменений, особенностей эпизоотологии и клинических проявлений эти две болезни стали диагностировать как одно заболевание под названием «комплекс вирусная диарея — болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота». В настоящее время установлена идентичность возбудителей этих болезней, и их считают одной инфекцией с различными клиническими проявлениями, с преимущественным развитием респираторного или диарейного синдрома, в связи с чем болезнь чаще стали называть «вирусная диарея крупного рогатого скота».

ВИРУС

Возбудитель вирусной диареи крупного рогатого скота — сферический РНК-содержащий вирус, относящийся к группе липовирусов. Таксономическое положение его окончательно не определено. Вирус проходит через фильтры Беркефельда N и W. Диаметр частиц вируса 40—50 ммк.

Устойчивость. Вирус чувствителен к эфиру, хлороформу, трипсину, дезоксихолату натрия, инактивируется в кислой среде (pH 3,0).

При 37° он погибает через 5 дней. Прогревание при 56° в течение 15 минут снижает активность вируса в 10 раз, но для полной инактивации вируса при этой температуре требуется 1 час. Добавление 1 М $MgCl_2$ не стабилизирует устойчивости вируса к прогреванию при 50°. Вирус устойчив к температурам 4°, минус 40° и 80°, хорошо переносит повторные замораживания и размораживания, однако имеются сообщения, что при минус 20° некоторые штаммы вируса могут погибать сравнительно быстро.

Хранение и консервирование вируссодержащих материалов. В цитрированной крови и в лимфатических узлах при 4° вирус сохраняет активность до 6 месяцев, при минус 20° — до одного месяца. В связи с повышенной чувствительностью вируса к кислой среде вируссодержащую суспензию следует готовить на фосфатном буферном растворе (pH 7,4) или на среде для тканевых культур, не содержащей сыворотки.

С целью длительного сохранения вируса кусочки необработанного патологического вируссодержащего материала можно заморозить и хранить при минус 30—70°, используя затем по мере надобности в течение 2—3 лет.

Локализация в организме. В наиболее высоких концентрациях вирус обнаруживают на слизистых оболочках верхних дыхательных путей и в кишечнике, в меньших концентрациях — в среднем и нижнем отделах респираторного тракта, наиболее низкие — в печени, селезенке, почках. В крови вирус содержится в наиболее высоких титрах (10^3—10^5 ID_{50}/мл) в период подъема температуры в первые дни болезни, однако в небольших количествах его удается обнаруживать в течение 2 недель. У павших животных вирус чаще находят в 12-перстной кишке, лимфатических узлах, легких, селезенке, печени.

Вирус может содержаться в истечениях из носовой полости и в фекалиях больных животных, однако выделять его из этих материалов удается не всегда. Возможно, он содержится и в других тканях, секретах и экскретах.

При затяжном течении болезни вирус регулярно выделяют из слизистой оболочки кишечника и верхних дыхательных путей.

Антигенные свойства и вариабельность. Вирус обладает выраженной антигенной активностью. В крови переболевших животных обнаруживают преципитирующие и вируснейтрализующие антитела. Общепризнано наличие двух иммунологически различных типов вируса диареи — «Нью-Йорк» и «Индиана». При помощи реакции нейтрализации и диффузионной преципитации установлена антигенная идентичность ряда штаммов вируса вирусной диареи и вируса болезни слизистых оболочек, выделенных в различных странах, со штаммом «Орегон С-24» американского происхождения. Некоторые штаммы вируса диареи отличаются от него в антигенном отношении, но иммунологически идентичны с ним. Антигенные различия между штаммами вируса выявляются при постановке реакции перекрестной нейтрализации в культуре клеток с использованием штаммов вируса, обладающих цитопатогенным действием, и типоспецифических гипериммунных сывороток, получаемых на кроликах. Вопрос об антигенных и иммунологических различиях между штаммами вируса вирусной диареи подлежит дальнейшему изучению и уточнению.

Возбудитель вирусной диареи крупного рогатого скота обладает растворимым антигеном, по-видимому, липопротеиновой природы, общим с вирусом чумы свиней. Гипериммунная сыворотка против чумы свиней может нейтрализовать вирус вирусной диареи крупного рогатого скота.

Изученные штаммы вируса не обладают гемагглютинирующей и гемадсорбирующей активностью по отношению к эритроцитам морских свинок, барана, крупного рогатого скота, свиньи, цыплят, как при 20°, так и при 4°.

Спектр патогенности. В естественных условиях болеет крупный рогатый скот. К экспериментальному заражению наиболее восприимчивы телята в возрасте до 2—6 месяцев. Заражение их удается при внутривенном, интраназальном, внутрибрюшинном, внутримышечном и подкожном введении вируссодержащего материала, а также контактным путем. Имеются сообщения о возможности заражения вирусом диареи крупного рогатого скота в экспериментальных условиях овец, коз, поросят и кроликов. Белые мыши, белые крысы, морские свинки, хомячки, собаки, кошки, цыплята, голуби устойчивы к заражению вирусом.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагностика данной болезни основывается на выделении, идентификации вируса и выявлении специфических вируснейтрализующих и преципитирующих антител. В сомнительных случаях диагноз уточняют биопробой на телятах.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материала. Для выделения возбудителя вирусной диареи используют кровь (гепаринизированную или цитрированную), мезентериальные и ретрофарингеальные лимфатические узлы, кусочки различных отделов кишечника, легких, селезенки, печени, слизистых оболочек ротовой и носовой полостей, а также носовые и глоточные смывы, иногда фекалии больных животных. Легче вирус выделить в начале болезни и в период обострения ее из крови, легких, различных отделов тонкого кишечника (в особенности из клеток слизистой оболочки 12-перстной кишки), лимфатических узлов и селезенки. При хроническом течении болезни его удается регулярно выделять из различных отделов ки-

шечника, но не из крови. Исследование носовых смывов и фекалий в этих случаях также дает отрицательные результаты, хотя в отдельных случаях вирус удавалось выделять из фекалий даже через пять месяцев после заболевания.

В начале болезни в период подъема температуры от больных животных берут пробы крови в раствор цитрата натрия или гепарина и помещают их в термос со льдом (4°). Одновременно при наличии ринита ватными тампонами берут выделения из носовой полости и глотки, а иногда также и из прямой кишки. Тампоны помещают в пробирки, содержащие по 2—3 мл среды для культур тканей без сыворотки или раствора Хэнкса с антибиотиками (пенициллин 1000 ЕД/мл, стрептомицин 1000 ЕД/мл, нистатин 200 ЕД/мл) (pH 7,4—7,6) и ставят их в термос со льдом. Пробы фекалий берут из прямой кишки. При наличии диареи материал можно собирать в период дефекации в широкогорлые банки.

При вскрытии павших и забитых животных кусочки патологического материала сразу после взятия помещают в стеклянные сосуды, содержащие буферный раствор или безсывороточную среду для тканевых культур с антибиотиками (pH 7,4—7,6), и помещают их в термос со льдом.

После доставки в лабораторию материал можно хранить несколько часов при 4° или, лучше, заморозить и хранить до исследования при минус 30—70°. Пробы цитрированной крови можно сохранять до одного месяца при 4°.

Кусочки тканей, предназначенные для вирусологического исследования, промывают несколько раз буферным раствором, после чего измельчают в гомогенизаторе и готовят 20%-ную суспензию на среде для тканевых культур с антибиотиками (pH 7,4).

Из проб фекалий готовят 10%-ную суспензию на солевом буфером растворе (pH 7,4), содержащем антибиотики (2000 ЕД/мл пенициллина, 1000 ЕД/мл стрептомицина и 200 ЕД/мл нистатина). Приготовленные суспензии оставляют на 3—4 часа при 4°, после чего центрифугируют при 2000—3000 об/мин в течение 60 минут в рефрижераторной центрифуге. Полученную надосадочную жидкость замораживают и хранят до использования при минус 30—70°.

Все материалы контролируют на бактериальное загрязнение и контаминацию микоплазмами.

Выделение вируса в культуре клеток. Для выделения вируса используют первично-трипсинизированную культуру клеток почки эмбриона крупного рогатого скота, семенников теленка или ягненка. Для последующего пассирования используют субкультуры 1-го пассажа клеток почки эмбриона крупного рогатого скота.

Культуры клеток получают общепринятыми методами, но из-за частого присутствия в сыворотках крупного рогатого скота вируснейтрализующих антител к возбудителю вирусной диареи целесообразно для выращивания клеток использовать среду с добавлением 10% лошадиной сыворотки или сыворотки ягненка. В под-

держивающей среде содержание лошадиной сыворотки уменьшают до 5%. Каждый образец пассируют 3—5 раз.

В связи с бо́льшим количеством штаммов вируса вирусной диареи, которые не вызывают цитопатогенных изменений в культурах клеток почки эмбриона крупного рогатого скота, культуральный материал 3—5-го пассажей проверяют на присутствие вируса биопробой на восприимчивых телятах 2—6-месячного возраста, которые предварительно должны быть проверены на отсутствие антител к вирусу вирусной диареи.

Характеристика цитопатических изменений, вызываемых вирусом. В первичных культурах клеток почки эмбриона первые цитопатогенные изменения обнаруживают через 2—5 дней инокуляции. Оно выражается в появлении мелкозернистой инфильтрации в клетках фибробластического типа. По мере развития инфекции клетки постепенно отторгаются от поверхности стекла, но некоторые долго сохраняются, образуя островки, состоящие преимущественно из клеток эпителиоидного типа. В конце концов на стекле остается только сеть зернистого материала.

При использовании вторичных культур клеток цитопатические изменения появляются почти одновременно во всех клетках монослоя, причем они становятся удлиненными, угловатыми и кажутся переплетенными.

В окрашенных препаратах клеточного монослоя при наличии цитопатических изменений обнаруживают вакуолизацию протоплазмы и изменения ядер, выражающиеся в сокращении мембраны, пикнозе и кариорексисе (рис. 1).

В некоторых случаях вакуолизация бывает так выражена, что ее наблюдают при микроскопии неокрашенных препаратов.

Развитие цитопатических изменений не соответствует увеличению титра вируса. К 72—96 часам после инокуляции, когда титры вируса достигают максимума ($10^{5,5}$—$10^{6,5}$ $ТЦД_{50}$), отмечают лишь начало цитопатогенного действия.

В связи с тем, что существуют нецитопатогенные штаммы вируса диареи, японские исследователи (Омори и др., 1967) предлагают использовать для индикации таких штаммов феномен экзальтации вируса болезни Ньюкасла в присутствии возбудителя вирусной диареи. Сущность метода сводится к появлению цитопатических изменений при совместном выращивании этих агентов в культурах клеток тестикулярной ткани крупного рогатого скота.

Методика исследования заключается в следующем.

Диспергированные трипсином клетки тестикулярной ткани крупного рогатого скота суспендируют до концентрации 2×10^6 клеток в 1 мл в 0,5%-ном растворе гидролизата лактальбумина на растворе Хэнкса с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота, проверенной на отсутствие нейтрализующих антител к возбудителю вирусной диареи.

Суспензию распределяют по 0,5 мл в пробирки 11×100 мм. В каждую из них затем инокулируют по 0,1 мл вирусного материала (разведенного вируса вирусной диареи) и инкубируют при 37° в наклонном стационарном положении. В качестве контроля в каждый опыт включают неинокулированные культуры. После четырех дней инкубирования жидкость удаляют, а культуры заражают вирусом болезни Ньюкасла (10^6 БОЕ в 0,5 мл среды). После дополнительного трехдневного инкубирования при 37° во вращающемся барабане культуры исследуют на наличие цитопатогенного действия. В культурах, первоначально инфицированных нецитопатогенным штаммом вируса диареи, после заражения вирусом болезни Ньюкасла появляется четко выраженный цитопатогенный эффект. В контрольных культурах один вирус ньюкаслской болезни обычно не вызывает цитопатических изменений. Незараженные культуры, в которые не вводили ни один из вирусных агентов, должны оставаться нормальными.

Титр вируса выражают в единицах $ТЦД_{50}$ и рассчитывают по методу Кербера.

Для пассирования нецитопатогенных штаммов культуры, инокулированные вирусом диареи каждого пассажа, инкубируют в течение 3 дней при 37°, после

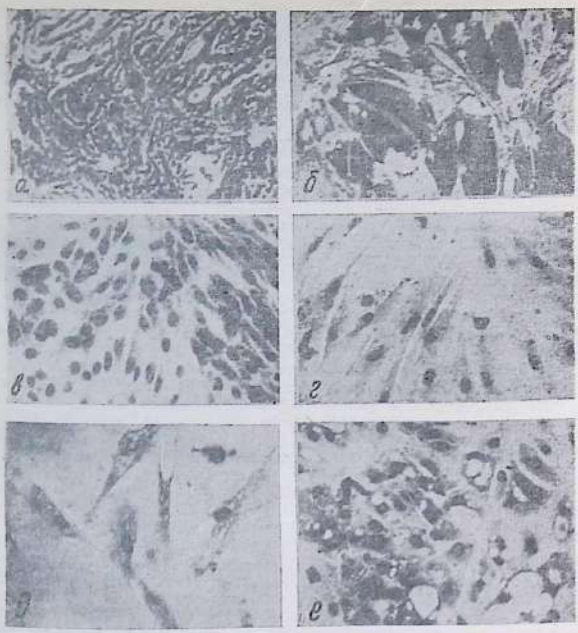


Рис. 1. Цитопатогенное действие вируса вирусной диареи крупного рогатого скота (штамм «Орегон») в первичной культуре клеток почки теленка. Через 4 дня после заражения:

а — незараженный, контроль, *б* — культура, зараженная вирусом; фазовый контраст влажных препаратов — через 8 дней после заражения; *в* — незараженный, контроль; *г* — зараженная культура, выраженный пикноз ядер; *д* и *е* — зараженные культуры с выраженной в различной степени вакуолизацией протоплазмы клеток. Окраска гематоксилин-эозином (по Джиллеспи и др., 1960).

чего собирают культуральную жидкость, а культуры инфицируют вирусом болезни Ньюкасла и дополнительно инкубируют для индикации вируса диареи при помощи феномена экзальтации. Культуральную жидкость, собранную с пробирок, которые при такой проверке дадут положительный феномен экзальтации, используют для проведения дальнейших пассажей.

Культивирование вируса на куриных эмбрионах. Культивировать на куриных эмбрионах удается не все штаммы вируса. Лишь отдельные из них после нескольких пассажей путем заражения в желточный мешок удается адаптировать к этой системе. Размножение таких штаммов в желточном мешке происходит к 48-му часу после инокуляции. Обычно на 3—6-е сутки после заражения около 50% эмбрионов погибают. При вскрытии их на хорионаллантоисе отмечают образование «оспин», а при гистологическом исследовании тканей — зернистые или вакуолизированные клетки. Титр вируса в отдельных случаях достигает 10^8 ID_{50}/мл.

Биопробу на телятах ставят в тех случаях, когда попытки выделения специфического вируса оказались безуспешными или возникает сомнение в его наличии в связи с тем, что в зараженных культурах клеток нет цитопатических изменений. Для этого используют телят 2—6-месячного возраста, проверенных на отсутствие вируснейтрализующих антител к вирусу диареи, или телят 4—6-дневного возраста, полученных из благополучного хозяйства. В качестве материала для заражения используют культуральную жидкость 3—5-го пассажей, которую вводят внутривенно в количестве 5—10 мл. Если в исследуемом материале есть вирус диареи, у телят на 4—7-й день после заражения отмечают повышение температуры, лейкопению, появление слизистых истечений из носовой полости и диарею; у некоторых животных могут отмечаться тенезмы. В случае положительного результата у зараженных животных вирус сравнительно легко удается выделить из крови. В наибольшей концентрации вирус (10^3—10^5 ID_{50}/мл) обнаруживают через четыре дня после заражения, хотя присутствие его в крови подтверждается на протяжении 15 дней.

Выделить вирус из материала, взятого тампоном в носовой полости и ректально от зараженных телят, удается редко. Сравнительно легко его выделяют из легких, 12-перстной кишки и медиастинальных лимфатических узлов от животных, забитых при остром течении болезни.

При вскрытии животных обнаруживают патологоанатомические изменения, характерные для болезни. Для подтверждения диагноза важно в реакции нейтрализации исследовать парные сыворотки, одну из которых берут перед заражением, а вторую — через 2—3 недели.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Для идентификации вируса вирусной диареи используют два основных серологических метода — реакцию диффузионной преципитации в агаровом геле и реакцию нейтрализации в культуре ткани.

Реакция диффузионной преципитации (РДП) — удобный и быстрый метод диагностики полевых случаев болезни. Ее используют для обнаружения вируспецифического преципитирующего антигена вируса вирусной диареи в патологическом материале и для обнаружения преципитирующих антител в сыворотках крови переболевших животных.

Компоненты реакции. *Антиген.* Для обнаружения специфического антигена в качестве материала используют различные ткани от больных животных (кусочки из различных участков желудочно-кишечного тракта, особенно с видимыми патологоанатомическими изменениями; лимфатические узлы, кусочки паренхиматозных органов). Эмульгирование или смешивание ткани с разбавителем часто приводит к снижению или отсутствию преципитации, поэтому в качестве антигена для реакции обычно берут цельную ткань, слегка измельченную в гомогенизаторе. В качестве антигена можно также использовать культуральный вирус, выращенный в культуре клеток семенников теленка. (Возможность получения антигена в культурах клеток, инфицированных эталонным штаммом вируса вирусной диареи, например «Орегон С-24», обеспечивает удобный источник положительного контрольного антигена для реакции диффузионной преципитации). При минус 20° такой антиген стабильно сохраняет свою активность в течение

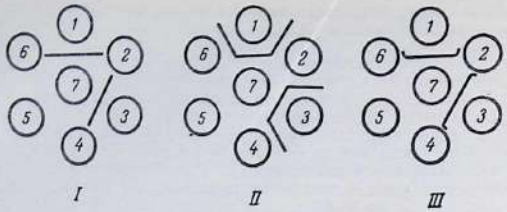


Рис. 2. Схема РДП при вирусной диарее крупного рогатого скота (объяснения в тексте) (по Дербиширу).

6 месяцев, но при 37° разрушается в течение одного часа, а при 56° утрачивает активность за 15 минут.

Антисыворотка. Антисыворотку для РДП готовят на крупном рогатом скоте. Для иммунизации животных используют цитрированную кровь, взятую асептически от экспериментально зараженных животных в период подъема температуры. Кровь вводят внутривенно (некоторым животным делают по нескольку таких инъекций). Для получения сыворотки кровь берут через 60—90 дней после инокуляции.

В качестве контроля используют сыворотку от несосавших телят.

Постановка реакции. Для постановки реакции используют 1,5%-ный агар на 0,85%-ном NaCl, забуференном 0,01 М фосфатным буфером, с добавлением 0,5% фенола для предотвращения роста микроорганизмов. Используя 0,1 М NaOH, устанавливают pH 7,2.

В чашки Петри диаметром 9 см наливают по 12 мл агаровой среды. После застывания агара штампом вырезают 7 лунок диаметром по 0,5 см на расстоянии 0,2 см друг от друга.

Порядок расположения материалов: лунки 1,3 — контроль положительной сыворотки; лунки 2, 4, 6 — три исследуемые пробы ткани; лунка 5 — нормальная сыворотка; лунка 7 — контрольный положительный антиген.

Сыворотки обычно используют неразведенными, но в связи с наличием феномена зоны желательно, чтобы пробы антигена были испытаны против нескольких разведений специфической антисыворотки.

Чашки Петри инкубируют в течение ночи при 22°. Реакцию читают в темной комнате с интенсивным источником света. Результаты реакции учитывают в соответствии с прилагаемой схемой (рис. 2).

В любом случае, если образовались только контрольные линии, реакцию считают отрицательной; если испытуемый антиген реагировал с иммунной сывороткой и образовал длинную линию преципитации с контролем (идентичность линий), реакцию счита-

ют положительной; при наличии небольших изгибов на концах контрольных линий реакцию считают сомнительной.

Наиболее подходящим материалом для РДП в качестве источника антигена является слизистая оболочка щек или тонкого отдела кишечника, а также мезентериальные лимфатические узлы от больных животных. Положительный результат может быть получен примерно в 35—40% случаев.

РДП можно также использовать для обнаружения преципитирующих антител в испытуемых сыворотках. С целью диагностики заболевания обычно исследуют парные сыворотки от крупного рогатого скота, собранные во время полевых вспышек болезни. Кровь для получения сыворотки надо брать с интервалом не менее 3 недель, чтобы повысить вероятность выявления нарастания титров преципитирующих антител, которые появляются в сравнительно поздние сроки (3—4 недели) после инфицирования и могут сохраняться по крайней мере на протяжении 4 месяцев (титры антител — до 1 : 16). При исследовании парных сывороток количество положительных результатов в отдельных случаях может составлять около 15—17%.

Применение РДП для лабораторной диагностики естественной инфекции в положительных случаях обеспечивает быструю и точную постановку диагноза, однако пока чувствительность метода не велика, и его следует использовать в комплексе с другими методами лабораторной диагностики и идентификации возбудителя.

Реакция нейтрализации. В связи с тем, что выделено несколько штаммов вируса вирусной диареи, обладающих цитопатогенным действием, в культуре клеток данная реакция находит все более широкое применение для идентификации возбудителя. Помимо идентификации возбудителя, ее применяют и для обнаружения специфических вируснейтрализующих антител в сыворотках крови переболевших животных (при ретроспективной диагностике). В результате того, что большое количество штаммов вируса не обладает цитопатогенной активностью, более широко распространена постановка реакции с целью обнаружения антител путем использования лабораторных штаммов вируса, которые хорошо адаптированы к культурам клеток и вызывают четко выраженные цитопатические изменения.

Обычно для этого используют штамм «Орегон С-24». В зависимости от адаптации штамма реакция может быть поставлена в первичных или вторичных культурах клеток почки эмбриона крупного рогатого скота, клеток тестикулярной ткани теленка или ягненка и почки ягненка.

Компоненты реакции. В качестве антигена для постановки реакции используют обладающий цитопатогенной активностью штамм вируса, хорошо адаптированный к культуре клеток, с известной активностью ($10^{5,5}$—$10^{7,0}$ $ТЦД_{50}$/мл). Для сохранения активности вирус хранят до использования в замороженном состоянии при минус 30—40°. Перед постановкой реакции культуральный вирус центрифугируют в течение 30 минут при 2500—3000 об/мин (лучше в рефрижераторной центрифуге при 4°), после чего собирают надосадочную жидкость и используют ее для постановки реакции. В соответствии с титром вирусного материала его разводят до содержания 100 $ТЦД_{50}$/0,1 мл.

Антисыворотку для реакции нейтрализации получают от кроликов весом в 2 кг, гипериммунизированных неразведенной вирусосодержащей культуральной жидкостью. Каждому животному вводят подкожно антиген 4 раза: первый раз по 2,5 мл, а затем по 3,0 мл. Интервал между инъекциями — 7 дней. Через 15 дней после последней иммунизации кроликов обескровливают. Полученную

сыворотку инактивируют прогреванием в водяной бане при 56° в течение 30 минут; после чего расфасовывают и хранят до использования при минус 30°. В качестве контрольных сывороток используют сыворотки кроликов, иммунизированных по такой же схеме неинфицированной культуральной жидкостью.

Для получения более активных антисывороток можно использовать несколько иную схему иммунизации, по которой кроликам вводят вирус 5 раз с недельным интервалом:

первая инъекция — 2,5 мл культурального вируса внутривенно; вторая инъекция — 2,5 мл культурального вируса подкожно; третья инъекция — 3,5 мл равных частей культурального вируса и полного адъюванта Фрейнда подкожно; четвертая инъекция — 5 мл равных частей неполного адъюванта и культурального вируса подкожно; пятая инъекция — 3 мл культурального вируса внутримышечно.

Кроликов обескровливают через неделю после последнего введения материала.

Сыворотки крови от здорового и переболевшего крупного рогатого скота сохраняют до использования при минус 20—30°. Перед постановкой реакции их размораживают, прогревают в течение 30 минут при 56°, разводят поддерживающей средой от 1 : 4 до 1 : 512 и используют в реакции нейтрализации. Серийные десятикратные разведения испытуемых изолятов смешивают с равным объемом антисыворотки, разведенной 1 : 10. Смесь тщательно встряхивают и оставляют для нейтрализации в течение 90 минут при комнатной температуре или на 2 часа при 2—4°, после чего вносят по 0,2 мл смеси в пробирки с культурой, беря по четыре пробирки на разведение, в которые затем добавляют по 0,8 мл поддерживающей среды.

Контроль — параллельно ставят реакцию нейтрализации с сывороткой крови кролика, иммунизированного неинфицированной культуральной жидкостью. Пробирки помещают в термостат при 37°. Окончательно результаты реакции учитывают по цитопатогенному действию на 6-й день после инокуляции материала. В положительных случаях индекс нейтрализации достигает 4—5 lg.

Реакцию нейтрализации при исследовании парных или единичных проб сыворотки от переболевшего крупного рогатого скота ставят, смешивая двукратные серийные разведения предварительно прогретой сыворотки с равным объемом рабочей дозы (100 $ТЦД_{50}$/0,1 мл) вируса. Титр вируснейтрализующих антител определяют по задержке цитопатогенного действия вируса и рассчитывают по методу Кербера или Рида и Менча. Титры антител обычно находятся в пределах от 1 : 16 до 1 : 128.

Новые изоляты возбудителя вирусной диареи, не обладающие цитопатогенной активностью, могут быть идентифицированы при помощи гипериммунной сыворотки к вирусу диареи по подавлению феномена экзальтации вируса болезни Ньюкасла, который используют для индикации подобных штаммов. Метод основан на нейтрализации вируса диареи специфической антисывороткой.

Для идентификации таких изолятов двукратные серийные разведения гипериммунной сыворотки, прогретой при 56°, готовят на среде для тканевых культур и смешивают в равных объемах с предварительно подтитрованным и разведенным вирусом, который содержит 200 $ТЦД_{50}$/0,1 мл. Смеси инкубируют при 37° в течение одного часа, после чего используют для постановки теста экзальтации вируса болезни Ньюкасла по методике, описанной выше. На каждое разведение сыворотки берут по две пробирки с культурой. Титр антител выражают как наивысшее первоначальное разведение сыворотки, которое подавляет развитие цитопатического действия после внесения вируса болезни Ньюкасла по крайней мере в одной из двух пробирок.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

При дифференциальной диагностике следует исключить ящур, инфекционный ринотрахеит, чуму крупного рогатого скота, синий язык (вирусную катаральную лихорадку), а также ряд бак-

териальных инфекций (паратуберкулезный энтерит, некробациллез).

При дифференциации от чумы крупного рогатого скота учитывают эпизоотологические данные, а также используют серологические методы исследований (РСК, РДП, РН в культуре клеток).

Ящур дифференцируют на основании результатов биопробы на морских свинках и мышатах-сосунах, данных РСК и РН. Инфекционный ринотрахеит может быть дифференцирован по результатам реакции нейтрализации. Вирусную катаральную лихорадку исключают на основании эпизоотологических данных, а также показателей РН. Паратуберкулезный энтерит дифференцируют на основании РСК, данных бактериологического исследования, а также с помощью аллергена. Некробациллез исключает по результатам микроскопии и биопробы на кроликах.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагноз на прошедшую инфекцию, а также латентное вирусоносительство обычно ставят при помощи реакции нейтрализации в культуре ткани, определяя титры антител в сыворотках реконвалесцентов. Для этого лучше исследовать парные сыворотки, взятые с интервалом в 3—4 недели. При диагностике скрытого течения инфекции чаще используют сыворотки крови убойного скота, поступающего с клиникой недиагностированной инфекции кишечного и респираторного тракта. Обычно в таких случаях процент положительных сывороток (титры от 1 : 8 до 1 : 128) варьирует в широких пределах и может достигать 30—50% (иногда до 80%). У клинически здоровых животных процент положительных проб может колебаться от 6—8 до 20—30%. Динамика появления и угасания титров вируснейтрализующих антител не изучена.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИММУНИТЕТА

Иммунитет у переболевших животных продолжается 4—5 месяцев. Вакцины из аттенуированного вируса не вышли за рамки испытаний. Методы серологической оценки поствакцинального иммунитета не разработаны.

ПАРАГРИПП КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
(PARAINFLUENZA BOVINAE)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Парагрипп крупного рогатого скота (инфекционный бронхит, бронхопневмония крупного рогатого скота, острый катар верхних дыхательных путей, транспортная лихорадка) — остро протекающая контагиозная болезнь главным образом телят, характеризующаяся поражением органов дыхания.

Болезнь регистрируют в США, Японии, ОАР, Англии, Югославии, ФРГ и в других странах. В естественных условиях заражение происходит при перегоне скота, на базарах, откормочных пунктах. Инфекция передается воздушно-капельным путем и, возможно, перорально, так как описаны случаи выделения вируса из молока и фекалий. Болезнь возникает в виде энзоотических вспышек и редко протекает в виде распространенных эпизоотий.

Клинически парагрипп крупного рогатого скота у больных телят (до года) проявляется катаром дыхательных путей, иногда тяжелым бронхитом и пневмонией. Инкубационный период продолжается от 2 до 10 дней. Температура тела повышается до 41,5°, аппетит ухудшается; отмечают приступы сухого болезненного кашля, чувствительность гортани и трахеи, гиперемию слизистой оболочки носовой полости, катаральный и даже гнойный конъюнктивит, в тяжелых случаях — затрудненное дыхание, слюнотечение и пневмонию.

У экспериментально зараженных телят штаммами вируса парагриппа-3 обычно развивается лихорадка, появляются кашель, слизисто-гнойное истечение из носовой полости, слезотечение и общее угнетение животных. Бычьи штаммы были выделены от крупного рогатого скота, страдавшего транспортной лихорадкой. Это дает основание полагать, что вирус, обычно безвредный в нормальных условиях содержания, может обусловить заболевание скота при воздействии стрессов.

Патологоанатомические изменения проявляются интерстациальной пневмонией, диффузной гиперемией легких и скоплением слизисто-гнойного экссудата в трахее и бронхах.

ВИРУС

Вирус парагриппа крупного рогатого скота впервые был выделен Рейзингером в 1959 г. Это РНК-содержащий вирус, относится к семейству парамиксовирусов и представлен типовым видом — parainfluenza virus-3. Основной бычий штамм SF-4 выделен от больного крупного рогатого скота. Вирионы округло-овальные с диаметром 110—240 ммк, имеют спиральную симметрию, сердцевина их — 170—180 Å, покрыта белковой оболочкой с многочисленными ворсинками на поверхности. Помимо белка и РНК, в состав вириона входят липиды и полисахариды, поэтому обработка этого вируса эфиром, хлороформом, трипсином и дезоксихолатом натрия ведет к потере инфекционных свойств. Вирус содержит фермент нейраминидазу, максимальная активность которой проявляется при pH 4,5.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Парагриппозные вирусы животных характеризуются относительно низкой устойчивостью во внешней среде. Температура 31—36° губительно действует на

вирионы, находящиеся вне клеток, в вируссодержащих взвесях. Прогревание парагриппозных вирусов при более высокой температуре быстро приводит их к гибели. Для полного или почти полного разрушения инфекционной активности достаточно прогреть вирус при 56° в течение 30 минут. Ультрафиолетовые лучи действуют губительно. Обработка ультразвуком суспензий, содержащих парагриппозные вирусы в течение 10 минут, приводит к дезинтеграции вирусных частиц, что проявляется повышением титра гемагглютинации и их более медленным оседанием.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. При минус 60° вирус можно сохранять в течение нескольких месяцев без существенной потери его активности. Хранить парагриппозные вирусы возможно в замороженном виде при минус 20—30°, однако наблюдается прогрессивное снижение их инфекционности до полной ее утраты, особенно если имеются колебания в температуре холодильника. Многократное замораживание и оттаивание вирусных суспензий приводит к быстрой утрате инфекционности (Смородинцев, 1962). Парагриппозные вирусы можно сохранить и при 4°. Но если хранить их при этой температуре без консерванта, они через 3—4 месяца полностью утрачивают инфекционную активность. Вируссодержащие взвеси парагриппозных вирусов, лиофилизированные даже без добавления каких-либо консервантов, сохраняют свою активность при последующем хранении при 4° в течение 2—4 лет В условиях pH 6,8—7,5 эти вирусы сохраняются лучше; они быстрее инактивируются в кислой среде, чем в щелочной.

Локализация в организме. Вирус парагриппа крупного рогатого скота регулярно обнаруживают в носовой слизи и ткани легких через 2—17 дней после заражения.

Антигенная активность. Вирус обладает выраженной антигенной активностью. Как естественная инфекция, так и искусственная иммунизация сопровождается появлением специфических антител, которые обнаруживаются в реакциях нейтрализации, связывания комплемента и задержки гемагглютинации.

Применяя метод эфирной дезинтеграции, удалось выявить у вируса два типа антигенов, различных по свойствам и специфичности: рибонуклеопротеидный или S-антиген и поверхностный V-антиген. Первый обнаруживается при помощи РСК, второй — в РСК и РГ.

Вирусы, выделенные в разных странах от телят и взрослых животных, по антигенной структуре идентичны и соответствуют прототипному штамму SF-4, выделенному в США Рейзингером в 1959 г.

В антигенном отношении прототипный штамм SF-4 близок вирусу парагриппа-3 человека. Первоначально, на основе данных, полученных Абинанти и Хюбнером (1959) с гипериммунными сыворотками кроликов, считалось, что по антигенной структуре эти вирусы практически идентичны. Однако более поздние исследования (Кетлер и сотр., 1961), проведенные с сыворотками морских свинок, инфицированных интраназально, показали, что при полной общности S-антигенов в РЗГА выявляются количественные и качественные различия V-антигенов, которые достигают $^1/_4$—$^1/_8$ гомологичного титра (Абинанти и др., 1961).

Гемагглютинирующие свойства. Вирус парагриппа крупного рогатого скота сорбируется нативными и формалинизированными эритроцитами морской свинки и лизирует нативные эритроциты кролика и морской свинки. При размножении этого вируса в культурах клеток к 6—8-му дню культивирования в жидкой фракции накапливаются гемагглютинины. Для выявления и титрования их используют 5%-ную взвесь эритроцитов морских свинок. Помимо эритроцитов морской свинки, этот вирус агглютинирует (но в более низком титре) эритроциты кролика, крупного рогатого скота, овцы, буйвола, петуха, цыпленка и не агглютинирует эритроциты лошади и кошки. Спектр гемагглютинирующей активности у разных штаммов неодинаков. Свежевыделенные штаммы лучше агглютинируют эритроциты при 4°, чем при 37°, причем титры гемагглютининов повышаются после обработки вируса ультразвуком. Недостаточно ясно, влияет ли вид ткани, в которой репродуцируется вирус, на проявление его гемагглютинирующих свойств.

Гемадсорбирующие свойства. К соединению с эритроцитами способны не только свободно взвешенные вирионы, но и вирус, еще не полностью освободившийся из клеток. Поэтому инфицированные вирусом ПГ-3 клетки сорбируют эритроциты морской свинки, крупного рогатого скота, овцы, кролика, и белой мыши. Вирус вызывает диффузную адсорбцию эритроцитов в отличие от островковой, свойственной возбудителям гриппа человека, свиней и эпидемического паротита.

Спектр патогенности. В естественных условиях парагриппом болеют телята не старше одного года. Экспериментально удавалось заразить ягнят и поросят. Интраназальное и контактное заражение ягнят сопровождается развитием латентной инфекции и образованием вируснейтрализующих и антигемагглютинирующих антител. Для мышат-сосунов и крольчат вирус не патогенен, однако у молодых хомяков при интраназальном заражении развивается латентная инфекция.

Культивирование вируса в лабораторных условиях. Вирус хорошо развивается в культуре ткани почки теленка, буйвола, козы, крольчонка, собаки, цыпленка, обезьяны и клетках перевиваемых линий HeLa и Нер-2, вызывая цитопатогенные изменения (округление и зернистое перерождение клеток или образование вакуолизированных многоядерных симпластов), не приводящие к деструкции всего слоя инфицированных культур. В клетках HeLa и КВ вирус размножается менее активно, чем в клетках почки теленка. В культуре этих клеток, а также клеток почки обезьяны, помимо синцития, вирус вызывает образование цитоплазматических, а иногда и внутриядерных включений (Чурчилл, 1963).

Вирус парагриппа крупного рогатого скота размножается и в развивающихся куриных эмбрионах, не вызывая видимой патологии, поэтому при первичном выделении его куриные эмбрионы могут быть использованы, однако для доказательства наличия в амниотической жидкости вируса ее испытывают в культуре ткани почки теленка.

Эпизоотические особенности парагриппа крупного рогатого скота. Парагриппозные вирусы человека и парагриппозные вирусы, выделенные от животных, по биологическим свойствам и антигенной структуре сходны, но не идентичны, и поэтому оказалось возможным дифференцировать их между собой. В литературе до сих пор не описаны случаи выделения от естественно инфицированных животных вирусов, идентичных парагриппозным вирусам человека, поэтому можно считать, что парагриппозная инфекция, свойственная человеку, не передается животным в естественных условиях.

Вирус парагриппа крупного рогатого скота впервые был выделен в 1955 г. при респираторных заболеваниях скота и лишь в 1959 г. был идентифицирован Рейзингером и др., которые выделили оригинальный штамм SF-4 от скота, больного транспортной лихорадкой.

В последующие годы было установлено широкое распространение парагриппозной инфекции среди скота в США, Англии и в Скандинавских странах. Вначале считали, что транспортная лихорадка скота является бактериальной болезнью, обусловленной Pasteurella multocida. Но в дальнейшем оказалось, что парагриппозные вирусы могут вызывать заболевание у телят до 6 месяцев, в зависимости от особенностей штамма и степени его пассирования в лабораторных условиях. У зараженных животных через $1^1/_2$—2 дня повышалась температура, появлялись одышка, насморк, кашель, слезотечение, развивалась общая депрессия. Иногда болезнь сопровождалась диареей. Вирусы, описанные ранее как возбудители у телят заболевания слизистых с поносом, также оказались идентичны вирусу парагриппа-3 рогатого скота.

Как и парагрипп людей, вирус парагриппа-3 в естественных условиях передается воздушно-капельным путем, однако описаны случаи выделения его из фекалий больных животных. Чаще парагриппозная инфекция проявляется энзоотически и редко принимает характер эпизоотии. В литературе нет данных о возможности переноса бычьего парагриппа на людей, однако некоторые исследователи считают, что тесное антигенное родство обоих вирусов парагриппа-3 свидетельствует о возможной экологической связи этих болезней.

В настоящее время имеются данные о выделении парагриппозных вирусов типа 3 из молока больных коров в Японии, от людей, страдающих острым катаром верхних дыхательных путей, а также от овец и собак с респираторными признаками болезни. В 1965 г. Фишман обнаружил в 89% случаев антигемагглютинирующие и в 81% случаев нейтрализующие антитела к вирусу парагриппа-3 крупного рогатого скота в сыворотках овец и несколько реже — кошек, а в дальнейшем и в сыворотках диких и домашних животных.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Лабораторная диагностика основана на выявлении специфического антигена в отделяемом носоглотки больного животного (цитологическое исследование), изоляции возбудителя и идентификации его при помощи реакции гемадсорбции и ее торможения, а также реакции задержки гемагглютинации и нейтрализации в культуре ткани и выявлении прироста специфических антител в парных сыворотках при помощи серологических реакций.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Вирус удается выделить из экссудата носовой полости во время подъема температуры тела или же из крови на 4—6-й день после интраназального и на 2-й день после внутривенного заражения. Из ткани легкого вирус выделяют до 17-го дня после заражения. С носовым истечением вирус обычно выделяется со 2-го по 10-й день.

Взятие и подготовка материала. Для выделения вируса используют носовые истечения, которые после взятия эмульгируют в стерильном растворе Хенкса с антибиотиками. Для этого стерильным тампоном протирают заднюю стенку глотки и носовые ходы и эмульгируют тампон в пробирке со средой. В качестве среды используют стерильный раствор Хенкса с добавлением 500—1000 ЕД смеси антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, нистатин). От убитого животного берут кусочки слизистой оболочки носовых раковин, трахеи и легочной ткани. Из проб тканей после однократного замораживания и оттаивания готовят томогенат, которым после центрифугирования, как можно быстрее заражают восприимчивых животных и первичные монослойные культуры почечных клеток эмбриона крупного рогатого скота. Замораживание и хранение материала резко снижают возможность выделения вируса от больного животного. Ввиду малой устойчивости парагриппозного вируса рекомендуется испытуемый материал помещать в контейнер с обычным льдом, немедленно доставлять в лабораторию и сразу же использовать для заражения культур. Если сделать это невозможно, нужно материал заморозить в смеси сухого льда и спирта, а затем хранить при минус 60°, минус 20° до момента исследования (Л. Я. Закстельская, М. А. Яхно, 1968).

Экспериментально заражать восприимчивых животных вирусом парагриппа-3 лучше нанесением его на слизистую оболочку носовой полости и трахеи. У телят, зараженных вирусом парагриппа-3 бычьего типа, наблюдаются повышение температуры тела, одышка, слизисто-гнойные истечения из носовой полости, слезотечение, кашель, угнетенное состояние, продолжающееся до 14 дней. У ягнят, зараженных интраназально вирусом этого же типа, также отмечается повышение температуры тела, затрудненное дыхание. У лактирующих коров после введения вируса в одну из долей вымени наблюдаются лихорадка, диарея, лейкопения, симптомы поражения респираторного тракта. В инфицированной доле вымени развивается мастит. У всех животных, перенесших экспериментальную инфекцию, в сыворотке крови появляются вируснейтрализующие и антигемагглютинирующие антитела, легко обнаруживаемые с помощью РТГА и РН.

Заражение культуры ткани. Для выявления вируса парагриппа наиболее пригодны первичные трипсинизированные культуры ткани почки эмбриона рогатого скота, почки взрослого крупного рогатого скота, почки эмбриона буйвола, верблюда, коз, овец, собак, обезьян и других животных. Все культуры готовят общепринятым методом. Перед заражением ткань следует 3 раза отмыть от сыворотки раствором Хенкса. При заражении на ткань на 20—30 минут наносят инфицирующий материал по 0,2 мл на пробирку. После заражения культуру заливают средой 199, или 0,5%-ным раствором лактальбумина без сыворотки или с добавлением 2—3% сыворотки телят. Зараженную культуру инкубируют при 33—36° 7—8 дней для перевиваемых линий, 15—18 дней — для первичнотрипсинизированных культур. Каждые пять дней пробирки просматривают, отмечают цитопатические изменения и ставят тест гемадсорбции с 0,5%-ной взвесью эритроцитов морских свинок. Если тест положительный, то пробирку вскрывают и содержимое ее используют для следующего пассажа. При отрицательном тесте среду с эритроцитами сливают и заменяют новой. Как только появляется четкая гемадсорбция на ткани, следующий пассаж делают разведенным в отношении 1 : 5, 1 : 10 материалом и заражают 12—15 пробирок, из которых 10 используют для предварительного титрования выделяющегося агента по тесту задержки гемадсорбции.

Выделение на куриных эмбрионах. Испытуемый вируссодержащий материал вводят в амниотическую полость куриных эмбрионов. В первых пассажах эмбрионы, как правило, от вируса не погибают, наличие возбудителя в амниотической жидкости инфицированных эмбрионов устанавливают при помощи двух тестов: реакции гемагглютинации с эритроцитами морской свинки и заражением культуры ткани почки эмбриона крупного рогатого скота с учетом цитопатических изменений и положительной пробы гемадсорбции.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Иммунофлуоресценция. Вирус парагриппа созревает на поверхности клетки и сравнительно медленно освобождается от нее, поэтому отторгаемые в ходе воспалительного процесса клетки эпителиальной выстилки носовых ходов и ротоносоглотки больного животного, как правило, содержат специфический вирусный антиген и зрелые вирионы.

Для выявления специфического антигена в отторгнутых клетках выстилки верхних дыхательных путей используют метод иммунофлуоресценции. Материал берут от больного животного посредством отпечатков с носовых раковин специальным стеклом или посредством стерильного ватного тампона, которым энергично протирают заднюю стенку носоглотки и затем делают мазок на обезжиренном предметном стекле. Можно использовать и обычные носоглоточные смывы, полученные для вирусологических исследований. В этом случае клетки, содержащиеся в смыве, осаждают центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 минут, а из осадка делают мазок на обезжиренном предметном стекле (Е. С. Кетиладзе, 1965). Мазки с клетками высушивают на воздухе, затем фиксируют и окрашивают мечеными антисыворотками по прямому или непрямому методу иммунофлуоресценции, а затем просматривают в микроскопе МЛ-2, лампа ДРШ-250 с сине-фиолетовым освещением.

Обычно от одного больного животного делают 8—10 мазков, из которых половину красят противопарагриппозными сыворотками, а остальные используют для контроля и окраски другими мечеными сыворотками (например, противогриппозными). При парагриппозной инфекции свечение антигена в клетках мазка наблюдается только на стеклах, обработанных противопарагриппозными сыворотками. Как правило, антиген обнаруживается в цитоплазме клеток.

Серологическая идентификация

Для идентификации штаммов вируса парагриппа крупного рогатого скота следует применить реакцию нейтрализации вируса иммунными сыворотками (на культуре ткани почки эмбриона крупного рогатого скота), реакцию задержки гемадсорбции, а также реакцию торможения гемагглютинации. Для этого используют специфические иммуносыворотки кроликов, крыс и морских свинок. У них удается получить титры антигемагглютининов и вирусонейтрализующих антител в пределах 1 : 80—1 : 1280. После внутримышечной иммунизации смесью тканевого ланолиново-вазелинового стимулятора иммунизацию проводят двукратно с интервалом в три недели и последующим взятием пробы крови еще через две недели. Ланолиново-вазелиновую эмульсию готовят растиранием в ступке 1 части ланолина и 9 частей вазелинового масла до

получения однородной гомогенной массы. Затем в пробирке смешивают взятые в равных количествах антиген и ланолиново-вазелиновую эмульсию, закрывают резиновой пробкой и встряхивают до получения кремообразной массы. Антигены готовят непосредственно перед иммунизацией животных. Для того чтобы эмульсия не густела, пробирки с антигенами помещают в водяную баню при температуре 37—38° (А. А. Смородинцев, 1965).

Реакция гемадсорбции. В пробирки с испытуемой клеточной культурой добавляют 0,2 мл 0,5%-ной взвеси стерильно взятых и стерильно отмытых эритроцитов морской свинки. Пробирки выдерживают 20 минут при комнатной температуре в горизонтальном положении клеточным слоем вниз. После этого пробирки слегка вращают, чтобы смыть осевшие на слое эритроциты, и просматривают под микроскопом.

При положительной реакции гемадсорбции поверхность зараженных клеток усыпана плотно прикрепившимися неподвижными эритроцитами, тогда как в незараженных культурах эритроциты остаются во взвешенном состоянии и медленно проплывают в поле зрения.

Характерным для парагриппозных вирусов является диффузный характер реакции гемадсорбции, тогда как вирус гриппа дает островковый тип гемадсорбции — на отдельных участках клеточного слоя. Реакцию гемадсорбции наблюдают через 4—6 часов после заражения культур до появления видимых цитопатических изменений. При обнаружении положительной гемадсорбции сразу проводят пассаж вируса, так как при первичном заражении клеток вирусом парагриппа-3 цитопатические изменения часто не развиваются. В качестве материала для пассажа используют культуральную жидкость или суспендированный в ней детрит инфицированных клеток, замороженных при минус 70° и оттаянных. Для пассажей инфицированные клетки отслаивают от стекла пастеровской пипеткой и вместе с культуральной жидкостью вносят в объеме 0,2 мл в свежие культуры клеток. При отсутствии гемадсорбции в культурах клеток 5-го пассажа результат исследования считают отрицательным. При отрицательном результате гемадсорбции в первом пассаже испытуемого материала пробы с культурой ткани должны находиться под наблюдением не менее 20 дней. В этом случае реакцию гемадсорбции ставят каждые пять дней при частичной или полной смене поддерживающей среды после второй постановки реакции.

По реакции гемадсорбции вирус парагриппа можно титровать в культуре ткани, используя для заражения культуры последовательные десятикратные разведения вируса. За титр, равный одной гемадсорбирующей единице, принимают конечное разведение вируса, вызвавшее гемадсорбцию.

Вирус парагриппа штамм SF-4 вызывает в растущей культуре клеток почки эмбриона крупного рогатого скота выраженные цитопатические изменения в виде образования мелких округлых клеток

в отдельных участках клеточного пласта. Специфичность таких изменений может быть подтверждена реакцией гемадсорбции (А. А. Смородинцев, 1965).

Реакцию торможения гемадсорбции ставят с эритроцитами морской свинки, она строго специфична. Для этого в 15 пробирок с культурой клеток почки эмбриона крупного рогатого скота вносят по 0,2 мл материала, давшего в предыдущем пассаже положительную реакцию гемадсорбции, добавляют по 1 мл поддерживающей среды 199 и инкубируют в термостате при 37°. Через 5 дней из пробирок удаляют питательную среду, клетки отмывают раствором Хенкса и вносят в каждые три пробирки по 0,2 мл гипериммунной сыворотки морской свинки в разведении 1 : 10 и по 0,6 мл раствора Хенкса. В три контрольные пробирки наливают по 0,8 мл раствора Хенкса. Пробирки оставляют на 20 минут при комнатной температуре в наклонном положении для контакта клеток с антителами. Затем во все пробирки наливают по 0,2 мл 0,5%-ной суспензии эритроцитов морской свинки. После 30-минутной экспозиции при 22° учитывают реакцию гемадсорбции, которая отсутствует в тех пробирках, где вирус нейтрализован специфической сывороткой.

Реакция нейтрализации в культуре ткани. Для реакции нейтрализации используют 100 гемадсорбирующих единиц вируса, т. е. вирус разводят до концентрации, превышающей его титр в 100 раз; 0,2 мл вируссодержащей жидкости соединяют с 0,2 мл специфической иммунной сыворотки (например, SF-4) в разведениях 1 : 4—1 : 8 (при титре 1 : 16—1 : 32). После 2-часового контакта при комнатной температуре берут по 0,2 мл смеси, наливают в четыре пробирки с культурой ткани, добавляют поддерживающую среду 199 или 0,5% гидролизата лактальбумина и инкубируют в наклонном положении при 37°. Контролем вируса служат пробирки с культурой ткани, куда была внесена взвесь избранного разведения вируса с равным объемом питательной среды.

Через 4—5 дней во все пробирки вносят по 0,2 мл 0,5% суспензии эритроцитов морской свинки и регистрируют под микроскопом наличие или отсутствие в пробирках гемадсорбции. При положительной реакции гемадсорбции в контрольных пробирках отсутствие реакции в пробирках со смесью вируса и сыворотки свидетельствует об идентичности выделенного вируса данному типу сыворотки (SF-4) (А. А. Смородинцев, 1965).

Реакция гемагглютинации. Для выявления гемагглютининов вируса парагриппа крупного рогатого скота в культуре клеток, зараженной испытуемым материалом, данную реакцию ставят с эритроцитами морской свинки. С этой целью испытуемую культуральную жидкость разводят 1 : 2, 1 : 4 до 1 : 32 в объеме 0,4 мл, после чего к каждому разведению добавляют по одной капле 5%-ной взвеси эритроцитов, полученных из трехкратно отмытого и осажденного при 2000 об/мин осадка цитратной крови. Реакцию учитывают через 1—2 часа при комнатной температуре после осаж-

дения эритроцитов в контрольных лунках. Наивысшее разведение материала, которое вызывает агглютинацию эритроцитов в виде «зонтика», принимают за одну гемагглютинирующую единицу (АЕ). Следует иметь в виду, что вирус парагриппа образует гемагглютинин низкого титра (1 : 8—1 : 16) и в поздних сроках культивирования.

Реакцию торможения гемагглютинации применяют для типирования выделенного вируса при наличии в жидкой фракции зараженных культур клеток гемагглютинина в титре, достаточном для выбора четырех гемагглютинирующих единиц. Сыворотки кроликов, морских свинок, крыс и мышей необходимо освобождать от неспецифических термостабильных ингибиторов обработкой каолином или фильтратом холерного вибриона. Сыворотки овец не содержат ингибиторов при постановке РТГА с эритроцитами морских свинок.

Перед постановкой реакции специфическую сыворотку смешивают в равном объеме с 25%-ной суспензией каолина, энергично встряхивают 20 минут и центрифугируют для осаждения каолина при 2000 об/мин в течение 10 минут. Центрифугированную сыворотку прогревают в течение 30 минут в водяной бане при 56° и двукратно разводят от 1 : 10 до 1 : 1280.

В реакции соединяют четыре гемагглютинирующие единицы вируса в объеме 0,2 мл с равным объемом иммунной сыворотки третьего типа. После часового контакта при комнатной температуре к этим смесям добавляют каплю (0,05 мл) 5%-ной суспензии эритроцитов морской свинки. Реакцию учитывают после оседания контроля эритроцитов.

Приготовление рабочей дозы антигена. Непосредственно перед РТГА проверяют рабочую дозу антигена. Титр антигена делят на 8; полученная цифра указывает, во сколько раз нужно развести антиген, чтобы в 0,2 мл содержалось 4 АЕ. Например: титр антигена в 0,4 мл 1 : 64, 64 : 8=8; следовательно, антиген нужно развести в 8 раз, т. е. к 1 мл его добавить 7 мл физиологического раствора. Правильность приготовления рабочей дозы можно проверить. Для этого в четыре лунки наливают по 0,2 мл физиологического раствора. В первую лунку вносят 0,2 мл рабочей дозы антигена, смешивают и переносят в следующую 0,2 мл и т. д. Из четвертой лунки 0,2 мл выбрасывают. Во все лунки добавляют по 0,2 мл физиологического раствора и по 0,05 мл 5%-ной суспензии эритроцитов морской свинки. Смесь встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 1—1,5 часа (до оседания эритроцитов в контроле), после чего учитывают реакцию. В первой и во второй лунках должна быть полная агглютинация (зонтик ++++), а в третьей и четвертой лунках агглютинации не должно быть (колечки −). Особенно важно, чтобы во второй лунке, где содержится 1 АЕ, была полная агглютинация.

СЕРОДИАГНОСТИКА И РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

При серологической диагностике парагриппа крупного рогатого скота обследуют парные сыворотки телят или взрослых животных для выявления прироста антител в реконвалесцентной сыворотке по сравнению с сывороткой, взятой в начале заболевания (не позднее 4—5 дня). Интервал между исследованиями — 2—3 недели. Для этого можно применять РТГА или реакцию нейтрализации гемадсорбции (РНГ) в культуре ткани. РТГА менее трудоемка, не требует

большого количества культур тканей, необходимых для РНГ, и позволяет обследовать значительное число парных сывороток.

Реакция торможения гемагглютинации с полевыми сыворотками. Для постановки данной реакции требуются: испытуемые парные пробы сыворотки крупного рогатого скота, взятые в начале болезни и через 14—21 день; твин-эфирный или формалинизированный антиген вируса парагриппа крупного рогатого скота *, забуференный физиологический раствор поваренной соли pH 7,2; панели из плексигласа; 25%-ная суспензия каолина на физиологическом растворе; 5%-ная суспензия эритроцитов морской свинки, полученная из трижды отмытой цитратной крови; 10%-ная суспензия эритроцитов морской свинки, полученная аналогичным способом.

Для удаления неспецифических ингибиторов и гемагглютининов испытуемые сыворотки крупного рогатого скота обрабатывают эритроцитами морской свинки, каолином и прогревают. Для этого сыворотку смешивают с 10%-ной суспензией эритроцитов морской свинки в соотношении 1 : 5. После 30-минутной инкубации при 4° смесь центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 минут и к надосадочной части добавляют в равном объеме 25%-ную суспензию каолина, встряхивают 20 минут и центрифугируют при 2000 об/мин в течение 10 минут. Центрифугированную сыворотку прогревают в течение 30 минут при 56° и двукратно разводят от 1 : 20 до 1 : 1280 **. Далее к 0,2 мл каждого разведения сыворотки добавляют 0,2 мл твин-эфирного или формалинизированного антигена, содержащего четыре гемагглютинирующие единицы. Смесь выдерживают один час при комнатной температуре, после чего к ней добавляют по одной капле (0,05 мл) 5%-ную взвесь эритроцитов морской свинки. Компоненты реакции смешивают и оставляют при комнатной температуре на 1 час до полного оседания эритроцитов.

Диагностически достоверным приростом антител в пробах парных сывороток считается четырехкратное и выше увеличение титра их во вторых пробах, взятых через 14—21 день после начала заболевания.

Реакция торможения гемадсорбции. Прогретые сыворотки крупного рогатого скота двукратно разводят средой 199. Затем каждое разведение сыворотки соединяют с равным объемом вируса парагриппа, SF-4 в разведении, содержащем 100 гемадсорбирующих единиц. После 2-часового контакта при 22° каждую смесь в объеме 0,2 мл вносят в три пробирки с культурой клеток, почки эмбриона крупного рогатого скота и добавляют по 1 мл поддерживающей среды 199 или 0,5%-ного раствора гидролизата лактальбумина на растворе Хенкса. Пробирки инкубируют в наклонном положении при 37° в течение 5 суток и добавляют в каждую пробирку 0,2 мл 0,5%-ной суспензии эритроцитов морской свинки. При положительной реакции гемадсорбции в контролях вируса учитывают ее отсутствие в пробирках, куда была залита смесь того или иного разведения сыворотки и вируса. Диагностическим является не менее чем четырехкратный прирост тормозящих гемадсорбцию антител в реконвалесцентной сыворотке по сравнению с сывороткой, взятой в начале болезни (Смородинцев, 1965).

ИЗГОТОВЛЕНИЕ И КОНТРОЛЬ ДИАГНОСТИКУМОВ

Диагностикумы (антигены и сыворотки) используют для проведения серологических исследований: идентификации и титрования выделенного вируса, обнаружения титра антител в острый период течения инфекции, прироста антител у реконвалесцентов, определения масштабов распространения парагриппозной инфекции.

Диагностикумами являются: *твин-эфирный* или *формалинизированный антиген* — препарат убитого вируса, обладающий более высокой гемагглютинирующей активностью, специфичностью и сохраняемостью, чем нативный вирус;

* Изготовление и контроль диагностикумов (антигенов и сывороток) парагриппа крупного рогатого скота изложены на странице 126.

** Сыворотку крови, взятую в период острого переболевания, разводят от 1 : 10 до 1 : 80—1 : 160.

специфические сыворотки морских свинок и кроликов, гипериммунизированных штаммом SF-4.

Получение типоспецифических сывороток (на штамм SF-4). Типоспецифические сыворотки необходимы для серологической идентификации выделенного агента в реакциях нейтрализации в культуре ткани, торможения гемагглютинации и нейтрализации гемадсорбции. Сыворотки получают от морских свинок и кроликов гипериммунизацией их «культуральным» или «эмбриональным» вирусодержащим материалом по следующей схеме.

Приготовление материала для гипериммунизации. В качестве антигена для иммунизации животных используют вирус парагриппа-3, выращенный в культуре ткани почки эмбриона крупного рогатого скота. В период проявления максимального цитопатического эффекта вируссодержащую культуру ткани трехкратно замораживают и оттаивают, центрифугируют 30 минут при 3000 об/мин, надосадочную жидкость используют в качестве антигена.

Схема гипериммунизации и обработка сывороток. Кролику под легким наркозом вводят через нос 0,5 мл высокоинфекционного вируса (штамм SF-4). Инфекционный титр его должен быть не ниже $10^{7,5}$ $ТЦД_{50}$ (0,2 мл). Через 10 дней тому же животному вводят внутрибрюшинно 2 мл того же вируса. Внутрибрюшинную иммунизацию проводят 3 раза с недельным интервалом. Через 10 дней после последней инъекции у кроликов берут по 1—2 мл крови из ушной вены и при наличии в ней в высоком титре антигемагглютининов кролика обескровливают. При низком титре антител через месяц проводят второй цикл иммунизации. Полученные после иммунизации сыворотки прогревают при 60° в течение 30 минут и хранят при минус 20° (или 4° не больше недели) или высушивают.

Для получения иммунных сывороток против парагриппа-3 можно использовать также морских свинок. Первую иммунизацию проводят через нос под легким наркозом в объеме 0,2 мл вируссодержащего материала, имеющего титр не ниже 10^7 $ТЦД_{50}$/0,2 мл. Через 10 дней той же морской свинке вводят внутрибрюшинно 1 мл культурального вируса. Инъекцию повторяют 3 раза с недельным интервалом. Через 10 дней после последней иммунизации берут 1 мл крови из сердца. При высоком титре антител морскую свинку обескровливают; при недостаточно высоком титре проводят второй цикл иммунизации после месячного перерыва.

Титр антител в сыворотках кроликов и морских свинок, иммунизированных по приведенной схеме, обычно бывает не ниже 1 : 320—1 : 640 (в реакции задержки гемагглютинации).

Перед постановкой реакции задержки гемагглютинации сыворотки кролика прогревают при 60° в течение 30 минут, а сыворотки морских свинок — при 56° в течение того же срока в разведении 1 : 10 на физиологическом растворе для удаления термолабильных ингибиторов. После этого сыворотки обрабатывают каолином (25%-ной суспензией в физиологическом растворе) для удаления термостабильных ингибиторов.

После обработки гипериммунные сыворотки проверяют на специфическую активность в РТГА по следующей методике.

Рабочую дозу вируса по 0,2 мл смешивают с 0,2 мл сыворотки, взятой в различных разведениях, начиная с 1 : 10 до 1 : 1280. После инкубации смеси в лунках в течение 1 часа при комнатной температуре или 18 часов при 4° в них добавляют по 0,05 мл 5%-ную суспензию эритроцитов морской свинки. Взвесь встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 1—$1^1/_2$ часа, после чего учитывают реакцию.

При постановке реакции нужны следующие контроли: контроль каждой испытуемой сыворотки (0,4 мл наименьшего разведения сыворотки+0,05 мл 5%-ной суспензии эритроцитов морской свинки); контроль эритроцитов (0,05 мл 5%-ной суспензии эритроцитов морской свинки+0,4 мл физиологического раствора). За титр сыворотки принимают наивысшее разведение ее, в котором отмечается полное торможение реакции гемагглютинации.

Получение гемагглютинирующих антигенов. Парагриппозные диагностикумы представляют собой инактивированные формалином (1 : 2000), очищенные

и концентрированные в 3%-ном растворе поваренной соли или обработанные твином-80 и эфиром препараты парагриппозных штаммов третьего типа. Диагностикумы применяются для обнаружения специфических антител (антигемагглютининов) при помощи РТГА в сыворотках переболевших животных при ретроспективной диагностике. Для приготовления диагностикума используют штаммы, имеющие инфекционный титр из тканевой культуры клеток почки эмбриона крупного рогатого скота не ниже 10^9—10^6 $ТЦД_{50}$/0,2 и накапливающие свободные гемагглютинины в той же культуре ткани не ниже 1 : 4—1 : 8.

Получение формалинизированного антигена. Формалинизированный антиген готовят из культурального вируса в концентрированном и очищенном виде. Вирус очищают методом адсорбции на формалинизированных эритроцитах морской свинки с последующей элюцией в 3%-ном растворе поваренной соли.

Приготовление формалинизированных эритроцитов морской свинки. Кровь, взятую из сердца морской свинки, смешивают со стерильным 5%-ным раствором лимоннокислого натрия в соотношении 20 : 1. Эритроциты трижды отмывают стерильным физиологическим раствором. Отмытый плотный осадок эритроцитов смешивают в равном объеме с 50%-ным раствором продажного формалина. Смесь тщательно встряхивают и оставляют на 48 часов при комнатной температуре. Затем формалинизированные эритроциты отмывают 6 раз десятикратным объемом физиологического раствора и к отмытому осадку добавляют в равном объеме физиологический раствор, содержащий формалин 1 : 1000. Смесь тщательно встряхивают для получения равномерной взвеси и хранят при 4° не более 6—7 месяцев.

Адсорбция вируса на формалинизированных эритроцитах и элюция с них. Культуральную жидкость, содержащую парагриппозные гемагглютинины, смешивают с формалинизированными эритроцитами в соотношении 10 : 1. Смесь помещают на 2 часа при 4° (можно на ночь) для адсорбции вируса на эритроцитах. Затем взвесь центрифугируют 5 минут при 2000 об/мин, надосадочную жидкость удаляют и проверяют на полноту адсорбции в РГА. Осадок эритроцитов отмывают один раз холодным физиологическим раствором. Затем к отмытым эритроцитам добавляют 3%-ный раствор поваренной соли в объеме, в 5 раз меньшем, чем исходная вируссодержащая жидкость, и смесь помещают в водяную баню при 37° для элюции гемагглютининов (1—1½ часа).

Через 1—1½ часа смесь центрифугируют при 1000—1500 об/мин 5—7 минут, надосадочную жидкость (элюат № 1) отсасывают и проверяют на содержание гемагглютининов в РГА. Осадок эритроцитов заливают второй порцией 3%-ного раствора поваренной соли в том же объеме и снова помещают в водяную баню для повторной элюции. При наличии во втором элюате титра гемагглютининов 1 : 64 и выше проводят дальнейшие элюции до тех пор, пока титр элюата не снизится до 1 : 16. При необходимости третьего и последующих циклов элюции их проводят на следующий день, при этом формалинизированные эритроциты, залитые очередной порцией 3%-ного раствора поваренной соли, оставляют на ночь при температуре 4°.

Составление серии антигена. Порции элюата, содержащие гемагглютинины до титра 1 : 64 (включительно), объединяют, титруют и при наличии в смыве титра 1 : 256 и выше, разводят 3%-ным раствором поваренной соли до титра 1 : 128, который является оптимальным при хранении и в работе. Если после объединения элюатов общий титр равняется 1 : 128 или 1 : 64, материал не нужно разводить дальше. Элюаты с титром 1 : 16 и ниже можно использовать в качестве разбавителей элюатов, имеющих титры выше, чем 1 : 128.

Для стабилизации и полной инактивации вируса в очищенный препарат добавляют формалин из расчета 1 : 2000 и выдерживают при 4° пять суток, после чего контролируют на отсутствие нежизнеспособного вируса, бактериальное загрязнение, титр гемагглютининов и антигенную специфичность.

Получение гемагглютинирующего антигена обработкой вируса твином-80 и эфиром. Вируссодержащий материал с титром гемагглютининов не ниже 1 : 4 собирают в колбу, добавляют твин-80 в конечной концентрации 0,125% (твин предварительно разводят дистиллированной водой 1 : 10) и встряхивают в течение 5 минут, чтобы обеспечить равномерное перемешивание твина с обраба-

тываемым материалом. Затем добавляют эфир в половине объема, взятого для обработки материала. Смесь вируссодержащего материала, твина-80 и эфира ставят при 4° и встряхивают периодически в течение 15—20 минут. Затем смесь центрифугируют 20—30 минут при 3000 об/мин и осторожно отделяют нижний слой от эфира. Одновременно для контроля обрабатывают тем же методом культуральную жидкость, снятую с контрольных, неинфицированных клеток.

Полученный после обработки гемагглютинирующий антиген помещают в колбу, неплотно закрывают рыхлой ватной пробкой и выдерживают сутки при комнатной температуре (18—20°) для удаления остатков эфира. Затем антиген разливают и лиофилизируют.

Диагностикумы РТГА применяют с эритроцитами морской свинки в объеме 0,8 мл по следующей методике.

Ингредиенты: физиологический раствор pH 7,2, эритроциты морской свинки, раствор каолина 25%-ной концентрации, испытуемые сыворотки, диагностикум (антиген). Реакцию ставят в пластмассовых панелях с лунками.

Обработка сывороток. Для удаления неспецифических ингибиторов используемые сыворотки крупного рогатого скота и овец обрабатывают эритроцитами морской свинки и каолином. Для этого испытуемую сыворотку смешивают с 10%-ной суспензией эритроцитов морской свинки в соотношении 1 : 15. После 30-минутной инкубации при 4° С смесь центрифугируют и к надосадочной жидкости добавляют в равном объеме 25%-ный раствор каолина на физиологическом растворе. Смесь встряхивают в шуттеле 20 минут и центрифугируют 2 раза по 5 минут при 2000 об/мин. Надосадочная жидкость представляет собой сыворотку, разведенную 1 : 10, из которой готовят последующие разведения с коэффициентом 2.

Титрование антигена. В лунки панелей или пробирки наливают по 0,4 мл физиологического раствора. В первую лунку вносят 0,4 мл диагностикума и после перемешивания переносят по 0,4 мл последовательно в 10—12 лунок. Одновременно ставят контроль эритроцитов, для чего в одну из пустых лунок наливают 0,4 мл физиологического раствора +0,05 мл 5%-ной суспензии эритроцитов морской свинки. После встряхивания панелей смесь оставляют при комнатной температуре. Учет реакции проводят через 1—1½ часа (после оседания эритроцитов в контроле). Наивысшее разведение антигена, в котором отмечается полная гемагглютинация (зонтик), содержит одну гемагглютинирующую единицу (АЕ) и принимается за титр антигена. Срок годности парагриппозного диагностикума 12 месяцев. Жидкие диагностикумы сохраняют при температуре 4°.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

Серологическая оценка поствакцинального иммунитета не разработана, так как вакцинация животных против парагриппа еще не вышла из рамок эксперимента и полевых опытов.

АДЕНОВИРУСНАЯ ИНФЕКЦИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Аденовирусная болезнь телят характеризуется поражением органов дыхания, кишечника, глаз и лимфоидной ткани. У большинства взрослых животных она протекает латентно.

Аденовирусные болезни свойственны человеку, обезьянам, крупному рогатому скоту, крысам, мышам, овцам, лошадям, собакам и птицам, причем типы бычьих аденовирусов непатогенны для человека, а свойственные человеку непатогенны для крупного рогатого скота.

Показано, что аденовирусы как бы помогают размножаться вирусам другой группы. Они склонны к гибридизации как в естественных, так и в искусственных условиях.

Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота зарегистрирована в СССР Англии, США, Венгрии, Голландии, Канаде, Австралии, Болгарии. Аденовирусы вызывают гриппоподобные болезни телят, носящие характер острых катаров дыхательных путей, диагностируемых как бронхопневмонии, а иногда — как энтерит или пневмоэнтерит. Помимо того, крупный рогатый скот часто является носителем латентных аденовирусов, вызывающих бессимптомную инфекцию, патогенез и роль которой в общей патологии животных не ясна. Болезнь может быстро распространяться среди телят или поражать отдельные группы животных по мере рождаемости или поступления в хозяйство. Наиболее восприимчивы телята в 2—3-недельном возрасте. Взрослые животные заболевают реже. Болезнь характеризуется повышением температуры тела до 41°, затрудненным дыханием, кашлем, истечением из носа и глаз, иногда появляются поносы.

Аденовирусная инфекция может проявляться в виде лихорадки с длительными катаральными явлениями. Кроме пневмонии, наблюдается гиперплазия регионарных лимфатических узлов. Наиболее часто воспалительный процесс локализуется в верхних дыхательных путях. Отсюда вирус по бронхам проникает в нижние отделы органов дыхания, вызывая атипичные пневмонии. Иногда аденовирусные болезни протекают с симптомами поражения кишечника (аденовирусная диарея). В кишечнике вирус размножается в течение 8—10 дней. При вскрытии павших животных обнаруживают пневмонии и энтерит.

Установлено широкое латентное носительство аденовирусов клинически здоровыми животными (В. П. Шичкина, Э. Р. Пилле и С. Г. Дзагуров, 1971).

ВИРУС

По классификации В. М. Жданова и С. Я. Гайдамович (1962), аденовирусы отнесены к типу Ienneria, порядку Adenoxenales, семейству Adenoxenaceae, роду Adenoxenus.

По классификации Перейра и др. (1963) группа аденовирусов в соответствии с естественными хозяевами делится на подгруппы, которые на основании типоспецифических, серологических реакций, в свою очередь, делятся на типы. Каждый тип представлен определенным изученным эталонным штаммом.

Диаметр вирионов 70—90 ммк; вирион состоит из центрального ядра, содержащего ДНК, и капсида, не имеющего наружной мембраны. Капсид представляет двадцатигранник кубической симметрии, содержит 252 капсомера.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Аденовирусы крупного рогатого скота довольно устойчивы к физико-химическим воздействиям, к трипсину, эфиру и хлороформу. При температуре 60° титры культуральных штаммов ТНТ и ТНВ снижались с 10^9 до 1 $ТЦД_{50}$ за 5 минут (Барта, Алдаси, 1964), а в течение 10 минт полностью утрачивали инфекционные свойства. Штамм 671130 шестого типа проявлял устойчивость к температуре 50° в течение часа, но полностью инактивировался при 56° в течение 30 минут (Рондвиз, 1968). При этой же температуре полностью инактивировались штаммы Bovine-10, Bovine-19 и WBR-1 (1, 2 и 3-го серотипов), тогда как штаммы 4, 5 и 6-го серотипов (ТНТ/62, В4/65 и 671130) в этих условиях лишь незначительно снижали свою активность. При pH 3,0—9,0 аденовирусы крупного рогатого скота сохраняют активность в течение 3 часов. Они разрушаются от воздействия 5%-ным раствором фенола за 10 минут, 1%-ным раствором хлорамина и 3%-ным раствором перекиси водорода за 15—30 минут. Полностью инактивируются ультрафиолетовыми лучами за 30—60 минут.

Хранение и консервирование вирусосодержащего материала. Аденовирусы могут длительно храниться при минус 30°; при 4° их можно хранить более полугода; при комнатной температуре — 1—4 месяца и при 36° — 15—60 дней. Они устойчивы к повторному замораживанию и оттаиванию, хорошо сохраняются при pH 6,0—9,0.

Аденовирусы вызывают своеобразное цитопатогенное действие в культурах клеток почки и тестикул эмбриона крупного рогатого скота, обладают эпителиотропизмом, размножаются в ядре, образуют базофильные внутриядерные включения и кристаллоподобные структуры, имеют общий комплементсвязывающий антиген, устойчивы к эфиру, непатогенны для лабораторных животных, не размножаются в куриных эмбрионах (Р. С. Дрейзен, 1965).

Локализация в организме. Аденовирусы локализуются в легких, в желудочно-кишечном тракте, в почках, в селезенке, бронхиальном экссудате, в смывах носовой полости, конъюнктиве глаз, в фарингеальных лимфатических узлах.

Антигенная структура. В препаратах вируса, очищенных методами электрофореза и фракционирования хроматографией на ДЭАЭ — целлюлозных колонках, кроме инфекционного вируса, обнаружены три растворимых антигена: А, В и С. Антиген А группоспецифичен, т. е. вступает в связь с гомологичной и гетерологичной сыворотками; В — белковый компонент, токсический фактор, ответственный за ранний цитопатический эффект; антиген С — типоспецифичен, т. е. реагирует только с гомологичной сывороткой.

ТАБЛИЦА 1

Эталонные штаммы аденовирусов крупного рогатого скота

Серотипы	Наименование штамма	Выделен из материала	Автор, год выделения
1-й	Bovine-10	Фекалии клинически здоровой коровы	Клейн с сотр., 1959 (США)
	WBR-50	Носовые смывы больного пневмонией теленка	Дербишер, 1968 (Англия)
2-й	Bovine-19	Фекалии клинически здорового теленка	Клейн и сотр., 1960 (США)
3-й	WBR-1	Конъюнктива клинически здоровой коровы	Дербишер с сотр., 1965 (Англия)
4-й	ТНТ/62	Легкие теленка, павшего с клинической картиной энтерита	Барта и Алдаси, 1964 (Венгрия)
5-й	В4/65	Фекалии теленка с симптомами энтерита	Барта и Алдаси, 1964 (Венгрия)
6-й	671130	Клетки первичной тестикулярной ткани телят	Рондвиз, 1968 (Голландия)

Антигенная вариабельность. От человека выделено 32 серотипа, не вызывающих перекрестного иммунитета. Все они имеют общий комплементсвязывающий компонент. Аденовирусы обезьян включают 19, свиней — 4, собак — 2, птиц — 9, крупного рогатого скота — 6 серотипов (табл. 1).

В 1965 г. Дербишер выделил аденовирус из первичной культуры клеток почки телят. По антигенным свойствам он отличался от первого и второго типов аденовирусов крупного рогатого скота и был отнесен к третьему типу.

А. Барта и И. Алдаси (1966) показали, что в Венгрии из 20 полевых штаммов аденовирусов телят три принадлежали к пятому серотипу и 17 — к четвертому серотипу. Первые три серотипа выделены в США и Англии. Все они различаются между собой в реакции нейтрализации, но имеют общий комплементсвязывающий антиген.

Вопрос об антигенном родстве аденовирусов человека с аденовирусами крупного рогатого скота до конца не выяснен. Все 32 серотипа аденовирусов человека обладают общим комплементсвязывающим антигеном, имеющим близкое родство с комплементсвязывающим антигеном первой подгруппы аденовирусов крупного рогатого скота.

В литературе имеются сообщения о присутствии в сыворотках крупного рогатого скота нейтрализующих антител ко многим серотипам аденовирусов человека (Голд и Гинсберг*). Клейн, Зеллат и др. (1960) выделили от крупного рогатого скота штамм (Bovine-19), который имел антигенное сходство с аденовирусами человека с 1-го по 7-й серотип, обладал гемагглютинирующими свойствами с эритроцитами крыс и мышей. Кроме того, этот штамм, так же как и аденовирусы крупного рогатого скота, не способен размножаться в клетках HeLa и клетках почки обезьян.

Обычно аденовирусы, выделенные от крупного рогатого скота, классифицируются отдельно, хотя они имеют общий растворимый антиген с вирусами, выделенными от человека (кроме аденовируса птиц). Основанием для выделения их в отдельную группу служит то, что до сих пор не доказана патогенная роль аденовирусов, выделенных от животных, для человека. Можно предположить, что аденовирусы людей и животных имеют общее происхождение (Р. С. Дрейзин, В. М. Жданов, 1962).

Антигенные свойства. В сыворотках крови иммунизированных и переболевших животных обнаруживаются антитела: комплементфиксирующие, преципитирующие, вируснейтрализующие и тормозящие реакцию гемагглютинации (антигемагглютинины).

Гемагглютинирующие свойства. Гемагглютинирующая активность штаммов аденовирусов крупного рогатого скота неодинакова. Она зависит от вида и концентрации эритроцитов, температуры, при которой проходит реакция, и среды pH. Штаммы первого серотипа (WBR-50 и Bovine-10) агглютинируют эритроциты белых крыс в сравнительно высоких титрах (1 : 32—1 : 256) и не агглютинируют эритроциты белых мышей. Штамм Bovine-19 (2-го серотипа) агглютинирует эритроциты белых крыс и в низком титре (1 : 2) — мышей. Более четкие результаты ГА отмечаются при температуре 4° с использованием 1%-ной или 1,5%-ной взвеси эритроцитов. Гемагглютинирующая активность концентрированных антигенов из штаммов 1-го и 2-го серотипов в 32 раза выше, чем активность нативных вирусов. Мубараком Иса, В. В. Гунеиковым и К. К. Вертинской (1971) впервые установлено, что штаммы 3, 4 и 5-го серотипов, ранее считавшиеся негемагглютинирующими, после концентрации приобретают это свойство в отношении эритроцитов белых крыс. Штамм 671130 (6-го серотипа) негемагглютинирующий.

Обычно аденовирусы крупного рогатого скота не агглютинируют эритроциты морских свинок, кур, овец и человека. Однако японский штамм Fucuroi аденовируса крупного рогатого скота агглютинировал эритроциты белых крыс, мышей, овец, коз, морских свинок, коров и хомяков при 4°, но не реагировал с эритроцитами обезьян, лошадей, кур и гусей (Инаба и др., 1968). Авторы ис-

* Нейтрализующие антитела к аденовирусам человека типов четыре и семь часто обнаруживаются в сыворотках коров. Очевидно, и вирусы, соответствующие этим антителам, видимо, должны быть выделены от коров.

пользовали РТГА с эритроцитами коров для типирования выделенных ими штаммов аденовирусов крупного рогатого скота. Штамм WBR-1 не агглютинировал ни с одним из указанных видов эритроцитов. Многие штаммы аденовирусов крупного рогатого скота, выделенные в различных странах мира, еще не изучены в отношении их спектра гемагглютинации. У аденовирусов, выделенных от человека, обнаружены два различных гемагглютинирующих фактора. Первый из них соответствует антигену С, второй — антигену В. Гемагглютинирующая активность антигена С проявляется только в присутствии гетеротипичной иммунной сыворотки, антигена В — как в присутствии гетеротипичной сыворотки, так и в меньшей степени без нее.

Патогенность. Аденовирусы непатогенны для лабораторных животных и не культивируются в куриных эмбрионах. Однако 3-й серотип бычьего аденовируса при интрацеребральном заражении обезьян резус и циномольгус вызывает летальный энцефалит. Штамм 10088 1-го серотипа и штамм WBR-1 3-го серотипа вызывают клинические признаки болезни у телят. Однако при заражении телят интраназально вирусами 1-го и 2-го серотипов наблюдали незначительные симптомы болезни, при этом постоянно отмечали диарею. Штаммы аденовирусов телят, выделенные в Венгрии, вызывали у телят пневмоэнтерит (Т. Дербишер, 1968).

Онкогенное действие выявлено у аденовирусов человека у типов 12 и 18 на лабораторных животных (опухоли у новорожденных хомячков и крыс). Штаммы WBR-1 (3-го серотипа), а также № 6833 (выделенный из конъюнктивы телят) и № 68142 (выделенный из культуры клеток бычьей тестикулярной ткани) обладают онкогенным действием для новорожденных хомячков.

Культивирование. Штаммы первых трех серотипов аденовирусов крупного рогатого скота (Bovine-10; WBR-50; Bovine-19; WBR-1) культивируются как на клетках ПЭК (почка эмбриона коров), так и на БТК (бычьи тестикулярные клетки), вызывая образование единичных, компактных базофильных внутриядерных включений. Штаммы 4, 5 и 6-го серотипов (ТНТ/62; В4/65; 671130) репродуцируются только в культуре клеток БТК.

В качестве сред для репродукции аденовирусов в зараженной культуре клеток можно использовать следующие: 1) 30% раствора Хенкса, 65% амниотической жидкости коров, 25% коровьего эмбрионального экстракта и 2,5% прогретой лошадиной сыворотки (если нет эмбрионального экстракта, добавляют 5% лошадиной сыворотки); 2) раствор Хенкса с 0,5% гидролизата лактальбумина и 2,5% прогретой лошадиной сыворотки; 3) 85% раствора Хенкса, 10% нормальной сыворотки кур и 5% куриного эмбрионального экстракта. В указанных средах культуры сохраняются 2—3 недели при смене среды каждые 3—4 дня. Сыворотку коров не используют, так как она содержит наибольшее количество ингибиторов к аденовирусам *. Среду репродукции вносят в культуру после 30 минут контакта инокулированного материала с клетками. Зараженные культуры инкубируют 10—14 дней.

Штаммы первых трех серотипов в обеих культурах вызывают цитопатогенное действие уже через 24—48 часов после заражения, за исключением штамма Bovine-19 (2-й серотип), для которого культура БТК менее чувствительна и цитопатогенное действие проявляется лишь на 3—5-е сутки. Штаммы 4, 5 и 6-го серотипов характеризуются медленным развитием в культуре клеток БТК с появлением цитопатических изменений на 5—7-е сутки после заражения. Штаммы WBR-50, Bovine-10 (1-й серотип) и Bovine-19 (2-й серотип) накапливаются в культуре ПЭК в титрах $10^{3,5}$ $ТЦД_{50}$/0,1 мл, штамм WBR-1 (3-й серотип) — в титре $10^{4,5}$ $ТЦД_{50}$/0,1 мл. Однако титры этих же штаммов в культуре БТК в течение трех пассажей не превышали 1,5—2,0 lg $ТЦД_{50}$/0,1 мл, хотя цитопатические изменения в обеих культурах развивались в те же сроки. Инфекционные титры штаммов 4, 5 и 6-го серотипов в культуре БТК достигали 3,0—3,5 lg $ТЦД_{50}$/0,1 мл. В инфицированных культурах клеток ПЭК и БТК, окра-

* В опытах Мубарака Иса, В. В. Гуненкова и К. К. Вертинской (1971) тканевые культуры успешно выращивали на среде, содержащей 0,5% гидролизата лактальбумина на солевом растворе Хенкса или среде 199 с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота для ПЭК и 10—15% для БТК.

шенных гематоксилин-эозином, обнаруживаются базофильные внутриядерные включения. Штаммы 1, 2 и 3-го серотипов вызывают образование главным образом одиночных компактных включений, а штаммы 4, 5 и 6-го серотипов — множественные включения округлой формы с четко ограниченной зоной (Мубарак Иса, В. В. Гуненков, К. К. Вертинская, 1971).

В культуральной жидкости тканевых культур, кроме инфекционного вируса, обнаружены токсиноподобный фактор (протеиновый фактор, обусловливающий ранний, наступающий через 3—6 часов цитопатический эффект) (Гинсберг, 1962); фактор, отслаивающий клетки; ингибитор вирусного размножения; фактор, изменяющий рецепторы эритроцитов.

Размножившийся вирус почти не высвобождается в культуральную жидкость. При полной дегенерации культуры лишь 6—10% аденовируса обнаруживают в культуральной жидкости. Продолжительность латентного периода равна 14—24 часам. Максимум накопления внутриклеточного вируса и максимум цитопатических изменений в инфицированной культуре для одних типов человеческого происхождения (1 и 5) совпадает, для других (6) нет. Комплементсвязывающий антиген и инфекционный вирус продуцируются независимо друг от друга.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Поставить диагноз на аденовирусную болезнь по клиническим и патологоанатомическим признакам нельзя, так как сходную патологию могут вызывать вирусы других токсономических групп: парагриппа-3, диареи, неориккетсиозы и др. Поэтому при постановке диагноза решающее значение имеют лабораторные исследования.

Рекомендуются следующие методы лабораторной диагностики аденовирусной инфекции телят:

1) выделение вируса в культуре клеток; 2) групповая идентификация выделенного вируса при помощи РГА, РСК и РДП; 3) типирование выделенного вируса при помощи РН и РТГА; 4) иммунофлуоресценция — экспрессдиагностика; 5) установление инфекции по наличию антител среди больных и переболевших животных.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Для выделения вируса берут: 1) носоглоточные смывы от больных животных в период острого течения болезни (со 2-го по 7-й день) и обязательно при появлении симптомов болезни; 2) фекалии от больных телят до 10-го дня болезни.

В первые дни болезни аденовирусы можно изолировать только из дыхательных путей, а позднее, а иногда и одновременно их удается выделить из кишечника. У телят, больных диареей, вирус раньше обнаруживают в фекалиях, а из дыхательных путей его выделяют более короткое время. Выделение вируса без серологического подтверждения его принадлежности еще не доказательство, что выделенный вирус является возбудителем данной болезни.

Из носа и зева материал берут при помощи сухих стерильных тампонов, которые тотчас погружают в пробирку, содержащую 2—3 мл раствора Рингера с добавлением 5%-ной прогретой при

56° сыворотки крови лошади или лучше курицы. Материал транспортируют в термосе со льдом. Содержимое пробирки с тампонами тщательно встряхивают, затем на каждый миллилитр среды прибавляют 1000 ЕД пенициллина и 500 ЕД стрептомицина. После 30-минутного контакта с антибиотиками при комнатной температуре делают посев на стерильность и до получения результата бактериологического контроля материал замораживают при минус 15—20°. При этой температуре он может сохраняться более года.

Фекалии берут в течение 10 дней и более после начала заболевания. Их собирают в пенициллиновые флакончики, которые также транспортируют в контейнере со льдом и хранят до обработки при минус 16—20°. Во флакончик с калом добавляют 7—8 мл дистиллированной воды или солевого раствора Хенкса. Флакончик закупоривают резиновой пробкой и встряхивают до получения гомогенной суспензии. Смесь центрифугируют 30 минут при 1500—3000 об/мин, надосадочную жидкость отсасывают, добавляют антибиотики из расчета 1000 ЕД пенициллина и 500 ЕД стрептомицина на 1 мл взвеси, которую затем выдерживают 40 минут при комнатной температуре и помещают на ночь при температуре минус 16—20°. После отстаивания суспензию центрифугируют повторно (30 минут при 2000 об/мин), надосадочную жидкость отсасывают, проверяют на стерильность посевом на сахарный бульон и хранят в замороженном состоянии до окончания бактериологического контроля. Бульон с посевом выдерживают в течение пяти суток, просматривая на вторые и пятые сутки. При отсутствии бактериального загрязнения суспензию можно использовать для заражения культуры ткани.

От трупов для выделения вируса берут кусочки легкого, трахеи, бронхов, кишечника и регионарные лимфатические узлы. Собранный материал обрабатывают аналогичным образом.

Аденовирусы выделяют на первичных клетках почки и тестикулов теленка или аналогичных тканях эмбриона крупного рогатого скота. Частота выделения вируса зависит от клинической формы болезни, времени взятия материала, условий его транспортировки, биологических особенностей типа вируса и типа примененной культуры клеток.

Выделение вируса на культуре ткани. Взятым материалом заражают первично-трипсинизированную культуру клеток почки и тестикула эмбриона крупного рогатого скота, внося в каждую пробирку по 0,2 мл взвеси. Затем в культуру добавляют поддерживающую среду, не содержащую сыворотку крупного рогатого скота. Через 5—6 часов после внесения в пробирку взвеси фекалий сменяют среду. В качестве поддерживающих сред употребляют: *а) раствор Хенкса*, содержащий 0,5% гидролизата лактальбумина (0,5%-ный раствор) и 2—5% прогретой при 56° нормальной сыворотки лошади; *б) среду 199* с добавлением 2—5% прогретой при 56° нормальной сыворотки лошади. Так как в указанных средах pH быстро меняется в кислую сторону, их приходится менять каж-

дые 3—4 дня, при этом культуры сохраняются не более 14 дней (Р. С. Дрейзин, 1965).

При выделении вируса от больных животных рекомендуется проводить 2—3 слепых пассажа с интервалами в 3—4 дня. Длительность культивирования исследуемого материала 10—12 дней. Перед пассированием культуры с культуральной жидкостью разрушают в пробирках путем трехкратного быстрого замораживания в сухом льду со спиртом (минус 70°) с последующим быстрым оттаиванием в водяной бане при 37°. При удлинении срока инкубации инфицированных культур с 10—14 до 40, а иногда до 70 дней частота выделения вируса повышается. Поэтому проводят три последовательных пассажа обследуемого материала через 10—14—20 дней, в зависимости от состояния клеточных культур. При этом среду меняют один раз в пять дней. Если замечают, что происходит дегенерация клеток, проводят следующий пассаж. После того как произойдет полная деструкция клеточного пласта (3—5-й день), матрасы вынимают из термостата и культуру с культуральной жидкостью в тех же матрасах быстро замораживают при минус 70° и быстро оттаивают при 37°. Эту процедуру повторяют еще 2 раза. Затем взвесь разливают в пенициллиновые флаконы и хранят в замороженном состоянии. Перед употреблением вирус центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 минут.

При отсутствии цитопатических изменений в культурах на протяжении четырех дней делают 2—3 слепых пассажа с интервалом 3—4 дня. На третьем пассаже срок наблюдения удлиняют на 10—15 дней, пока не появится неспецифическая дегенерация в контрольных пробирках. Если в третьем пассаже нет специфических цитопатических изменений, результат считают отрицательным.

Первичный отбор штаммов аденовирусов крупного рогатого скота проводят по характеру цитопатогенного действия. Специфическая дегенерация клеток, зараженных аденовирусами, начинается с периферии монослоя клеток. Монослой разрывается, клетки разбухают, утрачивают правильную форму, затем округляются и собираются в конгломераты, похожие на гроздья винограда. Цитопатогенный эффект сопровождается образованием внутриядерных включений и никогда не приводит к полному разрушению клеток, характерному для ряда других цитопатогенных вирусов (М. И. Соколов, 1968).

Выделенный агент идентифицируют в РСК и РДП при помощи аденогруппоспецифической сыворотки. Затем проводят типирование штамма при помощи эталонных типоспецифических сывороток в РТГА и РН в культуре ткани.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Цитологические исследования. Аденовирусы локализуются в ядрах, образуя в них базофильные включения и кристаллоподобные структуры. В ядрах эпителиальных клеток органов дыхания

больных животных обнаруживаются внутриядерные включения, дающие положительную реакцию на ДНК при окраске по Фельгену.

Характер ядерных изменений может быть изучен методом люминесцентной микроскопии переживающих культур при окраске акридином оранжевым. В клетках цилиндрического эпителия слизистой оболочки носовой раковины можно обнаружить зеленые внутриядерные ДНК-содержащие включения.

Серологическая идентификация

Идентификацию выделенных штаммов вируса проводят в РСК и РДП. Ввиду того, что комплементсвязывающий и преципитирующий антигены вируса трех серотипов (1, 2 и 3-го) отличны от антигенов трех других серотипов (4, 5 и 6-го), РСК и РДП ставятся с двумя антисыворотками, соответствующими двум группам.

Реакция связывания комплемента. При помощи данной реакции можно успешно идентифицировать выделенные полевые штаммы аденовирусов крупного рогатого скота, а также комплементфиксирующие антитела в полевых сыворотках переболевших животных при ретроспективной диагностике.

Для РСК используют специфические иммунные сыворотки морских свинок, полученные по методике Р. С. Дрейзин (1965) и не обладающие антикомплементарными свойствами.

Помимо того, в качестве испытуемого антигена используют культуральный вирус после трехкратного замораживания при минус 70° и оттаивания при 37° с последующим центрифугированием. При использовании данной реакции для идентификации полевых антител из соответствующих эталонных штаммов готовят специальные антигены по методу Р. С. Дрейзин (1965).

Приготовление антигена для РСК. Вирусные антигены для РСК и РДП готовят из эталонных штаммов аденовирусов крупного рогатого скота, относящихся к шести серотипам (Bovine-10 — 1-й серотип; Bovine-19 — 2-й серотип; WBR-1 — 3-й серотип; THT/62 — 4-й серотип; B4/65 — 5-й серотип 671130 — 6-й серотип).

Вирусы первых трех серотипов накапливают в 4—5-суточной монослойной культуре почки эмбриона коров (ПЭК), вирусы 4—6-го серотипов — в 3—5-дневной культуре бычьих тестикулярных клеток (БТК).

В литровые матрасы с 4—5-дневной культурой почки эмбриона коров вносят раздельно по 8 мл аденовируса 1, 2 и 3-го типов, а в литровые матрасы с 3—5-дневной бычьей тестикулярной культурой — по такому же количеству 4, 5 и 6-го типов аденовирусов крупного рогатого скота.

После 30-минутной адсорбции вируса культурой в матрасы добавляют 100 мл среды 199 и помещают их в термостат. Через 5—7 дней наступает полная дегенерация культуры, после чего взвесь клеток в культуральной среде в тех же матрасах 3 раза быстро замораживают при температуре минус 70° и быстро оттаивают в водяной бане при 37°. Затем эту взвесь разливают в пенициллиновые флаконы и центрифугируют 30 минут при 1500 об/мин. Осадок удаляют.

Надосадочная жидкость, прогретая перед употреблением 30 минут при 56°, является хорошим антигеном, не содержащим живого вируса. Если же заморо-

женную взвесь хранить при минус 20°, оттаивать, центрифугировать и прогревать перед опытом, то антиген сохраняется более года.

При высушивании антигена замороженную взвесь инфицированных клеток с культуральной жидкостью оттаивают при 37°, разливают в ампулы по 1 мл и лиофилизируют. Перед постановкой РСК ампулы вскрывают и содержимое разводят дистиллированной водой. Взвесь центрифугируют и надосадочную жидкость прогревают 30 минут при 56°. Высушенный антиген хранится более года.

Комплементсвязывающий антиген отделим от вирусных частиц. Он оседает медленнее, чем вирусные частицы, и может быть отделен от них дифференциальным центрифугированием или фильтрованием через градоколовые мембраны, которые задерживают вирус. Антиген устойчив к прогреванию при 56° в течение 30 минут. Он в больших количествах накапливается в жидкостях из разных типов инфицированных тканевых культур. Нормальные антигены готовят из незараженных культур ПЭК и БТК аналогичным методом. Антигены, приготовленные указанным методом, могут также использоваться в РСК и при идентификации антител в сыворотках реконвалесцентов.

Приготовление иммунных сывороток для РСК. Для получения таких сывороток необходимо морских свинок иммунизировать вирусом, размноженным на культурах почки эмбриона крупного рогатого скота, бычьей тестикулярной ткани и среде 199.

Животных иммунизируют внутрибрюшинно живым вирусом, полученным из взвеси инфицированных клеток в культуральной жидкости после шестикратного быстрого замораживания при минус 70° в сухом льду со спиртом и быстрого оттаивания в водяной бане при 37° и центрифугирования. Титр вируса, используемого для иммунизации, должен быть не ниже 10^3—10^5 $ЦТД_{50}$/мл.

Животных иммунизируют по одной из двух схем (Р. С. Дрейзин, 1965).

Схема 1. Пятикратно с интервалом три дня вводят от 1 до 5 мл вируса. На 21-й день вводят 5 мл взвеси. Через семь дней после этого животных обескровливают.

Схема 2. Три раза вводят от 2 до 5 мл вируса. Первый раз 2 мл; второй (через две недели) 3 мл и третий (на 21-й день) 5 мл. Через семь дней после последней иммунизации берут кровь *.

Так же иммунизируют по три кролика и три морские свинки нормальным антигеном из клеток ПЭК и БТК и получают от них контрольные антитканевые сыворотки.

Постановка РСК с антигеном аденовирусов ничем не отличается от постановки РСК с другими антигенами. Реакцию ставят в объеме 1 мл с двумя единицами антигена и полутора-двумя дозами комплемента. Связывание комплемента проводят в течение 18 часов при температуре 4°.

Штаммы шести серотипов аденовирусов крупного рогатого скота не имеют единого комплементсвязывающего антигена. У штаммов первых трех серотипов (WBR-50, Bovine-10, Bovine-19 и WBR-1) имеется общий комплементсвязывающий антиген (они составляют первую группу и дают между собой перекрестные реакции). Штаммы 4, 5 и 6-го серотипов составляют вторую группу, они не реагируют в РСК с сыворотками первых трех серотипов. Перекрестные реакции между штаммами обеих групп проявляются в РСК частично в титрах, не превышающих 1 : 10. В пределах

* Животных можно также иммунизировать по методу Барта и Алдаси (1964). Кроликам внутривенно вводят цельную вируссодержащую культуральную жидкость по 5 мл с интервалом в 7 дней, шестикратно. Через две недели после последнего введения их обескровливают.

каждой группы титры сывороток с гомологичными штаммами выше (1 : 160—1 : 640), чем с гетерологичными (1 : 20—1 : 80) штаммами (Мубарак Иса, В. В. Гуненков, 1971).

При отрицательном результате РСК с выделенным вирусом и положительном — с эталонным вирусом проводят 2—3 последующих пассажа выделенного вируса в культурах клеток для повышения инфекционной активности его и концентрации антигена и повторно испытывают в РСК.

При положительном результате РСК для окончательной постановки диагноза на аденовирусное заболевание необходимо провести исследование с выделенным вирусом парных сывороток больного животного, от которого выделен этот вирус. Если при помощи РСК выявлено четырехкратное и большее повышение титра антител к выделенному вирусу во второй сыворотке больного по сравнению с первой, ставят диагноз на аденовирусное заболевание. В противном случае этиологическая роль выделенного вируса не считается доказанной; нельзя исключить, что он не является возбудителем данной болезни, а относится к латентным вирусам.

Реакция диффузионной преципитации (РДП). Данную реакцию так же как и РСК, используют для идентификации вновь выделенных штаммов аденовирусов с гипериммунными сыворотками кроликов. Кроликов иммунизируют вирусом в дозе по 5 мл внутривенно 6 раз с интервалом в семь дней. Кровь для получения сыворотки берут на 10—12-й день после последнего введения вируса.

У всех штаммов аденовирусов, принадлежащих к шести серотипам, также имеется две подгруппы, различающиеся в РДП. К первой из них принадлежат штаммы 1, 2 и 3-го серотипов (Bovine-10, Bovine-19 и WBR-1), которые в РДП перекрестно реагируют между собой, тогда как штаммы трех последующих серотипов (ТНТ/62; В4/65 и 671130) долгое время считались неактивными в РДП даже с гомологичными сыворотками. Однако если использовать концентрированные антигены этих штаммов, то при помощи РДП удается выявить перекрестную антигенную связь между штаммами 4, 5 и 6-го серотипов (Мубарак Иса, В. В. Гуненков, К. К. Вертинская, 1971). Поэтому для идентификации полевых штаммов аденовирусов РДП ставят с двумя специфическими сыворотками, относящимися к 1-й и 2-й подгруппам. Следует иметь в виду, что штаммы 4, 5 и 6-го серотипов вируса в виде культуральной жидкости в РДП неактивны. Вирус необходимо концентрировать *.

* Для повышения преципитирующей и гемагглютинирующей активности эталонные штаммы вирусов концентрируют осаждением сернокислым аммонием по методу Т. М. Рыбаковой и сотр. (1969). Для этого штаммы 1, 2 и 3-го серотипов выращивают на культуре ПЭК, а 4, 5 и 6-го серотипов — на культуре БТК в 2-литровых матрасах. Перед заражением на 4—5-й день роста (для ПЭК) или 2—3-й день (для БТК) ростовую среду удаляют и культуру дважды отмывают от остатков среды. После заражения матрасы ставят на 30—45 минут для контакта, заливают средой (по 200 мл) без сыворотки и инкубируют при

Реакцию диффузионной преципитации ставят по методу Оухтерлони в чашке Петри с использованием вируссодержащей культуральной жидкости (испытуемый антиген) или концентрированного антигена, полученного по методу Т. М. Рыбаковой (1969). Наиболее четкие результаты РДП получаются при использовании в реакции агара в концентрации 0,8—1,0% на физиологическом растворе при 37°. Реакцию учитывают через 24—48 часов. Чувствительность РДП повышается при добавлении мертиолята в концентрации 1 : 10 000.

Вспомогательными тестами идентификации аденовирусов являются: 1) устойчивость к воздействию эфира и хлороформа; 2) медленное развитие цитопатогенного действия в культуре клеток с появлением внутриядерных базофильных включений; 3) низкие титры в культуре ткани 10^2—10^3 $ТЦД_{50}$/мл; 4) способность вирусов, изолированных в культуре ПЭК, размножаться в культуре клеток БТК; 5) способность большинства вирусов, изолированных на культуре ПЭК, агглютинировать эритроциты белых крыс.

ТИПИРОВАНИЕ ВЫДЕЛЕННЫХ ВИРУСОВ

Типирование выделенных вирусов проводят с помощью реакции нейтрализации и реакции торможения гемагглютинации.

Реакция нейтрализации. Данную реакцию ставят или для типирования выделенных штаммов с заведомо позитивными типовыми сыворотками (серологическая идентификация штамма), или при серодиагностике для исследования парных сывороток, или ретроспективной диагностике, когда в качестве испытуемого компонента используют сыворотку животных, а известного компонента заранее типированные и титрованные штаммы аденовирусов.

37°. При развитии полного цитопатогенного действия матрасы вынимают из термостата и сохраняют при минус 25° или же сразу используют.

Перед использованием вирусы 3—4-кратно замораживают при минус 25° и оттаивают (при 37°); вируссодержащую культуральную жидкость однократно фильтруют через бумажный фильтр. К фильтрату добавляют насыщенный раствор сернокислого аммония (pH 7,0) в количестве 46% от объема вирусного материала. Смесь (вирус+сернокислый аммоний) оставляют на 24—48 часов при 4°, затем центрифугируют при 12 000 об/мин в течение 20 минут. Надосадочную жидкость испытывают на присутствие вируса в РГА, осадок растворяют в минимальном объеме дистиллированной воды и диализуют против физиологического раствора на магнитной мешалке при 4° до исчезновения реакции на ионы сульфата с 10%-ным раствором хлористого бария. После диализа жидкость еще раз центрифугируют при 12 000 об/мин в течение 20 минут и полученную надосадочную жидкость параллельно с исходным не обработанным культуральным вирусом и надосадочной жидкостью после первого центрифугирования титруют в РГА.

Для получения препаратов из нормальной культуры ПЭК и БТК суспензию незараженных клеток также 3—4 раза последовательно замораживают при минус 25° и оттаивают при 37°. Затем жидкость фильтруют через бумажный фильтр, осаждают сернокислым аммонием и центрифугируют так же, как вируссодержащие жидкости.

В инфекционной патологии человека из 32 типов аденовирусов наибольшее значение имеют семь типов (1, 3, 4, 8, 14 и 21), этиологически связанных с острыми катарами дыхательных путей. Значение других типов (9—13, 15—20, 22—30 и др.) в патологии человека не ясно.

При помощи РН удается установить серотип выделенного полевого штамма аденовируса крупного рогатого скота. Данную реакцию проводят в культуре клеток ПЭК и БТК с гипериммунными кроличьими сыворотками, полученными на каждый серотип по методике Р. С. Дрейзин (1965). Сыворотки кроликов обладают большей вируснейтрализующей активностью по отношению к вирусу гомологичного типа (индекс нейтрализации 3—4—5 lg), чем сыворотки морских свинок (индекс нейтрализации 1,5—2,0 lg). Установлена двусторонняя перекрестная реакция между штаммами 4-го и 5-го серотипов (ТНТ/62 и В4/65).

Приготовление иммунных сывороток для РН и РТГА (по Р. С. Дрейзин, 1965). Для получения типоспецифических нейтрализующих сывороток берут кроликов-самцов весом 2—2,5 кг породы шиншилла. Животных иммунизируют вирусом, выращенным в культурах клеток почки или тестикулов эмбриона крупного рогатого скота. Вирус размножают в матрасах с культурами, для заражения которых используют цельный вирус в дозе 0,5 мл и заливают поддерживающей средой. Через 3—6 дней после наступления полной дегенерации клеток культуральную жидкость вместе с взвесью клеток 3 раза быстро замораживают при минус 70° и оттаивают в водяной бане при 37°. После центрифугирования в течение 10 минут при 10 000 об/мин осадок удаляют, а надосадочную жидкость используют в качестве антигена для иммунизации. Титр вируса в надосадочной жидкости равняется 10^3—10^5 $ТЦД_{50}$/мл.

Кроликов иммунизируют, вводя антиген:

1) внутривенно в дозе 0,5—2 мл;

2) внутривенно в дозе 2—5 мл (в обоих случаях антиген вводят по 6 раз с интервалом в три дня. Кровь берут через 12—14 дней после иммунизации);

3) внутривенно в дозе 10 мл и через 10 дней — внутрибрюшинно в той же дозе. Если будут получены низкие титры, то через $1^1/_2$—2 месяца вакцинацию повторяют. Кроликам дополнительно внутривенно 1 или 2 раза вводят вирус в дозе 5 мл, иногда повторно проводят полный второй цикл иммунизации;

4) комбинированно — в 1-й день в нос в дозе 0,5 мл и внутрибрюшинно в дозе 5 мл; на 3-й день—внутривенно 1 мл и внутрибрюшинно 5 мл; на 7-й день—внутривенно 1,5 мл и внутрибрюшинно 5 мл; на 10-й день — внутривенно 2 мл и внутрибрюшинно 5 мл.

На 21-й день делают пробное кровопускание. Если необходимо, проводят ревакцинацию. Для этого 2—3 мл вируса вводят внутривенно и через 10—12 дней животных обескровливают.

От иммунизированных кроликов обычно получается сыворотка с титром вируснейтрализующих антител от 1 : 64 до 1 : 256 в 0,2 мл и с титром антигемагглютининов 1 : 320—1 : 2560.

Реакция нейтрализации цитопатического действия (по Р. С. Дрейзин, 1965). Реакцию нейтрализации проводят на 3—5-дневных культурах клеток почек эмбриона крупного рогатого скота.

При типировании штаммов аденовирусов при помощи РН используют иммунные типовые кроличьи сыворотки в разведении, содержащем не менее 4—8 нейтрализующих доз.

При типировании свежевыделенных штаммов их можно исполь-

зовать в виде неразведенной культуральной жидкости без предварительного титрования, так как активность свежевыделенных штаммов обычно не превышает 10—15 цитопатических доз. Типоспецифические сыворотки используют в разведении 1 : 15 или 1 : 30. Тип сыворотки, тормозящей цитопатическое действие вновь выделенного вируса, указывает на соответствующий тип последнего. Нейтрализацию цитопатического эффекта наблюдают в течение 2—5 дней (иногда и больше), после чего вирус как бы прорывается через барьер специфических антител сыворотки и вызывает дегенерацию культуры *.

Типирование выделенного вируса осуществляют в РН. Для экономии культур клеток исследование можно проводить поэтапно: вначале ставить реакцию со смесями ряда типоспецифических иммунных сывороток, а затем отдельно с каждой сывороткой, входящей в состав смеси, нейтрализовавшей цитопатогенное действие выделенного вируса. Например, на первом этапе РН ставят с сыворотками против всех шести типов, с каждым отдельно. На втором этапе сыворотки против редко выделяющихся типов группируют с учетом культуральных особенностей возбудителей:

смесь сывороток против типов 1, 2 и 3-го. Эти типы вызывают дегенеративные изменения в культурах клеток почки эмбриона крупного рогатого скота;

смесь сывороток против типов 4, 5 и 6-го. Эти типы вызывают дегенеративные изменения в культурах клеток тестикул эмбриона крупного рогатого скота.

При приготовлении смеси сывороток их сливают в неразведенном виде в равных объемах и затем при последующем разведении учитывают предварительное разведение. Например, если одну сыворотку объединяют с двумя, а до этого ее надо было развести 1 : 15, то смесь сывороток, полученных после объединения, разводят 1 : 5 ввиду того, что в 3 раза она уже разведена двумя прилитыми к ней сыворотками. Конечное разведение сыворотки, входящей в состав смеси, должно содержать 4—8 нейтрализующих доз к гомологичному вирусу. Реакцию нейтрализации ставят с вирусом, содержащим 10—100 тканевых цитопатогенных доз.

При торможении цитопатогенного действия вируса какой-либо смесью сывороток ставят повторное типирование с каждой сывороткой, входящей в состав соответствующей смеси.

---

* Однако РН в культуре ткани ПЭК и БТК можно ставить с постоянной дозой сыворотки (в разведении 1 : 10) и десятикратными разведениями вируса (от 10^{-1} до 10^{-5}) на поддерживающей среде. Последний до использования в реакции предварительно трехкратно замораживают при минус 70° и быстро оттаивают при 37°. Разведенный десятикратно вирус соединяют с равным объемом сыворотки (1 : 10), смесь выдерживают в термостате (37°) в течение часа или при 4° в течение 18—24 часов. Пробирочные культуры ПЭК или БТК заражают смесью в объеме по 0,2 мл. Результаты реакции учитывают через 7—10, иногда даже 14 дней после заражения. Нейтрализующую активность сывороток выражают индексом нейтрализации. В каждом опыте ставят соответствующие контроли.

Несмотря на строгую типоспецифичность штаммов, которая выявляется в РН с иммунными сыворотками, у животных, инфицированных аденовирусами (главным образом взрослых), с увеличением титра гомотипичных нейтрализующих антител часто отмечают и нарастание уровня гетеротипичных антител (Р. С. Дрейзин, 1965).

Реакция гемагглютинации и ее торможение. Различные типы аденовирусов, выделенных от человека, агглютинируют эритроциты животных определенных видов. По этому признаку их делят на четыре группы. Типы аденовирусов, выделяемых от крупного рогатого скота, представлены в таблице 2.

ТАБЛИЦА 2

Типы аденовирусов

Типы аденовирусов крупного рогатого скота	Эритроциты крови		
	крыс	обезьян	мышей
1-й тип Bovine-10	+	—	—
2-й тип Bovine-19	+	—	+
3-й тип WBR-1	±	±	Агглютинируют нерегулярно ±

Обозначения: + положительная гемагглютинация; — отрицательная гемагглютинация; ± слабо выраженная гемагглютинация.

Остальные три серотипа (4, 5 и 6-й) не обладают гемагглютинирующими свойствами *.

К серийным двукратным разведениям вируса (в 0,85%-ном растворе NaCl), взятым в объеме 0,5 мл, прибавляют 1%-ную взвесь эритроцитов в дозе 0,1 мл одного из видов животных. Реакцию ставят при 37° и учитывают по форме осадка эритроцитов.

Стабильность агглютинирующих свойств аденовирусов в отношении эритроцитов животных определенного вида можно использовать для их дифференциации. Выявление агглютинирующей активности свежевыделенного штамма в отношении того или иного вида эритроцитов дает возможность проводить последующую РТГА с иммунными сыворотками в пределах штаммов, сходных спектру гемагглютинации.

Обнаружение гемагглютининов — надежный признак наличия вируса, однако их накопление в культуре ткани зависит от заражающей дозы вируса, поэтому титр их не может служить абсолютным показателем концентрации вируса (Р. С. Дрейзин, 1965). При заражении культуры клеток массивной дозой вируса наступает быстрая дегенерация клеток, что сопровождается минимальным накоплением гемагглютининов. При заражении малой дозой виру-

* Штаммы 3, 4 и 5-го серотипов, ранее считавшиеся негемагглютинирующими, после концентрации по методу Рыбаковой (1969) приобретают это свойство по отношению к эритроцитам белых крыс. Штаммы 6-го серотипа не гемагглютинируют и после концентрации.

са (менее 10 $ТЦД_{50}$) гемагглютинины накапливаются также в низком титре, поэтому оптимальным является 100 $ТЦД_{50}$ вируса (при этом дегенерация наступает на 5—6-й день).

Реакция торможения гемагглютинации типоспецифична. Иммунная сыворотка против группоспецифического антигена А не тормозит реакцию гемагглютинации.

Реакцию торможения гемагглютинации применяют или для типирования вновь выделенных штаммов аденовирусов, или для выявления типоспецифических антител (при ретроспективной или серодиагностике). С гомологичными штаммами гипериммунные сыворотки имеют титр 1 : 640—1 : 2560. Однако между штаммами WBR-50 (1-го типа) и Bovine-19 (2-го типа) отмечаются перекрестные реакции в титре 1 : 20, тогда как сыворотки на штаммы 3, 4, 5 и 6-го серотипов не тормозят агглютинации штаммами 1-го и 2-го серотипов (Bovine-10, WBR-50, Bovine-19).

Реакцию торможения гемагглютинации ставят по методу Розена в лунках плексигласовых досок. Вначале титруют вирус в прямой РГА и обрабатывают испытуемые сыворотки. РГА ставят для определения четырех гемагглютинирующих единиц (4 АЕ) или с целью типирования вновь выделенного штамма аденовируса, или при определении титра антигемагглютининов в специфических гипериммунных сыворотках, или в сыворотках больных (переболевших) телят на наличие антигемагглютининов.

Для удаления неспецифических ингибиторов и спонтанных гемагглютининов в сыворотках иммунизированных подопытных лабораторных животных или телят, их до исследования в реакции прогревают 30 минут при 56°. Ввиду того что гетерологичные сыворотки могут агглютинировать эритроциты белых крыс, их также обрабатывают эритроцитами белых крыс до истощения от неспецифических агглютининов и повышения чувствительности сывороток. Для этого каждую сыворотку разводят 1 : 5 физиологическим раствором, прогревают в водяной бане при 56° в течение 30 минут, после чего добавляют в равном объеме 25%-ную суспензию каолина на физиологическом растворе. Смесь выдерживают при комнатной температуре 20 минут, периодически встряхивая. Затем смесь сыворотка-каолин центрифугируют 10 минут при 1500—2000 об/мин и к надосадочной жидкости добавляют (в количестве $^1/_{10}$ объема обрабатываемой сыворотки) 50%-ную взвесь эритроцитов крыс-доноров. Смесь оставляют на ночь при 4° или ставят на один час в смесь воды со льдом (0°) в холодильник. Затем смесь центрифугируют при 1000 об/мин в течение 10 минут. Надосадочная жидкость представляет собой сыворотку в разведении 1 : 10, из которой готовят последующие двукратные разведения (1 : 20, 1 : 40, 1 : 80 и т. д.) до 1 : 5120 и больше в объеме 0,2 мл с физиологическим раствором.

После определения гемагглютинирующего титра каждого штамма в РГА готовят их рабочие разведения, содержащие по 4 АЕ в 0,2 мл. Затем к 0,2 мл каждого разведения сыворотки добавляют

по 0,2 мл рабочего разведения вируса, смесь выдерживают 1 час при комнатной температуре (22°) или 18—24 часа при 4° и добавляют по 0,2 мл 1%-ной взвеси эритроцитов белых крыс. Смесь встряхивают и помещают в холодильник при 4°. Результаты РТГА учитывают через $1^1/_2$—2 часа после полного оседания эритроцитов в контроле. За титр сыворотки берут то наивысшее разведение ее, которое давало полную задержку РГА.

При постановке РТГА ставят следующие контроли: контроль рабочей дозы вируса*; контроль испытуемой сыворотки (0,2 мл наименьшего разведения сыворотки +0,2 мл физиологического раствора+0,2 мл 1%-ной взвеси эритроцитов); контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию (0,4 мл физиологического раствора+0,2 мл 1%-ной взвеси эритроцитов). Эритроциты крыс используют в течение 48 часов.

Р. С. Дрейзин (1965) предложила следующий метод использования РТГА для быстрой дифференциации свежевыделенных штаммов аденовирусов человека на подгруппы с последующим их типированием в РТГА.

Взвесью свежевыделенных штаммов аденовирусов в различных разведениях — от 10^0 до 10^{-4} — заражают тканевые культуры (в трех пробирках на каждое разведение) и инкубируют при 35—37°. Когда специфическая дегенерация достигает ++++ со всеми образцами полученного вируса, ставят РГА со взвесью эритроцитов крови крысы. Таким образом быстро обеспечиваются оптимальные условия для выявления гемагглютининов.

В случае обнаружения перекрестных РТГА необходимо повторно поставить реакцию, используя сыворотки в разведениях до их титра, и дополнить результаты, полученные в РН цитопатогенного эффекта на клеточных культурах. Р. С. Дрейзин подтвердила полное соответствие результатов РТГА и РН, причем при высоких и средних титрах антигемагглютининов выявлены нейтрализующие антитела в низких титрах.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

Серодиагностику аденовирусной инфекции осуществляют по нарастанию уровня специфических антител в крови больных животных, взятой в период острого течения болезни (с 1-го по 5-й день) и в период выздоровления (через 14—30 дней после начала болезни). У заболевших животных вначале обнаруживаются и на-

* Контроль рабочей дозы вируса ставят следующим образом: отмечают четыре лунки, в которые, начиная со второй, разливают по 0,2 мл физиологического раствора. В первую и во вторую лунки вносят по 0,2 мл приготовленной рабочей дозы вируса. Из второй лунки после смешивания переносят 0,2 мл в третью и т. д.; из последней лунки 0,2 мл выливают. Затем во все лунки добавляют по 0,2 мл физиологического раствора и 0,2 мл 1%-ной взвеси эритроцитов. Смесь встряхивают и помещают в холодильник при 4°. При правильном выборе рабочей дозы в первых трех лунках отмечается полная агглютинация, а в четвертой она отсутствует.

капливаются типоспецифические нейтрализующие антитела и антигемагглютинины, и только в сроки от 25—30 дней до 4 месяцев после начала заболевания выявляются группоспецифические и преципитирующие антитела. Поэтому в положительных случаях РТГА и РН показывают нарастание антител в острый период болезни; другие две реакции (РДП и РСК) проявляются позже и используются для ретроспективной диагностики.

Идентификацию антител к групповому антигену проводят в РСК и РДП с антигенами двух эталонных штаммов аденовируса крупного рогатого скота первой и второй подгрупп. РН с полевыми сыворотками ставят с эталонными вирусами, соответствующими шести серотипам. В РТГА полевые сыворотки исследуют с антигеном (культуральным вирусом) первых двух серотипов.

Для идентификации антител кровь у телят берут дважды: в начале болезни и через 12—14 дней для обнаружения вируснейтрализующих и антигемагглютинирующих антител. При исследовании парных сывороток в РН и РТГА реакция считается достоверной при повышении титра антител в 4 раза и более. Для обнаружения комплементфиксирующих антител вторые пробы сывороток следует брать не ранее чем через 3—4 недели. Для РН, РСК и РДП исследуемые сыворотки прогревают 30 минут при 56°.

Антигеном для реакции является культуральная жидкость, содержащая аденовирус. Преципитация обнаруживается в виде четких линий, интенсивность которых учитывается от 0 до ++++. Выявленные в РДП антитела являются группоспецифическими. В сыворотках, взятых в острый период болезни животного, линии преципитации отсутствуют или отмечается более позднее и более слабое их появление по сравнению с сыворотками, взятыми в период реконвалесценции. Преципитирующие антитела к групповому антигену аденовирусов появляются в сыворотке телят через 3—4 недели после начала болезни и сохраняются до 2—3 месяцев.

Реакцию связывания комплемента с аденовирусными антигенами (для обнаружения специфических антител) чаще ставят по обычной методике. При этом связывание комплемента проводят при 4° или при 37°. Четырехкратный и более высокий прирост титра антител в РСК свидетельствует об аденовирусной этиологии болезни.

Для определения титра иммунных сывороток животных при помощи РН вирус и сыворотки разводят раствором Хенкса от 1 : 4 до 1 : 512 с коэффициентом 2; сыворотки крупного рогатого скота, взятые в период острого течения болезни, разводят от 1 : 2 до 1 : 32; сыворотки периода реконвалесценции — от 1 : 8 до 1 : 256. Сыворотки в объеме 0,2 мл соединяют с 0,2 мл вируса, содержащим 100 цитопатических доз вируса. Смеси инкубируют в течение одного часа при комнатной температуре и каждой смесью заражают культуру клеток в двух пробирках. Через 20 минут в пробирки вводят по 0,8 мл поддерживающей среды. Реакцию на культурах клеток почки эмбриона крупного рогатого скота учитывают

на седьмой день после появления цитопатических изменений в культурах, зараженных вирусом без сыворотки.

Иммунофлуоресценция. Специфический антиген в инфицированных клетках культуры вскоре после заражения (8—24 часа) можно обнаружить при помощи флуоресцирующих антител. Для этого используют иммунные глобулины, конъюгированные флуоресцеинизотиоционатом, содержащие антитела против аденовирусов. Препараты готовят из центрифугата носоглоточных смывов больных животных. Специфическую флуоресценцию наблюдают в ядрах клеток цилиндрического эпителия. Свечение нередко отмечают и в цитоплазме, но интенсивность свечения ядер более значительна (Р. С. Дрейзин, 1965).

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Цитопатогенное действие аденовирусов в отличие от аналогичного действия вирусов ринотрахеита и парагриппа проявляется довольно четко. Вирус ринотрахеита крупного рогатого скота в отличие от аденовирусов вызывает быстро наступающую дегенерацию культуры клеток легочной и почечной ткани эмбрионов крупного рогатого скота. Вирусы парагриппа крупного рогатого скота вызывают положительную реакцию гемадсорбции с эритроцитами морской свинки.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ретроспективную диагностику аденовирусной инфекции проводят при помощи РСК и РДП. Парные сыворотки переболевшего животного исследуют с любым типом аденовирусов крупного рогатого скота. Диагностическое значение имеет обнаружение четырехкратного и большего нарастания титра антител во второй сыворотке переболевшего животного.

Если необходимо уточнить тип аденовируса, вызвавшего заболевание, исследуют парные сыворотки больного в РН и РТГА начале с аденовирусами тех типов, которые наиболее часто являются возбудителями аденовирусных болезней, а затем с остальными.

Реакцию нейтрализации ставят с двукратно возрастающими разведениями (начиная с 1 : 10) парных сывороток переболевшего и 100 $ТЦД_{50}$ каждого типа по методике, описанной выше (серологическая идентификация вируса и серодиагностика).

Следует иметь в виду, что в крови животных, перенесших аденовирусную инфекцию, могут накапливаться гетерологичные нейтрализующие антитела. Поэтому для точной расшифровки вспышки аденовирусной инфекции недостаточно исследовать сыворотки реконвалесцентов, необходимо обязательно выделить вирус от больных и провести последующее его типирование (Ю. Н. Мастю-

кова, 1967). Следует отметить, что неспецифические ингибиторы в сыворотках крупного рогатого скота, по данным Клейна и др. (1960), представляют собой специфические антитела, образующиеся в результате бессимптомного переболевания животных.

Помимо РН и РСК, в ретроспективной диагностике (как и серодиагностике) можно с успехом применять методы непрямой гемагглютинации и королиметрической пробы.

Реакция непрямой гемагглютинации. Установлено, что реакция непрямой гемагглютинации более чувствительна, чем РСК, и не уступает по чувствительности методу нейтрализации. Однако эта реакция оказалась нетипоспецифической (отмечались перекрестные реакции с антигенами других типов, хотя и в меньшей степени, чем в РСК).

Перед постановкой реакции свежие эритроциты барана (4%-ная взвесь), отмытые фосфатно-буферным солевым раствором (pH 7,2), обрабатывают взятой в равном объеме таниновой кислотой в разведении 1 : 20 000 (30 минут при 22—25°). Затем эритроциты отмывают 3 раза и уже в виде 2%-ной взвеси сенсибилизируют взятым в равном объеме антигеном аденовируса. Сенсибилизированные эритроциты отмывают в растворе нормальной сыворотки крови кролика (1 : 200) и суспендируют в ней до получения 1%-ной концентрации. К различным разведениям испытуемой сыворотки в объеме 0,2 мл прибавляют 0,2 мл 1%-ной взвеси нагруженных антигеном эритроцитов. Результаты учитывают через 2 часа при комнатной температуре.

Эритроциты барана можно заменить эритроцитами кур; получаются более четкие и воспроизводимые результаты с коротким периодом (60 минут) инкубации сенсибилизированных эритроцитов с антителами иммунных сывороток.

Реакция непрямой гемагглютинации с обработанными танином эритроцитами обнаруживает группоспецифические антитела. Для определения при помощи данной реакции типоспецифических антител Росс и Гинсберг (1958) предложили блокировать неспецифические антитела «блокирующими антигенами» — смесью равных объемов вирусов трех типов (в эту смесь не должен входить вирус того типа, по отношению к которому определяют антитела). К смеси вирусов с различными разведениями сывороток после выдерживания в течение 30 минут при 37° прибавляют взвесь эритроцитов, обработанных танином и сенсибилизированных типом вируса, против которого определяли антитела. Данная модификация обеспечивает выявление типоспецифических антител в обследуемых сыворотках.

Для реакции диффузионной преципитации в качестве геля используют агар Дифко на вероналовом буфере, в качестве антисывороток — сыворотки иммунизированных кроликов и парные сыворотки переболевших животных. Антигеном служит культуральная жидкость культур клеток почки и тестикул эмбриона крупного рогатого скота, содержащая аденовирус. Преципитацию обнаруживают в виде четких линий, интенсивность которых учитывается от 0 до ++++. Помимо групповой идентификации полевых штаммов, данный метод позволяет выявить группоспецифические (видоспецифические) антитела у переболевших животных. Сыворотки, взятые в период острого течения болезни, дают более слабое и более позднее появление линий преципитации по сравнению с сыворотками, взятыми в период реконвалесценции.

Таким образом, сравнительная диагностическая ценность РСК, РДП, РН и РТГА определяется задачей исследования. Это видно из таблицы 3.

Колориметрический метод. Данный метод разработан применительно к аденовирусам, вызывающим аденовирусную инфекцию человека на основе использования чувствительной культуры клеток HeLa. Поскольку данная культура нечувствительна к аденовирусам бычьего типа, трудно судить о применимости колориметрического теста с первичной культурой почки теленка. Колориметрический метод служит для типовой идентификации антител в сыворотках реконвалесцентов. Для этого используют клетки культуры HeLa, взвешенные

(по 50 000 в каждой пробирке) в специальной питательной среде ССМ *. Результаты опытов учитывают после 8—14 дней инкубации при 35° по изменению pH среды, что меняет также ее цвет: pH среды в пробирках с незараженными клетками снижается до 7,0 и ниже, тогда как во взвеси клеток, зараженных аденовирусами, pH 8,0—7,3.

ТАБЛИЦА 3

Антигенное родство штаммов шести серотипов аденовирусов крупного рогатого скота по данным РСК, РДП, РН и РТГА (Мубарак Иса, 1971)

Штамм	Серотип вируса	РСК						РДП					
		сероти сыворотки											
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Bovine-10	1	++ ++	++ ++	++ ++	0	0	0	++ ++	++ ++	++ ++	0	0	0
Bovine-19	2	++ ++	++ ++	++ ++	0	0	0	++ ++	++ ++	++ ++	0	0	0
WBR-1	3	++ ++	++ ++	++ ++	0	0	0	++ ++	++ ++	++ ++	0	0	0
THT/62	4	0	0	0	++ ++	++ ++	++ ++	0	0	0	++ ++	++ ++	++ ++
B4/65	5	0	0	0	++ ++	++ ++	++ ++	0	0	0	++ ++	++ ++	++ ++
671130	6	0	0	0	++ ++	++ ++	++ ++	0	0	0	++ ++	++ ++	++ ++

Продолжение

Штамм	Серотип вируса	РН						РТГА					
		сероти сыворотки											
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Bovine-10	1	++ ++	0	0	0	0	0	++ ++	0	0	0	0	0
Bovine-19	2	0	++ ++	0	0	0	0	0	++ ++	0	0	0	0
WBR-1	3	0	0	++ ++	0	0	0	н. а.					
THT/62	4	0	0	0	++ ++	+	0	н. а.					
B4/65	5	0	0	0	+	++ ++	0	н. а.					
671130	6	0	0	0	0	0	++ ++	н. а.					

Примечание: ++ — полное антигенное родство, + — частичное антигенное родство; н. а. — вирус не агглютинирует.

При использовании культуры клеток почки эмбриона крупного рогатого скота pH среды (среда Игла и 10% сыворотки лошади) в зараженной аденовирусами культуре клеток в течение трех дней культивирования снижается до 7,0—6,8, и индикатор среды принимает желтую окраску. В культурах, где вирус

* Состав среды ССМ: сыворотка крови кролика — 5 мл; 20%-ный раствор глюкозы — 1,5 мл; 2,5 мл среды 199 в сбалансированном растворе Эрла; 8,8%-ный раствор $NaHCO_3$ — 95,5 мл.

нейтрализовался сывороткой, pH среды 7,5—7,3, и цвет индикатора среды меняется лишь до красно-оранжевого. Цвет среды сравнивают с колориметрическим стандартом фенолового красного, составленным с интервалом 0,2 между значениями pH от 6,8 до 7,8.

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА И ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

Вакцины для профилактики аденовирусной инфекции нет. В Венгрии Барта (1967) применял живую и инактивированную вакцину из штамма ТНТ/62 4-го серотипа. Трауб (1969) предложил инактивированную комбинированную вакцину из вируса парагриппа-3, аденовируса 3-го серотипа. Хоанши (1968) рекомендовал применять живые вакцины интраназально. Длительность обнаружения специфических антител в сыворотке и носовых секретах животных, привитых живыми вакцинами, не изучена.

АФРИКАНСКАЯ ЧУМА ОДНОКОПЫТНЫХ

(PESTIS EQUORUM — ЛАТ.,
AFRICAN HORSESICKNESS — АНГЛ.)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Африканская чума однокопытных — остро и подостро протекающая инфекционная болезнь, характеризующаяся резко выраженной лихорадочной реакцией, отечностью подкожной клетчатки и легких, скоплением серозной жидкости в полостях тела и кровоизлияниями во внутренних органах.

Болезнь носит сезонный характер, появляясь спорадически или эпизоотически в теплый влажный период года.

В последнее время, помимо африканского континента, болезнь была зарегистрирована в странах Ближнего и Среднего Востока (Иран, Пакистан, Турция, Афганистан, Индия, Ирак, Ливан) и в Европе (Испания).

Клинические симптомы болезни у лошадей разнообразны. Различают сверхострое, острое (легочная форма) и подострое течение (сердечная, или отечная, форма) болезни. Инкубационный период — 3—10 дней. Сверхострое течение характеризуется высокой температурой, фибрилляцией мышц, слабостью. Через 3—6 дней после заболевания животные погибают. При легочной форме болезнь длится 11—14 суток. У больных отмечают общее угнетение, высокую температуру, учащенное, затрудненное дыхание, слезотечение, светобоязнь; конъюнктива гиперемирована, с желтушным оттенком. За 1—2 суток до смерти быстро развиваются признаки отека легких (приступы кашля, цианоз слизистых оболочек, выделение пенистой жидкости из ноздрей). Сердечная, или отечная, форма чаще протекает подостро и развивается к концу второй недели. Отеки появляются в области головы, век, глазных впадин, передней части морды, подчелюстного пространства, ганаш, губ, шеи, подгрудка, живота и конечностей. Выздоравливают животные медленно. Отмечается и смешанная форма болезни. При осложнениях у больных лошадей наблюдают параличи пищевода.

ВИРУС

Возбудитель африканской чумы однокопытных относится к РНК-содержащим вирусам, размеры его 40—80 ммк; тип симметрии капсиды кубический, количество капсомеров 92. В отличие от большинства арбовирусов вирус чумы однокопытных устойчив к инактивирующему действию эфира и дезоксихолата натрия. Эту устойчивость объясняют отсутствием в его оболочке значимых структурных липидов. В связи с этим предлагают выделить вирус африканской чумы однокопытных из группы арбовирусов и считать его в группе временно неклассифицированных вирусов животных.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. При 60° инактивация вируса происходит в течение 10 минут. Кипячение разрушает вирус за 1—2 минуты; 1М раствор $MgCl_2$ снижает его термостабильность при 50°. Вирус стабилен в щелочной зоне pH 7,0—9,0, но быстро разрушается при pH 3,0 и выше 10,0.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. В лиофилизированном состоянии вируссодержащий мозг сохраняет инфекционную активность длительное время, при минус 70° — несколько лет, при минус 20° — 2 года, при 4° в 50%-ном глицерине — несколько месяцев. Ви-

руссодержащая кровь больных лошадей, смешанная в равном объеме с оксалатфенолглицериновым раствором, при 4° сохраняет инфекционные свойства несколько лет. Нейротропные штаммы вируса, выращенные в культуре клеток MS и сохраняемые при 37° в виде суспензии вируса в культуральной жидкости, теряют инфекционные свойства лишь через 40 дней. При хранении в условиях 25° титр вируса в таком же материале за тот же срок снижается на 1—2 lg, а при 4° инфекционная активность суспензии сохраняется в течение 40 дней, тогда как при минус 25° она снижается на 2—3 lg уже через двое суток. Лиофилизированная полиштаммная вакцина при хранении в условиях 4° сохраняет активность в течение 9 месяцев и лишь к 18 месяцу хранения теряет 2 lg своего исходного титра.

Вируссодержащую кровь консервируют, смешивая с равным количеством глицерина и воды, затем к 1 мл смеси добавляют 1 г фенола.

Локализация в организме. В крови естественно заболевших лошадей вирус достигает титра 2—3 lg $МЛД_{50}$/мл. У павших животных в максимальном количестве его обнаруживают в селезенке и легких (до 4 lg $МЛД_{50}$/мл).

Антигенная вариабельность. Известны девять антигенных типов этого вируса. Прототипными штаммами выделенных антигенных типов являются следующие: I-A501; II-ОД; III-L; IV-Vryh; V-VH, VI-114; VII-Karen, $VIII-^{18}/_{60}$; $IX-^{7}/_{6}$.

Все серотипы имеют общий комплементсвязывающий антиген и различаются в перекрестной реакции нейтрализации (на белых мышах или в культуре ткани).

Антигенные свойства. В организме переболевших лошадей возбудитель индуцирует образование специфических антител, которые можно обнаружить при помощи РСК, РТГА, РДП и РН.

Спектр патогенности. В естественных условиях наиболее восприимчивы лошади. В местностях, ранее благополучных по этой инфекции, может погибать 90% лошадей. Мулы, лошаки, ослы менее восприимчивы. Имеются сообщения о заболевании зебр; наблюдались случаи массового заболевания и гибели собак, питавшихся мясом лошадей, погибших от африканской чумы.

Культивирование в лабораторных условиях. До последнего времени вирус африканской чумы однокопытных культивировали в мозгу белых мышей. Для выделения полевых штаммов чаще используют мышей-сосунов, в мозгу которых вирус пассируют несколько раз. Для первичного выделения вируса и дальнейших пассажей можно использовать и взрослых мышей. В отличие от мышат-сосунов болезнь у них развивается медленнее, и отдельные особи могут выздоравливать.

При длительном культивировании в мозгу мышей вирус чумы однокопытных приобретает нейротропные свойства, снижается патогенность для лошадей, но сохраняется антигенная и иммуногенная активность.

Имеются сообщения об успешном культивировании вируса чумы однокопытных в развивающихся куриных эмбрионах.

В последнее время для поддержания этого вируса в лабораторных условиях используют культуру клеток — первично-трипсинизированные клетки почек эмбрионов овец, почек ягнят и переживаемые линии клеток MS и VERO. Перед заражением культур клеток вирус, как правило, предварительно пассируют 3—4-кратно в мозгу мышат-сосунов. Однако в культурах клеток почек ягнят и эмбрионов овец удается выделять и культивировать вирус непосредственно из крови и органов больных и погибших от чумы животных. Пассирование вируса в тканевых культурах также сопровождается его аттенуацией с сохранением антигенных и иммуногенных свойств.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагностика африканской чумы однокопытных основывается на эпизоотологических данных (время года, возможность контакта с животными из неблагополучных по данной болезни терри-

рий, наличие переносчиков, восприимчивые животные), симптомах болезни (отеки головы, шеи, груди и живота, одышка, кашель, истечение из носа), патологоанатомических изменениях и данных лабораторных методов исследования.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материала. Для выделения вируса обычно используют кровь больных лошадей, взятую в период от начала температурной реакции до ее спада (так как появляющиеся в период спада температуры антитела препятствуют выделению вируса). Кровь предпочтительнее брать в оксалатфенолглицериновый раствор (жидкость Эдингтона*), в раствор гепарина или дефибринировать ее. Сыворотку крови для выделения вируса использовать не рекомендуется. Для выделения вируса из трупа берут пробы селезенки в 50%-ный раствор глицерина.

Пробы селезенки отмывают от глицерина, измельчают, готовят 10%-ную суспензию на фосфатном буфере pH 7,2, центрифугируют 30 минут при 2500 об/мин, надосадочную жидкость обрабатывают антибиотиками и используют для заражения лошадей, мышей или культуры ткани общепринятым методом. Пробы крови, взятые в гепарин, оксалат натрия или в оксалатфенолглицериновый раствор, перед заражением мышей разбавляют дистиллированной водой или физиологическим раствором, взятыми в равных количествах. Лошадям материал вводят внутривенно в дозе 2—5 мл, а мышам — интрацеребрально по 0,025 мл. Летальность у мышей-сосунов, зараженных интрацеребрально полевыми штаммами вируса, может достигать 100%. Инкубационный период продолжается 4—16 дней и зависит от заражающей дозы и природы штамма. Инкубационный период у зараженных взрослых мышей от 6 до 21 дня, при этом часть из них может выздоравливать. Как правило, после 2—3 интрацеребральных пассажей эпизоотического штамма заболевают и гибнут все зараженные мыши. Заболевание у них характеризуется вялостью, анорексией, взъерошенностью шерсти, снижением веса, парезами и параличами различных частей тела. Иногда внешне здоровые мыши гибнут внезапно.

Помимо мышей, для выделения висцеротропных полевых штаммов вируса можно использовать первичную культуру клеток почек гнят или почек эмбрионов овец. Для заражения культур тканей также используют суспензию селезенки после предварительного ее центрифугирования, дефибринированную или цитратную кровь. Из сосудов с культурой клеток удаляют питательную среду и вносят в них вируссодержащий материал, предварительно разведенный 1 : 10 питательной средой. Инфицированные культуры инкубируют 40—60 минут при 37°, затем инокулят удаляют, клеточный

* Жидкость Эдингтона состоит из 5 г щавелевокислого кальция, 5 г фенола, 500 мл дистиллированной воды и 500 мл глицерина.

пласт трехкратно промывают питательной средой и в сосуды добавляют соответствующее количество поддерживающей среды, после чего инфицированные культуры оставляют для инкубирования. Цитопатические изменения в первых пассажах обычно наступают на 4—5-й день; титр культурального вируса достигает 10^4 $МЛД_{50}$/мл. Для первичного выделения вируса предпочтительнее (и в условиях лаборатории доступнее) использовать белых мышей, после 3—4 пассажей на которых вирус легко адаптируют к растущей культуре клеток почки ягнят.

Если болезнь отмечают среди ранее вакцинированных лошадей, выделить вирус на мышах не удается. В таких случаях рекомендуют первично выделять вирус на хорьках и в дальнейшем пассировать через мозг мышей.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА

Видовую идентификацию выделенных штаммов вируса можно проводить при помощи реакции связывания комплемента и диффузионной преципитации, а типовую — реакции нейтрализации.

Реакция связывания комплемента. При помощи данной реакции определяют видовую (групповую) специфичность вновь выделенных полевых штаммов вируса или исследуют сыворотки больных, переболевших и вакцинированных лошадей на наличие видовых (групповых) комплементсвязывающих антител. РСК является групповой реакцией, т. е. моноштаммной специфической сывороткой выявляют антиген любого из известных типов вируса африканской чумы однокопытных, и, наоборот, моноштаммным специфическим антигеном можно обнаружить комплементсвязывающие антитела против всех других типов африканской чумы однокопытных. В сыворотках больных лошадей комплементсвязывающие антитела, как правило, появляются через несколько дней после снижения температуры тела. Однако у животных в подострый период инфекции их можно обнаружить через 10 дней и более после начала заболевания, что дает основание использовать РСК и не только для ретроспективной, но и в отдельных случаях для прижизненной диагностики африканской чумы однокопытных.

Положительные результаты РСК, полученные при исследовании в качественной РСК сывороток крови животных, ранее не вакцинированных против африканской чумы однокопытных, и животных из местности, ранее неблагополучной по этой болезни, а также положительные результаты РСК с антигенами из селезенки павших лошадей являются основанием для постановки положительного диагноза.

В тех случаях, когда болезнь зарегистрирована в стаде животных, ранее вакцинированных против африканской чумы однокопытных, или среди животных, ранее неблагополучных по данной болезни, возникает необходимость установить нарастание титра антител против вируса АЧО в парных сыворотках, взятых от

животных в начальный период болезни и в период реконвалесценции. Для этого проводят количественное титрование полученных проб сывороток.

Специфичность переболевания животных африканской чумой подтверждают, если титр антител в сыворотке, взятой в момент реконвалесценции, превышает в 4 раза и более титр антител в сыворотке, взятой в остром периоде болезни. Отрицательный диагноз ставят, если в исследуемых сыворотках не обнаруживают нарастания титра антител против вируса африканской чумы однокопытных.

Реакция считается сомнительной, если при исследовании парных сывороток отмечают двукратное нарастание титра антител. В этом случае от животных, с сыворотками которых получен сомнительный результат, получают повторные пробы сывороток (не позднее чем через один месяц после выздоровления), которые исследуют в РСК. Если при исследовании повторно взятых проб вновь регистрируют лишь двукратное нарастание титра антител, реакция считается отрицательной.

Реакция нейтрализации. При помощи данной реакции удается определить принадлежность выделенного штамма вируса африканской чумы однокопытных к тому или иному из известных антигенных типов этого возбудителя или установить типовую принадлежность антител в сыворотках реконвалесцентов. Необходимо подчеркнуть, что типовая специфичность этой реакции выражена настолько, что с ее помощью во многих случаях невозможна идентификация штаммов, относящихся к новым, ранее не известным антигенным типам вируса, которые не имеют антигенной взаимосвязи с выделенными ранее штаммами.

В диагностической практике реакцию нейтрализации используют для того, чтобы: определить типовую принадлежность выделенного полевого штамма вируса; выявить наличие специфических антител у лошадей-реконвалесцентов и установить (ретроспективно) антигенный тип вируса, вызвавшего заболевание; косвенно оценить напряженность поствакцинального иммунитета; титровать антитела иммунных сывороток. Для постановки РН получают специфическую сыворотку и антиген.

Получение гипериммунной сыворотки на кроликах. Соответствующим материалом (суспензией мозга мышей 1 : 1000, вируссодержащей первичной культурой ткани почки овцы или инфицированной перевиваемой культурой клеток MS) заражают в мозг 3—4-дневных мышат, которых убивают под эфирным наркозом в агональном состоянии. Готовят 10%-ную суспензию головного мозга на $^1/_{50}$ М фосфатно-буферном растворе и центрифугируют ее в течение 30 минут при 2000 об/мин. Надосадочная жидкость является антигеном для иммунизации кроликов. Первую инъекцию антигена делают внутрибрюшинно в дозе 2—5 мл, после чего проводят 10 внутривенных введений с 4—5-дневными интервалами. При каждой инъекции вводят около 10^5—10^6 МЛД$_{50}$ (ТЦД$_{50}$) вируса. Через 10 дней после последнего введения кроликов обескровливают и сыворотку сохраняют без консерванта при минус 20°.

Специфическую сыворотку к типам 8 и 9 получают на морских свинках: первое введение — 1 мл суспензии мозга белых мышей внутрибрюшинно, через 2 недели — второе введение и спустя 10 дней берут сыворотку, которую также хранят при минус 20°.

Получение антигена. Типоспецифические антигены, необходимые для определения антител в исследуемых полевых сыворотках, готовят из мозга мышей, инфицированных антигенно-различными, нейротропными штаммами вируса (при постановке РН на мышах) или из инфицированных этими штаммами тканевых культур (при постановке РН в культуре ткани). В 50%-ную суспензию мозга на $^1/_{50}$ М фосфатно-буферном растворе или в культуральную жидкость добавляют 10% лактозы и 2% пептона, после чего ее разливают по ампулам и подвергают лиофильной сушке.

В тех случаях, когда при помощи реакции нейтрализации необходимо идентифицировать выделенный вирус по стандартным сывороткам, антиген готовят следующим образом: мышат заражают в мозг кровью, разведенной пополам водой или надосадочной жидкостью после центрифугирования 10%-ной суспензии селезенки. Проводят 3—5 пассажей вируса на мышах до тех пор, пока он не станет вызывать 100%-ную их гибель. Вирус, выделенный методом внутримозгового заражения мышей, может быть адаптирован к культуре клеток и также быть использован в реакции нейтрализации.

Постановка реакции нейтрализации. В реакции нейтрализации исследуют либо постепенно возрастающие разведения сывороток с постоянной дозой (100 или 1000 $ТЦД_{50}$/$МЛД_{50}$) вируса, т. е. определяют титр антител в исследуемых сыворотках, либо определяют индекс нейтрализации этих сывороток. В последнем случае пробы сывороток, разведенных 1 : 5 питательной средой, испытывают с десятикратно возрастающими разведениями вируса. Время контакта смеси вирус-сыворотка — 1 час при 37°. В остальных деталях метод постановки РН на мышах и культуре ткани аналогичен общепринятому.

Указанные способы постановки реакции нейтрализации применимы и для определения типовой принадлежности антител в сыворотках реконвалесцентов и для антигенной типизации выделенного штамма вируса. В первом случае для постановки реакции необходимы адаптированные к мозгу мышей или к культуре клеток эталонные штаммы вируса различных антигенных типов. Для установления антигенного типа выделенного вируса необходим набор типоспецифических иммунных сывороток против известных антигенных типов вируса африканской чумы однокопытных.

Для определения типовой принадлежности антител в иммунной сыворотке ее титруют или определяют индекс нейтрализации с каждым эталонным штаммом. Типовую принадлежность антител устанавливают, основываясь на том, какой из испытанных штаммов сыворотка способна нейтрализовать в наиболее высоком разведении или с которым индекс нейтрализации сыворотки оказывается наиболее существенным.

Для определения антигенного типа выделенного штамма вируса с этим штаммом проводят титрование всех имеющихся типоспецифических сывороток или определяют их индекс нейтрализации с испытуемым штаммом. О типе вируса судят в соответствии с тем, какая из испытанных сывороток способна нейтрализовать его в максимальных разведениях, близких к ее титру, либо какая из них имеет наиболее высокий индекс нейтрализации.

Реакция гемагглютинации и торможения гемагглютинации. Реакция торможения гемагглютинации при африканской чуме однокопытных, так же как и реакция нейтрализации, является типоспецифической. При помощи этого теста можно идентифицировать антигенный тип вируса, вызвавшего заболевание, но в отличие от РСК не удается выявить взаимосвязи между штаммами, относящимися к различным антигенным типам.

При помощи РТГА можно проводить ретроспективную диагностику болезни, исследуя сыворотки реконвалесцентов с типоспецифическими гемагглютинирующими антигенами. Несмотря на то, что методы приготовления антигенов и дру-

гих компонентов, необходимых для постановки РТГА, трудоемки, своевременная их подготовка позволяет легко и в кратчайшие сроки проводить ретроспективную диагностику.

Комплексная диагностика инфекции при помощи РСК и одной из двух типоспецифических реакций — РН и РТГА — позволяет идентифицировать антитела против новых, ранее неизвестных антигенных типов вируса африканской чумы однокопытных. Необходимым условием для таких исследований является наличие заведомо типоспецифических иммунных сывороток.

Феномен гемагглютинации (РГА) проявляется в свободной от ингибиторов среде при определенной концентрации солей, pH среды и благоприятной температуре. Непременное условие успешной постановки РГА и РТГА освобождение антигенов и сывороток от неспецифических ингибиторов гемагглютининов.

Основные и вспомогательные ингредиенты РГА и РТГА: антигены; сыворотки; эритроциты лошади; боратный буферный раствор pH 9,0; фосфатный буферный раствор; 25%-ная взвесь каолина на боратном буфере pH 9,0; раствор Альсевера.

Для приготовления всех ингредиентов реакции небходимо применять только химически чистые реактивы.

Антиген готовят из мозга мышей-сосунов, зараженных вирулентным вирусом, используя метод сахарозо-ацетоновой экстракции с последующей обработкой протаминсульфатом* или наиболее простой метод щелочной экстракции** с той же дополнительной обработкой протаминсульфатом.

Подготовка сыворотки крови для РТГА. Обработка сывороток крови заключается в удалении неспецифических ингибиторов гемагглютинации адсорбцией каолином или экстракцией ацетоном. Сыворотки обрабатывают накануне опыта; после обработки они обычно пригодны для использования в течение нескольких дней.

Адсорбция каолином. Цельную сыворотку разводят боратным буфером pH 9,0 в соотношении 1 : 5 (1 объем сыворотки на 4 объема буфера) и добавляют в равном количестве 25%-ную взвесь каолина. Смесь встряхивают 20 минут, затем центрифугируют 30 минут при 2500 об/мин для отделения каолина. Обработанная сыворотка разведена 1 : 10. Обработку проводят при комнатной температуре.

Приготовление взвеси каолина. К 100 мл боратного буфера pH 9,0 добавляют при постоянном помешивании 25 г каолина. Полученную массу фильтруют через марлевый фильтр. Эта взвесь может храниться при 4° неопределенно долго.

Экстракция ацетоном. Сыворотку разводят 1 : 10 физиологическим раствором и охлаждают в ледяной бане. Затем добавляют охлажденный ацетон из расчета

* Метод сахарозо-ацетоновой экстракции приведен на странице 101. Последующая обработка антигена протаминсульфатом состоит в следующем. Протаминсульфат растворяют в 0,9%-ном растворе хлористого натрия из расчета 50 мг препарата на 1 мл раствора при обработке экстрагированных антигенов или 25 мг/мл при обработке антигенов, приготовленных методом щелочной экстракции. Протаминсульфат растворяют незадолго до употребления; раствор должен быть прозрачным. Антиген предварительно охлаждают в ледяной бане и добавляют к нему 0,1 объема раствора протаминсульфата, после чего сразу же образуются плотные белые хлопья преципитата. Смесь выдерживают в ледяной бане 30 минут с периодическим встряхиванием и затем центрифугируют на холоде в течение 15 минут при 2500 об/мин. Прозрачную надосадочную жидкость используют как антиген.

** Метод щелочной экстракции. Мышат-сосунов 3—4-дневного возраста заражают в мозг по 0,02 мл вирусом в разведении 10^{-2}—10^{-3}. У погибших через 2—3 суток животных извлекают мозг, который для приготовления антигена используют немедленно, а при необходимости хранения помещают при минус 70°. Из мозга по весу готовят 10%-ную суспензию на боратном буферном растворе pH 9,0 и центрифугируют при 1000 об/мин на холоде в течение часа. Надосадочная жидкость является антигеном в реакции гемагглютинации.

12 объемов ацетона на 1 объем разведенной сыворотки. Экстракцию проводят в ледяной бане 5 минут при периодическом встряхивании. Образовавшийся преципитат осаждают центрифугированием 5 минут при 2500 об/мин, ацетон удаляют. Обработку ацетоном подобным образом повторяют еще дважды, каждый раз применяя свежую порцию ацетона в таком же объеме, что и первый раз. Осадок высушивают при помощи слабого вакуума и растворяют боратным буфером pH 9,0 до исходного объема, эквивалентного разведению сыворотки 1 : 10.

Подготовка эритроцитов. Кровь у лошадей (1—2-летнего возраста) берут из яремной вены в шприц, содержащий 2 мл раствора Альсевера *, и переносят во флакон с указанным раствором из расчета 4 мл раствора на 1 мл взятой крови. Флакон несколько раз встряхивают, чтобы кровь не свернулась. Затем ее фильтруют через марлевый фильтр. Эритроциты осаждают центрифугированием при 2000 об/мин 15 минут и отмывают 3 раза физиологическим раствором, центрифугируя каждый раз 15 минут при 2000 об/мин. Эритроциты хранят в физиологическом растворе при 4°. В реакции используют 0,5%-ную взвесь их.

В связи с тем, что реакция гемагглютинации при африканской чуме однокопытных проявляется лишь при pH 6,4, а вирусный гемагглютинин устойчив только в щелочной зоне pH, то при постановке этой реакции соблюдают следующие условия. Все разведения антигенов (а в РТГА и сывороток) готовят в боратном буферном растворе с pH 9,0. Суспензию же эритроцитов готовят в таком буферном растворе, который при смешивании с равным объемом боратного буфера позволяет получить раствор с pH 6,4. Для этого берут 0,2 М фосфатный буферный раствор.

Приготовление вспомогательных растворов. Для постановки РГА и РТГА используют два типа буферных растворов: а) боратный буфер pH 9,0 для разведения антигенов и сывороток; б) фосфатный буфер для приготовления взвеси крови эритроцитов лошади.

Буферные растворы готовят из химически чистых реактивов: поваренной соли NaCl; борной кислоты H_3BO_3; едкого натрия NaOH; одноосновного фосфорнокислого натрия Na_2HPO_4; двуосновного фосфорнокислого натрия NaH_2PO_4. Вначале готовят 5 молярных растворов.

А. 1,5 М NaCl — 87,689 г на 1 л дистиллированной воды.

Б. 0,5 М H_3BO_3 (борной кислоты) — 30,92 г растворяют в 700 мл горячей дистиллированной воды. Раствор охлаждают до комнатной температуры и затем доводят до 1 л дистиллированной водой.

В. Концентрированный раствор едкого натрия — NaOH, из которого готовят нормальный раствор перед употреблением. Для этого к 500 г NaOH добавляют 500 мл дистиллированной воды, встряхивают при комнатной температуре. Концентрированную щелочь разводят, добавляя к 1 части щелочи 24 части дистиллированной воды, и титруют для определения молярности раствора.

Г. Для получения 0,2 М раствора Na_2HPO_4, 8,7689 г NaCl и 28,3906 Na_2HPO_4 растворяют в 1 л дистиллированной воды.

Д. Для получения 0,2 М раствора NaH_2PO_4, 8,7689 г NaCl и 23,992 г NaH_2PO_4 растворяют в 1 л дистиллированной воды.

Боратный буфер с pH 9,0 готовят из растворов *А*, *Б* и *В*. Раствора *А* берут 80 мл, раствора *Б* 100 мл и раствора *В* 24 мл.

Смесь трех растворов дистиллированной водой доводят до 1 л.

Фосфатный буфер. Для того чтобы приготовить фосфатный буферный раствор, который в равных объемах с боратным буферным раствором pH 9,0 позволял бы получить смесь с окончательным показателем pH 6,4, необходимо

---

* Состав раствора Альсевера:

Декстроза безводная (или глюкоза) — 10,25 г.

Лимоннокислый натрий ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) — 4,0 г.

Лимонная кислота ($H_3C_6H_5C_7 \cdot 7H_2O$) — 0,275 г.

Поваренная соль (NaCl) — 2,1 г.

Дистиллированная вода до 500 мл.

Раствор стерилизуют фильтрованием через фильтр Зейтца или автоклавированием 10 минут при 110°.

соединить 32 объема раствора *Г* и 68 объемов раствора *Д*. Приготовленный таким образом 0,2 М фосфатный буферный раствор используют как разбавитель для приготовления 0,5%-ной суспензии эритроцитов.

Титрование антигенов в РГА. Реакцию ставят при 37°, учитывают ее через $1^1/_2$—2 часа. Разведения антигена делают на боратном буферном растворе pH 9,0. К разведениям антигена добавляют взвесь эритроцитов в кислом фосфатно-буферном растворе, чтобы в момент контакта эритроцитов с антигеном создалась оптимальная концентрация водородных ионов pH 6,4. РГА ставят в объеме 0,8 мл. Получают ряд нисходящих разведений антигена с коэффициентом 2. К каждому разведению антигена (0,4 мл) добавляют 0,4 мл свежеприготовленной 0,5%-ной взвеси эритроцитов лошади на фосфатном буфере. Отдельно ставят контроль эритроцитов без антигена. Пластины осторожно встряхивают для смешивания ингредиентов. Для получения более точных результатов титрование проводят параллельно в двух рядах лунок.

Титром антигена (гемагглютинирующей единицей) считают то максимальное его разведение, в присутствии которого отмечают полную агглютинацию эритроцитов.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). В РТГА титруют сыворотку в различных разведениях при постоянной дозе (8 АЕ в 0,2 мл) антигена. Реакцию ставят в объеме 0,8 мл. Соединяют сыворотку и антиген по 0,2 мл и эритроциты 0,4 мл. Реакция протекает в два этапа. Первый этап — соединение сыворотки и антигена и контакт при 4° в течение 18—20 часов. Второй этап — добавление эритроцитов, экспозиция при 37° и учет результатов. Таким образом, для постановки РТГА требуется два дня. При диагностическом исследовании сыворотку крови, взятую в остром и реконвалесцентном периоде, титруют в одном опыте, чтобы можно было с достоверностью сопоставить титр антител в обеих пробах.

Приготовление рабочей дозы антигена. Рабочей дозой антигена в РТГА является 8 АЕ в 0,2 мл. Антиген титруют в РГА, как указано выше. Исходя из титра антигена готовят разведение, содержащее 16 АЕ в 0,4 мл. Рабочую дозу контролируют дважды: первый раз перед опытом РТГА и второй раз в конце опыта. На таблице 1 дана схема контрольного титрования рабочей дозы антигена.

ТАБЛИЦА 1

Схема контрольного титрования рабочей дозы антигена

Ингредиенты, в мл	16 АЕ	8 АЕ	4 АЕ	2 АЕ	1 АЕ	0,5 АЕ
Боратный буфер, pH 9,0	—	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Разведение антигена, соответствующее 16 АЕ	0,4	0,4	В каждую последующую пробирку переносят по 0,4 мл			
0,5%-ная суспензия эритроцитов в фосфатном буфере	Добавляют во все лунки по 0,4 мл					

Если в 0,4 мл приготовленного разведения антигена содержится больше 16 АЕ антигена (например, 32 АЕ), следует добавить к нему соответствующее количество боратного буфера, то есть развести. Если в 0,4 мл содержится меньше 16 АЕ антигена, необходимо добавить соответствующее количество антигена и снова проверить активность рабочей дозы.

Постановка РТГА. Готовят ряд последовательных разведений сыворотки на боратном буфере pH 9,0 с коэффициентом 2. При исследовании одной и той же сыворотки с несколькими антигенными вариантами удобнее и точнее приготовить разведения сывороток во вспомогательном ряду пробирок, а затем перенести в лунки по 0,2 мл. К 0,2 мл сыворотки каждого разведения добавляют по 0,2 мл антигена в рабочей дозе 8 АЕ. Пластины осторожно встряхивают

и ставят в рефрижератор при 4—6° на 18—20 часов. На следующий день добавляют по 0,4 мл свежеприготовленной взвеси эритроцитов на фосфатном буфере. После встряхивания пластины ставят в термостат при 37°. Реакцию читают через $1^1/_2$ часа.

С целью исключения неспецифических реакций ставят следующие контроли:

контроль эритроцитов на спонтанную гемагглютинацию в трех лунках (к 0,4 мл боратного буфера добавляют 0,4 мл 0,5%-ной взвеси эритроцитов лошади);

контроль на полноту удаления неспецифических гемагглютининов. К 0,2 мл обработанной сыворотки добавляют 0,2 мл боратного буфера и 0,4 мл 0,5%-ной взвеси эритроцитов. Если в этих двух видах контроля будет отмечаться агглютинация, реакцию не учитывают;

контроль рабочей дозы антигена. В пять лунок разливают по 0,4 мл боратного буфера. В первую наливают 0,4 мл антигена в рабочей дозе и делают далее двукратные разведения, перенося отдельными пипетками по 0,4 мл. Для полного соответствия условий, имитирующих основной опыт, антиген соединяют с боратным буфером в два этапа. Из первой лунки переносят антиген в последующие только за 18—20 часов до добавления эритроцитов во всю реакцию. Таким образом, в правой лунке должно содержаться 8 АЕ, во второй — 4 АЕ, в третьей — 2 АЕ, в четвертой — 1 АЕ, а в пятой — меньше одной АЕ. Доза антигена соответствует 8 АЕ, если при контрольном титровании агглютинация наблюдается в четырех лунках.

Титром сыворотки считают ее наивысшее разведение, которое вызывает полную или почти полную задержку гемагглютинации с 8 единицами антигена. Если оказалось, что в опыте было использовано 4 или 16 единиц, то такую реакцию тоже учитывают. Тогда титр сыворотки трансформируют применительно к 8 АЕ, в случае 16 АЕ — увеличивая вдвое, в случае 4 АЕ — уменьшая вдвое.

Положительными считают результаты, если испытуемые сыворотки подавляют РГА в разведении не ниже 1 : 40; слабоположительными, если сыворотки показывают торможение в разведении 1 : 20. Сомнительными считают результаты, подавляющие гемагглютинацию в разведении 1 : 20 (табл. 2).

ТАБЛИЦА 2

Образец протокола РТГА при исследовании парных сывороток с 8АЕ антигена

День от начала заболевания	Разведения сыворотки							
	10	20	40	80	160	320	640	1280
3	0	0	4	4	4	4	4	4
20	0	0	0	0	0	0	0	3

Примечание: 0 — отсутствие агглютинации эритроцитов; 4 — полная агглютинация эритроцитов; 3 — агглютинация на 75%.

В данном примере титры антигемагглютининов в первой и второй сыворотке соответственно равны 1 : 20 и 1 : 640.

Реакция преципитации в агаровом геле. Исходным материалом для приготовления антигена является взвесь ткани селезенки больной лошади в физиологическом растворе хлорида натрия. Указанную взвесь центрифугируют 10 минут при 2000 об/мин, осадок удаляют, к надосадочной жидкости добавляют 0,5% формалина, после чего ее используют в качестве антигена.

Иммунные сыворотки получают от кроликов. Для этого кроликам пятикратно с недельным интервалом вводят внутривенно по 1 мл 10%-ной суспензии селезенки больной лошади, обработанной указанным выше способом, но без добавления формалина. После пятой инъекции животных обескровливают, к сыворотке добавляют мертиолят 1 : 10 000 и хранят при 4° до использования.

Для реакции берут агаровые гели с лунками, приготовленными в чашка Петри. Концентрация агара в геле 1,5%. После внесения в лунки антиген и сывороток чашки оставляют при комнатной температуре. Результаты учитывают через 48 и 72 часа. Положительным результатом исследований считают появление белых полос преципитации между лунками с испытуемым антигеном и иммунной сывороткой при отсутствии таковых с контрольным, заведомо нормальным антигеном, приготовленным тем же способом, что и антиген испытуемый.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ретроспективная диагностика основана на обнаружении комплементсвязывающих, вируснейтрализующих и антигемагглютинирующих антител в сыворотках животных-реконвалесцентов. При помощи РН и РТГА можно определить антигенный тип вируса, вызывавшего в прошлом заболевание.

Более высокие титры РСК и РН регистрируют у животных-реконвалесцентов, однако в отдельных случаях их удается обнаружить и у больных лошадей (обычно через 10 и более дней после заболевания). Антитела, выявляемые при помощи РСК и РДП, легко обнаруживать через 15—20 дней после выздоровления животного. Титр их нарастает к 30—35 дням, после чего постепенно снижается. Надежный ретроспективный диагноз при помощи этих реакций удается ставить в первые 50—60 дней после выздоровления животных.

Титр вируснейтрализующих антител нарастает медленнее и приобретает диагностическое значение не ранее чем через 30—40 дней после выздоровления животного, а максимальные титры обнаруживаются через 2—2½ месяца. Вируснейтрализующие антитела и антигемагглютинины сохраняются в крови до двух лет.

При исследовании испытуемых сывороток в РН и РТГА необходимо иметь хорошо адаптированный (к белым мышам или культуре ткани) вирус различных антигенных типов (для РН) или приготовленные соответствующим образом антигены (для РТГА).

Вируснейтрализующие антитела в сыворотках реконвалесцентов постоянно обнаруживаются в высоких титрах (1 : 4—1 : 64) уже к окончанию температурной реакции. Титр их постепенно нарастает, достигая максимума 1 : 8—1 : 2056 через 30—40 дней после выздоровления, и удерживается на этом уровне в течение 3—4 месяцев и более. Аналогичная динамика вируснейтрализующих антител наблюдается и у животных, привитых живой вакциной.

Комплементсвязывающие антитела у реконвалесцентов появляются с 10—12-го дня, достигают максимума (1 : 32—1 : 256) к 30—35-му дню и обычно исчезают к четвертому месяцу.

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА

Специфическая профилактика осуществляется живыми вакцинами, полученными из нейротропных штаммов, культивируемых в мозгу белых мышей или в перевиваемой линии клеток MS.

Для приготовления вакцины используют семь типов вируса чумы однокопытных, отличающихся в антигенном отношении. Жеребят вакцинируют в возрасте 6 месяцев, жеребых кобыл — за две недели до выжеребки и второй раз через 10 месяцев. Взрослых животных в местности, неблагополучной по данной болезни, вакцинируют ежегодно за 1—2 месяца до появления кровососущих насекомых. Поствакцинальный иммунитет наступает в среднем через 21 день и продолжается в течение 6—12 месяцев (по данным некоторых исследователей, до 5 лет).

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

Динамика поствакцинальных антител аналогична динамике антител у реконвалесцентов. Комплементсвязывающие антитела, как правило, появляются через 21—28 дней, достигают максимума 1 : 16—1 : 96 к шестой неделе и постепенно исчезают в течение последующих двух месяцев. Вируснейтрализующие антитела по отношению некоторых штаммов (при вакцинации поливакцинной) также появляются через 21 день. К исходу второго месяца обычно отмечают наличие антител против всех штаммов; антитела сохраняются до 2 лет и более.

При серологической оценке поствакцинального иммунитета, особенно в отношении отдельных антигенных типов поливакцины, применяют реакцию нейтрализации, определяя наличие антител против каждого штамма, входящего в состав живой поливалентной вакцины. Для этого испытуемую пробу иммунной сыворотки титруют в перекрестной реакции нейтрализации с типоспецифическими антигенами или определяют индекс нейтрализации исследуемой сыворотки против каждого из штаммов вируса. Для реакции необходимо иметь типоспецифические моноштаммные антигены из прототипных штаммов вируса, культивируемых в мозгу мышей или культуре ткани. Антигены лиофилизируют или сохраняют при минус 70°.

Имеются сообщения о том, что антигенная активность вакцинных штаммов (определяемая индексом нейтрализации моновалентных сывороток) соответствует их иммуногенной активности. Поэтому уровень вируснейтрализующих антител у вакцинированных лошадей характеризует напряженность поствакцинального иммунитета. Обычно наличие антител (даже в невысоком титре — до 1 : 4) против того или иного штамма характеризует устойчивость животного. Однако в некоторых случаях животные оказываются устойчивыми к контрольному заражению даже при отсутствии в их сыворотке гомологичных антител. По-видимому, определенными защитными свойствами обладают антитела против гетерологичных штаммов. Отмечено, однако, что в результате вакцинации у лошадей развивается невосприимчивость к заражению в сроки, предшествующие появлению гуморальных антител.

РИНОПНЕВМОНИЯ ЛОШАДЕЙ
(RHINOPNEUMONITIS EQUORUM)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Риноппевмония лошадей (вирусная риноппевмония лошадей, вирусный аборт лошадей, ринотрахеит лошадей) — остро протекающая контагиозная эпизоотическая болезнь лошадей, характеризующаяся у молодых лошадей и жеребят катарально-слизистым ринитом (иногда пневмонии), у кобыл — абортами в последний период жеребости и преждевременной выжеребкой.

Риноппевмония установлена во многих странах Европы, Азии, Северной Африки. Имеются сообщения о появлении ее в некоторых районах Украинской ССР. В большинстве случаев риноппевмония протекает в виде энзоотий и эпизоотий. В неблагополучных хозяйствах могут абортировать до 40—90% жеребых кобыл. Много жеребят рождаются нежизнеспособными и погибают в первые дни жизни.

Болезнь проявляется кратковременным повышением температуры тела до 39,5—40°, развитием ринита с серозными (иногда слизистыми) истечениями из носовой полости; изредка развивается пневмония. У кобыл риноппевмония протекает, как правило, бессимптомной. Жеребые кобылы абортируют на 8—10-м месяце жеребости, но каких-либо патологических изменений у них не находят. У абортировавших плодов при вскрытии отмечают многочисленные некротические очаги в печени и петехии в других внутренних органах.

ВИРУС

Риноппевмонию лошадей вызывает сферический ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству герпес-вирусов. Частицы вируса окружены липопротеиновой оболочкой, размер их — 150—200 ммк. В ядрах инфицированных клеток вирус образует характерные тельца-включения типа А Каудри. Обнаружение телец-включений имеет важное диагностическое значение.

Устойчивость к факторам химического и физического порядка. Вирус малоустойчив во внешней среде. Прогревание при температуре 56° инактивирует вирус в течение 5—10 минут. Он легко инактивируется эфиром, хлороформом, дезоксихолатом натрия, 0,35%-ным раствором формальдегида. Обработка антибиотиками (пенициллин, стрептомицин, нистатин) не оказывает влияния на активность вируса.

Хранение и консервирование вируссодержащих материалов. В замороженной инфицированной ткани при минус 18—20° вирус сохраняет активность 1½—2 года. В тканевых суспензиях, приготовленных на солевых буферных растворах (pH 7,0—7,4) с 20% нормальной лошадиной сыворотки, вирус сохраняется в активном состоянии при 4° не менее двух недель; в буферных растворах без добавления сыворотки вирус быстро инактивируется. Вирус хорошо консервировать глицерином. В 50%-ном растворе его при 4° вирус остается активным в течение 5 месяцев.

Локализация в организме. В наиболее высоких концентрациях активный вирус содержится в печени, легких и селезенке абортированных плодов или погибших новорожденных жеребят; его часто удается обнаружить и в других органах и тканях, но в значительно меньших титрах. При рините у жеребят и молодых лошадей вирус активно размножается и может быть выделен

на протяжении более двух недель со слизистых оболочек носовых путей. В этот период его можно легко обнаружить в истечениях из носовой полости. В секретах глаз, в крови, фекалиях и во внутренних органах выявить вирус не удается.

Антигенные свойства. Вирус риноплевмонии обладает выраженной антигенной активностью. У переболевших животных в крови обнаруживают комплементсвязывающие и вируснейтрализующие антитела. Комплементсвязывающий антиген можно разделить на S-антиген (растворимый антиген) и V-антиген (вирусный антиген). Некоторые штаммы вируса, выделенные в разных странах, имеют антигенные различия, которые трудно уловить в реакции связывания комплемента, но эту дифференциацию легко осуществить путем постановки перекрестной реакции нейтрализации с использованием типоспецифических гипериммунных сывороток, полученных на кроликах.

Антигенная вариабельность. Вирус риноплевмонии имеет два серологических типа: японский Н-45 и американский Кентуки Д. В. Голландии, Швейцарии, Италии, Южной Африке и Малайе обнаружены антитела к типу Кентуки Д; в Японии, Новой Зеландии, Канаде и на Тайване обнаружен более высокий титр антител к типу Н-45. В Норвегии, Швеции, ФРГ, Англии, Индии и Аргентине обнаружены антитела в равной мере к японскому и американскому серотипам.

Гемагглютинирующая активость. Вирус обладает гемагглютинирующими свойствами. Он агглютинирует эритроциты лошади и морской свинки при 4 и 37°. Гемагглютинин не стоек и инактивируется при 56°. Он обычно не нейтрализуется сыворотками лошадей-реконвалесцентов, но нейтрализуется кроличьими гипериммунными сыворотками.

Спектр патогенности. В естественных условиях болеют только лошади. Человек, крупный рогатый скот, свиньи к вирусу риноплевмонии невосприимчивы. К экспериментальной инфекции высокочувствительны молодые жеребята, которые заболевают при внутривенном, интраназальном или интратрахеальном введении материала, содержащего вирус, а также кобылы на 7—10-м месяцах жеребости, которых можно заразить при введении вирусного материала внутривенно, интраназально или непосредственно в матку.

Из лабораторных животных к вирусу чувствительны беременные морские свинки, которые абортируют при интраперитонеальном заражении, хомячки 3—4-дневного и 4—6-недельного возраста, а также мышата-сосуны, которые заболевают при внутрибрюшинном, интрацеребральном или подкожном введении вирусного материала.

Культивирование в лабораторных условиях. Для культивирования и пассирования вируса в лабораториях обычно используют мышат-сосунов и хомячков (внутрибрюшинное заражение), куриные эмбрионы 8—12-дневного возраста (заражение в желточный мешок, аллантоисную полость или амнион), а также культуры клеток почечной ткани различных животных (лошади, теленка, поросенка, ягненка) или их эмбрионов. Наиболее чувствительна культура клеток почки лошади, в особенности культура клеток почки молодого жеребенка. Вирус размножается также в культурах некоторых перевиваемых линий клеток (HeLa, КВ, «Детройт-6»).

Размножение вируса в культурах клеток сопровождается развитием характерных цитопатологических изменений и появлением телец-включений, которые можно обнаружить при гистологическом исследовании окрашенных препаратов.

При выделении вируса многие штаммы требуют предварительной адаптации к той или иной системе культивирования. Особенно это относится к культивированию вируса на хомячках и мышатах-сосунах, а также на куриных эмбрионах.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Основными методами ранней лабораторной диагностики вирусной риноплевмонии лошадей являются гистологическое исследование патологических материалов от абортированных плодов и выделение и идентификация вируса.

При использовании для гистологического исследования замороженных срезов предварительный диагноз может быть поставлен в день взятия материала. Данные гистологического исследования подтверждаются выделением вируса и серологическими исследованиями.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материала. Наиболее подходящим материалом для выделения вируса являются печень, легкие и селезенка абортированных плодов или погибших новорожденных жеребят. При рините от больных животных ватными тампонами берут пробы выделений из носовой полости. При наличии у взрослых лошадей параличей для исследования берут кусочки головного и спинного мозга.

Вскрытие абортированных плодов и павших животных производят в возможно более ранние сроки. Кусочки органов и тканей весом 30—50 г вырезают с соблюдением правил асептики и сохраняют до исследования при 4° или консервируют 50%-ным забуференным раствором глицерина pH 7,4. Ватные тампоны с пробами носовых выделений сразу помещают в пробирки с 2 мл раствора Хэнкса или Эрла с 20% нормальной лошадиной сыворотки и антибиотиками.

В лаборатории из различных участков проб печени, легких, селезенки отбирают образцы для гистологического исследования. Для вирусологического исследования готовят 10%-ную суспензию материала на растворе Хэнкса или Эрла и надосадочную жидкость используют для исследования. Носовые тампоны отжимают, а жидкость обрабатывают по такой же методике. Все материалы до использования хранят в замороженном состоянии при температуре минус 20—40°.

Для выделения вируса из патологических материалов можно использовать культуры клеток, 8—12-дневные, куриные, эмбрионы, хомячков и мышат-сосунов 3—4-дневного возраста. Чаще применяют культуры клеток, используя для их заражения суспензию из образцов легких и печени.

Выделение вируса в культурах клеток. При первичном выделении вирус ринопневмонии хорошо репродуцируется в культурах клеток почечной ткани животных различных видов и особенно в первичной монослойной культуре клеток почки лошади. Если этой ткани нет, для выделения вируса можно использовать культуры клеток почечной ткани телят, поросят или ягнят, хотя для отдельных штаммов вируса требуется предварительная адаптация в течение 2—3 пассажей.

В связи с тем, что при первичном выделении вируса ринопневмонии специфическое цитопатическое действие может проявляться на 5—6-й день после инокуляции, пробирки лучше помещать во вращающийся барабан для культур ткани, культивирование

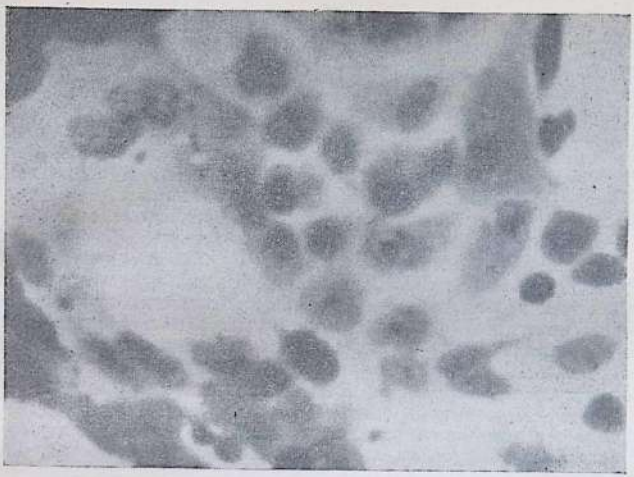


Рис. 1. Внутриядерные тельца-включения (окраска гематоксилин-эозином)×300 (по Пламмеру).

в котором сокращает сроки появления цитопатических изменений.

Для предотвращения неспецифического токсического действия инокулируемого материала, иногда имеющего место при первичном выделении вируса, через 2 часа после заражения меняют среду.

Характеристика цитопатических изменений. Первоначальные изменения выражаются появлением округлых клеток, обладающих повышенной рефрактильностью, особенно по краям монослоя. Затем монослой разрушается, уцелевшие клетки агрегируются в небольшие скопления, напоминающие гроздь винограда. При цитологическом исследовании окрашенных препаратов обнаруживают изменения, выражающиеся в дезинтеграции цитоплазмы и ядер. В препаратах, окрашенных гематоксилин-эозином, видны характерные внутриядерные ацидофильные тельца-включения типа *А* Каудри, часто обнаруживают маргинацию хроматина у ядерной оболочки и образование гало (рис. 1).

Контрольные культуры остаются без изменений на протяжении всего периода наблюдения.

При проведении пассажей цитопатические изменения появляются быстрее, через 24—72 часа. Максимальные титры вируса (10^5—$10^{7,5}$ $ТЦД_{50}$/мл) обычно обнаруживают через три дня после инокуляции материала. Максимальная комплементсвязывающая активность (1 : 4—1 : 8) культурального вируса обычно проявляется на 4—5-й день культивирования.

Выделение вируса на куриных эмбрионах. Используют куриные эмбрионы 8—12-дневного возраста. Испытуемый материал (лучше смесь легочного и печеночного материалов от абортированных плодов) вводят по 0,2 мл в желточный мешок, в аллантоисную полость или в амнион. Зараженные эмбрионы инкубируют в

термостате при 37° на протяжении четырех дней, ежедневно проводя овоскопию. Гибель эмбрионов в первые сутки после заражения считается неспецифической. На четвертый день культивирования эмбрионы вскрывают. Для последующих пассажей используют печень, сердце и мозг эмбриона.

Некоторые штаммы вируса ринопневмонии лошадей требуют для адаптации к эмбрионам нескольких перемежающихся пассажей: хомячки или мышата-сосуны — куриные эмбрионы. После 3—4 альтернативных пассажей вирус обычно легко пассируется при серийных пересевах на хориоаллантоисной оболочке.

Размножение вируса в куриных эмбрионах сопровождается развитием внутриядерных телец-включений в клетках эктодермы и мезодермы. Эти включения могут быть обнаружены при гистологическом исследовании препаратов, приготовленных из пораженных тканей, после фиксации их абсолютным метиловым спиртом или жидкостью Боуэна и окраски гематоксилинэозином. На хориоаллантоисной оболочке эмбрионов часто видны макроскопически воспалительные «оспинки». Адаптированный к куриным эмбрионам вирус может нейтрализоваться иммунной сывороткой, что позволяет использовать их для постановки реакции нейтрализации.

Выделение вируса на лабораторных животных. Из лабораторных животных для выделения вируса ринопневмонии лошадей используют беременных морских свинок, хомячков и мышат-сосунов 3—4-дневного возраста.

Беременных морских свинок заражают интраперитонеально, вводя по 0,5—1,0 мл исследуемого материала. В период между 2 и 20-м днями после заражения свинки абортируют или погибают. При вскрытии обычно обнаруживают некрозы в печени, петехии в легких, гастроэнтерит. Вирус легко удается выделить из абортированного плода и печени.

Хомячков 3—4-дневного возраста заражают интрацеребрально (доза заражения 0,03 мл), подкожно или внутрибрюшинно (доза заражения 0,1—0,2 мл). Через 12—24 часа после интрацеребрального заражения хомячки погибают. При гистологическом исследовании у них обнаруживают энцефаломиелит и наличие характерных телец-включений. После подкожного и внутрибрюшинного заражения хомячки заболевают через 5—8 дней, причем гибнут не все животные. При вскрытии находят гепатит. При гистологическом исследовании в клетках ткани видны характерные тельца-включения. Вирус удается выделить из печени и легких.

Многие штаммы вируса требуют предварительной адаптации, для чего следует проводить 2—3 слепых пассажа. Это особенно необходимо делать при адаптации вируса к хомячкам 4—6-недельного возраста.

Мышата-сосуны заболевают при различных методах заражения (интрацеребральное, интраназальное, внутрибрюшинное). Картина заболевания у них аналогична таковой, наблюдаемой у хомячков 3—4-дневного возраста, однако не все штаммы вируса

удается адаптировать к мышатам, несмотря на длительные слепые пассажи.

При наличии заболевания у зараженных лабораторных животных вирус сравнительно легко можно выделить из печени и легких, исследуя эти материалы в культурах клеток или на куриных эмбрионах.

Биопроба на естественно восприимчивых животных. Для экспериментального заражения с целью идентификации вируса риноптневмонии используют кобыл на 7—10-м месяцах жеребости и молодых жеребят. Кобыл заражают, вводя материал внутривенно, интраназально или непосредственно в матку; жеребятам материал вводят внутривенно, интраназально или интратрахеально. В качестве материала для заражения используют свободную от бактериальной микрофлоры суспензию легочной и печеночной ткани абортированных плодов или фильтрат ее, а также культуральный вирусный материал или материал, собранный от зараженных куриных эмбрионов.

При внутривенном и интраназальном заражении первые признаки болезни у кобыл появляются через 20—22 дня после введения материала, при заражении непосредственно в матку — на 3—9-е сутки. Вначале у них наблюдается незначительное повышение температуры (39,5—40°), поражение слизистых оболочек верхних дыхательных путей, лейкопения. Затем происходит аборт, после чего симптомы болезни затухают. При внутривенном заражении все признаки болезни проявляются почти одновременно. Аборт можно наблюдать через 14—76 суток после заражения. Активный вирус можно выделить из тканей и органов абортированного плода, особенно из печени и легких. При гистологическом исследовании этих органов обычно обнаруживают характерные изменения и внутриядерные тельца-включения.

У жеребят, зараженных различными методами, через 2—3 дня после введения материала развивается катаральная риноптневмония, которая выражается кратковременной (1—4 дня) легкой лихорадкой (39,5—40°), появлением ринита с серозными, иногда слизистыми истечениямч из носа; изредка отмечается поражение нижних отделов респираторного тракта. У большинства жеребят наблюдают увеличение подчелюстных лимфатических узлов. В начале появления клинических признаков при исследовании крови можно обнаружить лейкопению. Со слизистых оболочек носовых путей от зараженных жеребят вирус удается выделять на протяжении двух недель.

От зараженных в экспериментальных условиях животных вирус может быть легко выделен при исследовании материалов в культурах клеток или на куриных эмбрионах.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Для идентификации вируса риноптневмонии лошадей используют серологические методы (РСК, РН, РГА и РТГА), данные гистологических исследований и результаты обнаружения характерных внутриядерных телец-включений. РСК, РГА и РТГА и гистологическое исследование позволяют сравнительно быстро (6—24 часа) подтвердить наличие в исследуемом материале вируса риноптневмонии.

Исследование на наличие телец-включений. Вирус риноптневмонии лошади вызывает образование характерных внутриядерных эозинофильных телец-вклю-

чений в тканях и органах абортированных плодов (печень, легкие, селезенка, слизистые оболочки носовой полости), в клетках печени хомячков, мышат-сосунов или морских свинок, зараженных материалом от больных животных, а также в клетках инфицированных культур ткани и куриных эмбрионов. Наиболее подходящим для гистологического исследования материалом является ткань печени. При микроскопии в положительных случаях обнаруживают многочисленные некротические фокусы и эозинофильные внутриядерные тельца-включения в окружающих клетках печени.

Аналогичные тельца-включения можно обнаружить при исследовании хорионаллантоисной оболочки инфицированных куриных эмбрионов и культур клеток. Появление телец-включений в культурах ткани и куриных эмбрионах предотвращается специфической антисывороткой.

Обнаружение характерных ацидофильных внутриядерных телец-включений имеет важное диагностическое значение.

Серологическая идентификация

Реакцию связывания комплемента используют для обнаружения комплементсвязывающего антигена вируса в патологическом материале и в сыворотках крови больных и переболевших животных. При помощи РСК можно проводить количественное определение специфических антител, но этот метод чаще используют для ретроспективной диагностики.

Для индикации вирусного антигена в патологическом материале обычно используют ткани абортированного плода, которые замораживают и хранят при минус 20° до гистологического подтверждения диагноза. Антиген для РСК готовят из легких или печени абортированного плода, образцы которых при хранении в замороженном состоянии сохраняют активность до 18 месяцев. При определении комплементсвязывающих антител в качестве антигена используют печень хомячков, зараженных адаптированным к ним штаммам вируса и погибших через 18—24 часа после заражения.

Для приготовления антигена замороженный материал разрезают на кусочки 3×5 мм и несколько раз промывают холодным физиологическим раствором для удаления гемоглобина. Берут 3—5-кратные объемы раствора. Далее материал гомогенизируют с физиологическим раствором 1:5 и для более полной элюции вирусного антигена подвергают 3—6-кратному замораживанию. Материал до использования хранят при минус 20°. Непосредственно перед постановкой реакции суспензию размораживают, центрифугируют 30 минут при 3000 об/мин, надосадочную жидкость собирают и используют в качестве антигена.

Специфическую антисыворотку получают на кроликах, которых иммунизируют внутривенно, вводя материал, приготовленный из печени хомячков, зараженных смертельной дозой вируса, или из легких абортированных плодов, полученных из хозяйств, где ринопневмония была ранее установлена среди лошадей на основании полного комплекса лабораторно-диагностических вирусологических исследований. Можно использовать для иммунизации кроликов культуральный вирус или вирус, выращенный на куриных эмбрионах.

Схема иммунизации: кроликам с интервалом в 3—5 дней делают шесть инъекций вирусного материала, вводя его каждый раз внутривенно по 1 мл. Через 6 дней после последней инъекции кроликов обескровливают, полученную сыворотку смешивают и хранят до использования в замороженном состоянии. Перед постановкой РСК сыворотку размораживают, разводят 1 : 5 физиологическим раствором и прогревают 30 минут при 56°. Сыворотки крови лошадей инактивируют неразведенными, прогревая их в течение 30 минут в водяной бане при 60°.

РСК ставят на холоде по методу Колмера. Для этого готовят двукратные разведения антигена. Сыворотку используют в разведении 1 : 5. Для определения единицы антигена положительные сыворотки берут в разведении 1 : 10. Все компоненты берут в объеме 0,5 мл. Связывание производят в течение ночи при 4°, после чего добавляют 1 мл сенсибилизированной суспензии эритроцитов и инкубируют 30 минут в водяной бане при 37°. Единица антигена в значительной степени зависит от титра сыворотки. При постановке РСК для определения титра антител в сыворотках используют 3—4 единицы антигена.

Материал из легких абортированного плода обычно реагирует в РСК в разведении 1 : 8—1 : 16, из печени — 1 : 2.

Реакции нейтрализации. При наличии адаптированных штаммов вируса она может быть поставлена в культуре ткани, на куриных эмбрионах, хомячках или мышатах-сосунах (в зависимости от адаптации вируса). В настоящее время наиболее часто реакцию ставят в культурах почечной ткани лошади или теленка.

В качестве антигена для постановки реакции нейтрализации в культуре клеток используют вирус, хорошо адаптированный к ней. Перед постановкой реакции культуральный вирус центрифугируют 30 минут при 2500—3000 об/мин. Для сохранения активности его хранят до использования в замороженном состоянии при минус 30—40°. В качестве антигена для проведения реакции нейтрализации на хомячках или мышатах-сосунах используют гемогенат печени хомячков или мышат, погибших через 18—24 часа после заражения вирусом. Суспензию гомогената печени (20%-ную) на забуференном физиологическом растворе (pH 7,0—7,2) центрифугируют 20 минут при 3000 об/мин, надосадочную жидкость отсасывают и добавляют к ней 20% нормальной сыворотки лошади, проверенной на отсутствие антител к вирусу ринопневмонии. Полученный антиген хранят при 4°. При этих условиях он сохраняет активность без снижения титра в течение 2 недель.

Для идентификации вновь выделяемых вирусов при помощи РН в лаборатории необходимо иметь заведомо активную специфическую антисыворотку к вирусу ринопневмонии лошадей. Такую сыворотку для РН готовят гипериммунизацией кроликов по той же схеме, как и для получения сыворотки для РСК. Полученная сыворотка обычно нейтрализует 10^8—10^9 LD_{50} вируса ринопневмонии.

Перед постановкой реакции нейтрализации с кроличьей гипериммунной сывороткой ее разводят раствором Хэнкса или поддерживающей средой для тканевых культур в отношении 1 : 10 и инактивируют прогреванием в водяной бане 30 минут при 56°. При постановке реакции с лошадиными сыворотками их предварительно инактивируют, прогревая неразведенными в течение 30 минут при 62°.

Реакцию нейтрализации в культуре клеток ставят по общепринятой методике. Для идентификации выделенного вируса реакцию ставят с постоянной дозой гипериммунной сыворотки (обычно в разведении 1 : 20) и серийными десятикратными разведениями вируса. В контроле вирус титруют в присутствии разведенной 1 : 20 нормальной кроличьей сыворотки. Результаты реакции учитывают на 2, 3 и 5-е сутки по цитопатогенному действию, определяя индексы нейтрализации по разнице титров вируса с гипериммунной и нормальными сыворотками и вычисляя по методу Рида и Менча или Кербера.

При постановке РН на хомячках или мышатах-сосунах используют штаммы вируса, адаптированные к этим животным. Реакцию ставят с серийными десятикратными разведениями вирусного материала и неразведенной сывороткой, смешиваемыми в равных объемах. После контакта в течение одного часа при комнатной температуре смесь в дозе 0,2 мл вводят мышатам или хомячкам внутрибрюшинно. Контрольным животным вводят смесь вируса с нормальной лошадиной сывороткой. За животными наблюдают в течение 7 дней. Если в испытуемых сыворотках есть специфические антитела, животные выживают, а контрольные погибают через 3—5 дней после инокуляции при наличии характерных изменений в печени. Аналогичным образом ставят реакцию нейтрализации на куриных эмбрионах, используя штаммы вируса, адаптированные к куриным эмбрионам. Смесь вируса с сывороткой после предварительной инкубации в течение 1 часа при 37° вводят на хорионаллантоисную оболочку куриных эмбрионов 8—12-дневного возраста в дозе 0,2 мл и инкубируют их при 37° в течение 4 дней. О защитном действии сыворотки судят по сохранению жизнеспособности эмбрионов.

Реакцию гемагглютинации ставят с эритроцитами лошади или морской свинки. С эритроцитами лошади реакция более чувствительна и проходит более четко. Предварительно эритроциты могут быть формалинизированы по способу Семерджиева или методу Гольда, что дает возможность сохранять их и использовать до 75—90 суток.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

При дифференциальной диагностике следует исключить инфлюэнцу и вирусный артериит лошадей, а также аборты бактериальной природы.

От вирусов инфлюэнцы и артериита лошадей вирус риноппевмонии отличается по антигенным свойствам, а также способностью вызывать появление характерных эозинофильных внутриядерных телец-включений (вирус инфлюэнцы и вирус артериита лошадей такой способностью не обладают).

От инфлюэнцы гриппа лошадей вирусную риноппевмонию дифференцируют при помощи РТГА, а также по отсутствию при инфлюэнце телец-включений, характерных для риноппевмонии.

Для дифференциации риноппевмонии от артериита используют РСК, РН, а также отсутствие при артерините телец-включений.

При дифференциации от абортов бактериальной этиологии, которую проводят на основании результатов бактериологического исследования, следует иметь в виду, что при вирусной риноппевмонии иногда в 25—45% случаев выделяют различную сопутствующую и секундарную микрофлору.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагноз на прошедшую инфекцию обычно ставят при помощи РН в культуре ткани, на куриных эмбрионах, хомячках или мышатах-сосунах, определяя титры антител в сыворотках крови лошадей или индексы нейтрализации. Для ретроспективной диагностики используют и РСК, но в настоящее время она имеет меньшее значение, чем РН. Лучше исследовать парные сыворотки: одну, взятую в начале болезни, другую — через 3—6 недель. Реакция нейтрализации обычно дает более высокий процент положительных результатов, чем РСК. При проведении регулярных обследований отмечают значительные колебания титров антител, несмотря на отсутствие у животных клинических признаков болезни.

Появление комплементсвязывающих антител отмечают на 7—10-й день после заражения, титры их нарастают и достигают максимума к 14—20-му дню, удерживаются на этом уровне до 30-го дня, а затем постепенно снижаются. Через 3—6 месяцев после заражения большинство взрослых животных реагируют отрицательно. У жеребят комплементсвязывающие антитела сохраняются в течение 1—4 месяцев после перенесенной болезни. Титры комплементсвязывающих антител могут колебаться от 1 : 4 до 1 : 64 и выше, но наиболее часто не превышают 1 : 8—1 : 16; титры комплементсвязывающих антител 1 : 4 и выше, а также нейтрализующих 1 : 100 и выше указывают на длительное течение болезни.

Титры антител в РСК 1 : 16 и выше свидетельствуют о недавней инфекции. Результаты РН при оценке недавно перенесенной болезни менее точны, чем результаты РСК, так как вируснейтрализующие антитела появляются позднее и удерживаются на одном уровне более длительно (до года и дольше). На протяжении 2—3 недель после инфицирования они могут с нулевого уровня достигнуть титра 1 : 100 и выше и удерживаться без существенных колебаний на протяжении 6—12 месяцев.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИММУНИТЕТА

Иммунитет у переболевших животных длится 1—2 года, однако значительные колебания титров вируснейтрализующих и комплементсвязывающих антител указывают на частое наличие скрытой реинфекции или субклинической инфекции.

Инактивированные и живые вакцины против риноппевмонии лошадей не вышли за рамки испытаний. Для активной профилактики болезни применяют формолвакцины, приготовленные из суспензии вируссодержащих тканей от абор-

тированных плодов, или зараженных куриных эмбрионов, или хомячков. Установлено, что при подкожном или внутрикожном введении такая вакцина вызывает появление комплементсвязывающих антител, максимальные титры которых отмечают через 2—4 недели после вакцинации. Иммуногенность этих вакцин, динамика появления и исчезновения комплементсвязывающих антител у вакцинированных животных и связь между титрами антител и иммунитетом изучены недостаточно. Методы серологической оценки поствакцинального иммунитета не разработаны.

Для иммунизации лошадей предложен частично аттенуированный вирус ринопневмонии лошадей, адаптированный к хомячкам. Препарат вводится интраназально. Он может вызывать небольшой подъем температуры, легкий ринит и лейкопению. Невакцинированные лошади могут инфицироваться от иммунизированных животных.

Препарат не следует вводить лошадям с жеребостью более 5 месяцев во избежание абортов.

ГРИПП ЛОШАДЕЙ
(INFLUENZA EQUORUM)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Грипп лошадей (заразный катар верхних дыхательных путей) — острая высококонтагиозная болезнь лошадей, характеризующаяся кратковременной лихорадкой, угнетением, конъюнктивитом, слезотечением, катаром верхних дыхательных путей, сухим отрывистым глубоким и болезненным кашлем. Болезнь сопровождается ларинготрахеитом, бронхитом, а в тяжелых случаях пневмонией.

Эпизоотии гриппа среди лошадей описаны задолго до выделения вирусов. Первое упоминание о «гриппе» лошадей в литературе появилось в 1688 г. в Англии и Ирландии. Болезнь началась внезапно, характеризовалась обильными выделениями из носовой полости, коллапсом и сопровождалась гибелью тысяч лошадей. Во время пандемии гриппа 1728—1733 гг. в Европе сообщалось об одновременном заболевании лошадей и других домашних животных. В период пандемии гриппа 1781—1782 гг., прошедшей по всей Азии, Европе и Америке, появились сообщения о протекавшей в тот же период эпизоотии лошадей. Зимой 1872/73 г. в Нью-Йорке, Вашингтоне и других городах США одновременно заболели гриппом почти все лошади. В 1956 г. вспышку гриппа среди лошадей наблюдали в Южной Швеции, в Дрездене, в Восточной Европе. В Чехословакии Савиновой и Тумовой был выделен вирус А (Equi 1) Прага/56.

В 1959 г. в Москве от больных лошадей в период второй волны пандемического гриппа З. В. Домрачева выделила несколько штаммов, одни из которых были родственны чехословацкому вирусу A/Equi 1/Прага/56, а другие были идентифицированы как вирус гриппа А2 (человека).

Подробно описаны эпизоотии, связанные с распространением вируса A/Equi 2/Miami/63 в Америке, Франции (1966), Англии (1965), Швейцарии (1966), ФРГ (1967). В 1963 г. эпизоотия гриппа в США носила взрывной характер и за 5 месяцев распространилась на все части страны, поражая лошадей всех возрастов. В 1969 г. во время эпизоотии гриппа лошадей в СССР Г. А. Иванова, Н. Г. Осидзе, Н. В. Лихачев и В. Н. Сюрин выделили несколько эпизоотических штаммов гриппа лошадей, в антигенном отношении родственных вирусу гриппа A/Equi 2 Miami/63.

Инкубационный период продолжается 1—3 дня. На вторые сутки температура внезапно повышается до 39—40° и выше, держится на высоком уровне до 4—5 суток. Дыхание и пульс становятся частыми, аппетит уменьшается или исчезает, появляются сухой кашель и одышка. Впоследствии кашель становится глухим и болезненным, дыхание — жестким, в легких прослушиваются бронхиальные хрипы, крепитация. Отмечают гиперемию, влажность и отечность конъюнктивы, на 1—3-й день болезни появляется серозное истечение из носовой полости, которое сменяется серозно-слизистым и даже слизисто-гнойным. При пальпации отмечают болезненность трахеи, увеличение и чувствительность регионарных лимфатических узлов, которые никогда не абсцедируют.

При вскрытии павших лошадей отмечают гиперемию конъюнктивы и слизистой оболочки носовой полости, набухание и отечность ее, наличие серозных, слизисто-гнойных и реже гнойных выделений. В легких обнаруживают разной величины пневматические участки розовато-серого, серо-красного или серова-

того цвета. При затяжном течении болезни они сливаются. На разрезе по женного участка легкого на общем фоне розового или темно-розового цв выделяются различной величины и формы беловатые и сероватые очажки, которых выступает полужидкое беловато-серое, серозно-слизистое или слизис гнойное содержимое.

ВИРУС

Согласно современной классификации, вирус гриппа лошадей относит к семейству миксовирусов типа А (Myxovirus influenzae A. equi). Это РНК-со держащий вирус, сходный по морфологии и химическому составу с вирусам гриппа человека, свиней и птиц.

Устойчивость этого вируса к физико-химическим факторам и локализаци его в организме примерно такие же, как у вируса гриппа человека типа А В литературе имеются разноречивые сведения по сравнительной устойчивости, морфологии, ингибиторорезистентности, гемагглютинирующим и другим свойст вам между вирусами гриппа человека, свиней, птиц и лошадей.

Антигенная вариабельность. Существует два подтипа вируса гриппа лошадей, отличающихся по V-антигену: A/Equi 1/Praga/56 и A/Equi 2, Miami/63. Большое количество штаммов A/Equi 2/ было выделено от скаковых лошадей в районах Северной и Южной Америки, затем в Швейцарии, Франции, ФРГ, Италии. Высказано мнение о том, что вирус Equi 2 ранее не был зарегистрирован среди лошадей. В 1967 г. Камерун и др. показали, что вирус A/Equi/2 патогенен для естественного хозяина — пони /Equus Caballus/ из дикого стада. Возможно, прототипом этого подтипа в природе явились штаммы вируса гриппа человека типа А или диких животных некоторых видов. Второй подтип A/Equi 2, Miami/63/ выделен в последнюю вспышку гриппа лошадей на территории Украинской ССР. Выделенные полевые штаммы обнаружили с ним четко выраженное антигенное родство (Г. А. Иванова, Н. Г. Осидзе и др., 1969).

Спектр патогенности. Вирусы гриппа лошадей патогенны для человека. Вирусом A/Equi 2, Miami/63 удавалось заражать людей, антитела в сыворотке которых к вирусу гриппа лошадей были обнаружены заружебными и отечественными исследователями. По данным Г. А. Ивановой и др. (1969), у некоторых лиц, близко соприкасающихся с больными гриппом лошадьми, развивалось клиническое заболевание гриппом и обнаружены антигемагглютинины к эпизоотическим штаммам, относящимся к гриппу A/Equi 2, Miami/63.

Вирус гриппа человека может развиваться в организме лошадей. Доказательством служат следующие наблюдения. С 1955 г. в отечественной и зарубежной литературе стали появляться сообщения о нахождении комплемент-связывающих антител к гриппу типа А в сыворотке лошадей при инфекционных заболеваниях, сопровождающихся кашлем. В 1957 г. в Харькове сразу же после заболевания персонала гриппом возникла вспышка гриппа и среди лошадей, у которых после переболевания были обнаружены антигемагглютинины к вирусам A_0, A_1 и A_2 (М. Г. Гайдамака и др., 1958). В 1959 г. в Москве отмечали много случаев одновременных заболеваний гриппом людей и лошадей (З. В. Домрачева, 1961). Был установлен факт существования у лошадей гриппоподобных заболеваний, вызываемых человеческим вирусом. Антитела к вирусам A/Equi 1/56 и A_2 были обнаружены в РТГА и РСК в сыворотках лошадей в Чехословакии, Румынии, ФРГ, ГДР, Финляндии, Дании, Голландии, Польши, СССР, Японии, США, Австралии.

В 1961 г. В. М. Стаханова обнаружила антигемагглютинины к вирусу A_2 в 47% случаев в сыворотках лошадей и 15% в сыворотках коров.

Гемагглютинирующие свойства. По способности агглютинировать эритроциты животных различных видов полевые штаммы вируса гриппа лошадей можно разделить на две группы: штаммы вируса первой группы относятся к подтипу I (A Equi/Прага/56), штаммы вируса второй группы к подтипу II (A/Equi/Майами/63) (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1

Сравнительный спектр гемагглютинирующей активности штаммов обеих групп (Т. В. Пысина, 1969)

Эритроциты	Штаммы первого подтипа A/Equi (Прага) 56	Штаммы второго подтипа A/Equi (Майами) 63	Эритроциты	Штаммы первого подтипа A/Equi (Прага) 56	Штаммы второго подтипа A/Equi (Майами) 63
Человека О	+	+	Мыши	+	±
Курицы	+	+	Кошки	+	0
Утки	+	+	Овцы	+	0
Гуся	+	+	Теленка	+	0
Голубя	+	+	Коровы	+	0
Морской свинки	+	+	Лошади	+	0
Собаки	+	+	Свиньи	+	0
Кролика	+	0	Хомяка	+	0
Крысы	+	±			

Установлено, что вирусы гриппа человека A_2/Sing/57/ и A/Equi 1/Прага/56/ имеют идентичный гемагглютинирующий компонент — агглютинируют эритроциты телят, лошадей и свиней.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ранняя (выделение вируса и его идентификация при помощи серологических реакций) и ретроспективная (по обнаружению антигемагглютининов, комплементсвязывающих и вируснейтрализующих антител) диагностика гриппа лошадей принципиально ничем не отличаются от ранней и ретроспективной диагностики гриппа людей, свиней и птиц.

Выделение вируса производят на куриных эмбрионах и белых мышах.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Идентификацию выделенных штаммов проводят при помощи РТГА и РСК. При помощи РТГА устанавливают внутритиповую принадлежность выделенных штаммов, а РСК — видовую.

Для идентификации полевых штаммов гриппа лошадей их вначале адаптируют к развивающимся куриным эмбрионам, определяют титр гемагглютинации и затем используют в реакции торможения с заведомо позитивными сыворотками на два подтипа вируса гриппа лошади и три — вируса гриппа человека (A_0, A_1, A_2).

Получение сывороток. В качестве доноров иммунных сывороток можно использовать хорьков, морских свинок, крыс, кур и мышей. Чаще используют морских свинок и крыс. В организме морских свинок образуются антитела против V-компонента. Однако иммунная сыворотка их против гриппа типа A_2 не годится для использования в РТГА, поскольку в ней содержатся неспецифические ингибиторы против A_2-антигена, удалить которые довольно трудно. В этом случае лучше брать сыворотки крыс, которые дают специфическую реакцию, поскольку обладают незначительными антикомплементарными свойства-

ми, а имеющиеся в ней неспецифические ингибиторы успешно удаляются при обработке сыворотки CO_2, KJO_4 и каолином.

Получение S-антигена вируса гриппа. От зараженных эмбрионов через 48 часов удаляют живые зародыши вместе с желточным мешком и остатками белка таким образом, чтобы хориоаллантоисная мембрана оставалась прикрепленной к скорлупе. Затем хориоаллантоисную мембрану стерильным пинцетом переносят в чашки Петри, заполненные 0,85%-ным физиологическим раствором NaCl. Все мембраны 6 раз промывают физиологическим раствором, каждый раз свежим охлажденным до 4°. При этом особое внимание обращают на удаление эритроцитов и остатков белка. Затем хориоаллантоисные оболочки гомогенизируют в течение 3 минут и полученный гомогенат переливают в мерный цилиндр. Далее гомогенизатор промывают небольшим количеством физиологического раствора и всю тканевую жидкость выливают в тканевый гомогенат. К полученной суспензии добавляют хлороформ до конечной концентрации 2%. Все оставляют на ночь. На следующее утро при помощи центрифугирования (20 минут при 3000 об/мин) собирают надосадочную жидкость, которую затем вновь центрифугируют 20 минут при 20 000 об/мин при температуре 4°. Надосадочная жидкость после повторного центрифугирования представляет собой S-антиген, который консервируют 0,08%-ным NaN_3, разливают в ампулы и хранят в таком виде или же лиофилизируют.

Иммунизация морских свинок для получения S-антител против вируса гриппа лошадей. Заражают в носовую полость 15—20 молодых морских свинок под легким эфирным наркозом, вводя им по 0,2—0,5 мл вируссодержащей суспензии (титр 10^6). Через 6—8 недель тем же свинкам вводят интраперитонеально по 1 мл идентичного или близкого к используемому S-антигена. Через три недели животных обескровливают и каждую полученную сыворотку инактивируют при 56° в течение 30 минут и перед употреблением адсорбируют эритроцитами барана * и сохраняют при минус 20°.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Следует иметь в виду, что ранее описанный заразный катар верхних дыхательных путей лошадей не имеет самостоятельной назологически установленной этиологии. Это или ринопневмония вирусный аборт лошадей), или грипп лошадей. В связи с этим особое значение имеет дифференциация гриппа от ринопневмонии и артерита лошадей. Массовые аборты и преждевременная выжеребка с рождением нежизнеспособных жеребят часто с признаками бронхопневмонии дают основание заподозрить ринопневмонию. Выделенный вирус надежно дифференцируется с позитивными сыворотками гриппа (РТГА) и ринопневмонии.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ретроспективный диагноз на прошедшую инфекцию гриппа среди лошадей устанавливают исследованием их сывороток в РТГА с заведомо активными штаммами вируса гриппа лошадей, принадлежащими к двум антигенным подтипам.

Специфическая профилактика не разработана, поэтому не изучен вопрос о длительности циркуляции специфических антител у вакцинированных животных.

* На 10 мл сыворотки добавляют 0,3—0,5 мл 10%-ной взвеси эритроцитов, оставляют при 4° на 40—60 минут, а затем центрифугируют и удаляют осадок.

ОСПА ЛОШАДЕЙ
(HORSE-POX)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Оспа лошадей, оспа-стоматит, заразный пустулезный (Stomatitis pustulosa contagiosa), стоматит, везикулезно-пустулезная экзантема кожи (дженнеровская оспа лошадей), пустулезно-контагиозный стоматит и дерматит лошадей — острая контагиозная болезнь, протекающая у лошадей сравнительно легко, особенно, если она вызвана вирусом осповакцины.

Установлена возможность переноса оспы от лошадей на свиней, кроликов, морских свинок и человека. Кроме лошадей, вирусом оспы коров могут заражаться мулы, верблюды и буйволы. Среди лошадей оспа передается путем контакта с больными животными, а также через обслуживающий персонал, одежду и предметы ухода.

Оспа лошадей проявляется в формах контагиозного пустулезного стоматита и везикулярно-пустулезного дерматита или в виде сочетания их с преобладанием тех или иных признаков. В первом случае поражаются главным образом слизистая оболочка ротовой полости, кожа губ, носа и щек, реже груди, плечей, бедер, вокруг анального отверстия и половых органов. Иногда поражается слизистая оболочка зева, гортани и носа, а также конъюнктива и роговица глаз. Оспа протекает 14—20 дней, при осложнениях — до 26 дней и дольше.

Во втором случае поражения кожи чаще локализуются в области сгибательной поверхности путового сустава. После лопанья нагноившихся пузырьков болезненный процесс напоминает картину «мокреца». Животные хромают, худеют. Болезнь длится 21—28 дней. Прогноз, как правило, благоприятный, особенно при поражении вирусом осповакцины, так называемой дженнеровской оспой. Оспой болеют лошади всех возрастов. Тяжелее болезнь протекает у жеребят-отъемышей.

ВИРУС

Возбудителем оспы у лошадей является вирус оспы коров, но может быть и вирус осповакцины.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям, хранение и консервирование вируссодержащего материала, локализация вируса в организме, антигенная активность, гемагглютинирующие свойства и спектр патогенности вируса осповакцины описаны в медицинской вирусологической литературе.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

При типично выраженной экзантеме поставить диагноз не трудно. Правильность клинического диагноза подтверждает обнаружение в мазках элементарных телец. Для дифференциации ос-

пы от других экзематозных процессов, часто развивающихся у лошадей в области путового сустава, можно ставить биопробу путем заражения кролика в скарифицированную роговицу глаза (или кожу).

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ретроспективная диагностика не разработана. Иммунитет у лошадей после переболевания оспой длится несколько месяцев. Вирулицидность сыворотки исчезает через год, «кожный» иммунитет сохраняется дольше. Переболевшие жеребята через год могут опять заболеть оспой.

Серологическая оценка поствакцинального иммунитета не разработана. После иммунизации лошадей вирусом осповакцины невосприимчивость к оспе у них развивается к 10-му дню. Оспенный детрит — вирус осповакцины вводят лошади в количестве 10 человеческих доз на границе верхней и средней трети шеи путем втирания в скорифицированную кожу (три параллельные насечки длиной 3—4 см на расстоянии 1—2 см одна от другой) тупым концом скальпеля. Через 2—4 дня края скарификации на месте введения детрита припухают, а еще через 1—2 дня появляются отдельные узелки, из которых спустя 5—7 дней образуются пустулы, которые быстро подсыхают и покрываются корочкой.

ОСПА ВЕРБЛЮДОВ
(CAMEL-POX)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Оспа верблюдов — очень контагиозная болезнь, характеризуется развитием лихорадки, отеком головы и появлением узелково-пустулезной сыпи на коже и слизистых оболочках больных животных.

В СССР оспу верблюдов регистрируют в Казахской ССР, Туркменской ССР, Узбекской ССР, Таджикской ССР и Киргизской ССР, а также в странах Ближнего Востока (Индия, Пакистан, Афганистан, Иран, Турция). К оспе восприимчивы верблюды всех возрастов.

Клинически болезнь проявляется в двух формах — локализованной и генерализованной. У животных в возрасте 2—4 лет наблюдают локализованную форму болезни (поражение слизистых оболочек губ и носа). У верблюжат в возрасте до одного года и верблюдиц в последние месяцы жеребости отмечают преимущественно генерализованную форму болезни.

Оспа у верблюдов протекает так же, как оспа у животных других видов (овец, коз, свиней). Вначале наблюдаются повышение температуры тела до 39—41°, общее угнетение, полный или частичный отказ от корма, затрудненное дыхание, гиперемия слизистых оболочек ротовой и носовой полостей, кератит, нередко с последующим помутнением роговицы. Затем через 2—3 дня на коже и слизистых оболочках появляются папулы — плотные узелки размером 3—5 мм, которые в дальнейшем превращаются в везикулы, пустулы и струпья. На месте отпавших струпьев остаются плоские бледно-розовые рубцы. С момента появления первых признаков болезни до отторжения струпьев проходит, в зависимости от обширности поражений и бактериальной осложненности, 15—40 дней (Р. Г. Садыков, 1971).

Обычно оспа верблюдов начинается единичными случаями, в последующем охватывает всех контактирующих животных независимо от возраста, пола и физиологического состояния. На характер течения оспы определенную роль оказывают сезонные факторы. Болезнь тяжело проявляется зимой и ранней весной. Заболевшие жеребые верблюдицы часто (до 26%) абортируют (Р. Г. Садыков, 1971). Оспа у верблюдиц за 1—2 часа до выжеребки может протекать иногда без видимых характерных клинических признаков, при наличии лихорадки и абортов. На коже плодов можно обнаружить точечные оспенные поражения (Ю. Ф. Борисович, Е. И. Скалинский, 1966).

ВИРУС

В настоящее время большинство исследователей считают, что у верблюдов имеется свой оригинальный вирус оспы, не передающийся человеку и другим животным (Ю. Ф. Борисович и Е. М. Скалинский, 1966; Р. Г. Садыков, 1971).

Вирус оспы верблюдов изучен мало. Известно, что он проходит через свечи Беркефельда и устойчив к высушиванию. В высушенных корочках, в прохладном месте в запаянных ампулах он выживает и сохраняется в активном состоянии не менее $4^1/_2$ месяцев.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям не изучена.

Локализация в организме в продромальный период не изучена. Вирус можно обнаружить в свежеразвившихся оспенных пустулах.

Антигенная вариабельность неизвестна.

Гемагглютинирующие свойства. Вирус оспы верблюдов, как и вирус осповакцины, обладает способностью агглютинировать эритроциты кур. Причем гемагглютинирующая активность его по мере пассирования на куриных эмбрионах возрастает, достигая к 8—9-му пассажу титра 1 : 320 (Р. Г. Садыков, 1971). Эритроциты животных других видов инагглютинабельны.

Иммунобиологические взаимоотношения. Иммунобиологические связи вирусов оспы верблюдов и осповакцины установлены Р. Г. Садыковым (1971) в прямых опытах на верблюжатах. Животные, привитые вирусом осповакцины, приобретают устойчивость к вирусу оспы верблюдов, и, наоборот, естественно переболевшие верблюжата резистентны к экспериментальному заражению вирусом осповакцины.

Спектр патогенности. По данным Ф. А. Петунина (1958), к вирусу оспы верблюдов восприимчивы кролики при интратестикулярном, внутрикожном и кожном (скарификация) заражении и морские свинки при заражении путем аппликации на скарифицированную роговицу глаз. Однако исследования Р. Г. Садыкова (1971) показали, что к этому вирусу восприимчивы только верблюды.

Культивирование. Вирус удается культивировать на хориоаллантоисной мембране куриного эмбриона. По мере адаптации его к эмбрионам поражения мембраны усиливаются. Участки поражения представляют собой выступающие над поверхностью оболочки сплошные белые образования с очагами кровоизлияния. Через 96—120 часов, помимо этих образований, появляются вторичные поражения в виде ограниченных беловатых узелков размером до макового зерна, рассеянных по всей поверхности оболочки по ходу кровеносных сосудов. Эмбрионы при этом во всех случаях остаются живыми и нормально развитыми (Р. Г. Садыков, 1971).

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагноз на оспу верблюдов ставят на основании эпизоотологических данных, характерных симптомов болезни, патологических изменений и лабораторных исследований: биопробы, вирусоскопии, реакций торможения гемагглютинации и диффузионной преципитации.

Биопроба может быть поставлена на верблюжатах. Их заражают суспензией 1 : 10 внутрикожно (в объеме 0,2 мл) в области подгрудка. При наличии в материале вируса у животных, как правило, развивается местный оспенный процесс. Вирусоскопия мазков, приготовленных из папул и окрашенных по Морозову, позволяет судить о наличии элементарных телец.

Реакция диффузионной преципитации может быть использована для идентификации выявленного вируса с кроличьими сыворотками, полученными на вирус осповакцины. РДП четко проходит с антигеном, приготовленным из пораженных вирусом участков ткани. В положительных случаях реакция в виде белой линии преципитата появляется в первые 5—6 часов после ее постановки. Если ее проводить при комнатной температуре (20—22°) без 6-часовой предварительной выдержки в термостате (при 37—38°), то тот же результат наступает через 10—14 часов (Р. Г. Садыков, 1971).

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Оспу верблюдов необходимо дифференцировать от некробациллеза путем микроскопического исследования материала, взятого от больных и павших верблюдов, а также экспериментальным заражением восприимчивых к некробациллезу белых мышей. Для исключения ящура заражают морских свинок в плантарную поверхность кожи лапок (при ящуре свинки заболевают с образованием характерных афт). Грибковые поражения и чесотку исключают микроскопическим нахождением возбудителей в исследуемых соскобах, взятых с пораженных участков кожи. В случаях абортов, выкидышей и преждевременных выжеребок (для исключения бруцеллеза) исследуют плоды и сыворотку крови таких верблюдиц на бруцеллез (РА, РСК и бактериологически). Необходимо исключить также «янтак-баш»— незаразную, но иногда массовую болезнь молодых верблюдов, характеризующуюся поражениями в области головы (губ, носа), появляющимися в результате травм верблюжьей колючкой (янтак). Взрослые верблюды, как правило, верблюжьей колючкой не поражаются (Ю. Ф. Борисович, Е. И. Скалинский, 1966).

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

В сыворотке крови больных и переболевших животных обнаруживаются антитела-антигемагглютинины; титр их на 13—16-й день после поражения достигает 1 : 160—1 : 640 и через 2 месяца снижается до 1 : 20—1 : 40 (Р. Г. Садыков, 1971).

Иммунитет у естественно переболевших верблюдов сохраняется практически пожизненно. Верблюжата, родившиеся от переболевших оспой верблюдиц, невосприимчивы к естественному и экспериментальному заражению до трех лет.

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА

Прививка верблюдов вирусом осповакцины (детрит) сообщает надежный иммунитет к естественной инфекции. У подавляющего большинства привитых животных (95%) на месте апликации вируса осповакцины через 3—5 суток появляется оспенная сыпь. Процесс протекает доброкачественно и строго локализованно, завершаясь к 15—20-му дню выздоровлением. Применение осповакцины для профилактики оспы верблюдов разрешено с 1969 г. Главным управлением ветеринарии МСХ СССР.

ЧУМА СВИНЕЙ
(SWINE FEVER)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Чума свиней — острая заразная болезнь, вызываемая вирусом и характеризующаяся явлениями септицемии, геморрагического диатеза, крупозным воспалением легких и дифтероидным воспалением кишечника. Чума встречается во всех государствах Европы, Азии, Америки, Австралии и Африки. Однако в связи с широким применением высокоэффективных специфических препаратов — кристаллвиолетвакцины и живых лапинизированных вирусвакцин АСВ и К — распространение инфекции сократилось. Однако опасность ее появления имеется постоянно.

Экономический ущерб при чуме свиней складывается из гибели и вынужденного убоя больных животных, а также средств, затрачиваемых на проведение ветеринарно-санитарных мероприятий. Появление чумы свиней ограничивает производственную деятельность хозяйства.

Инкубационный период продолжается от 3 до 20 дней. В среднем он равен 5—7 дням.

Болезнь протекает сверхостро, остро, подостро и хронически. В начале вспышки преобладают сверхострое и острое течения.

Во всех случаях болезнь начинается значительным повышением температуры тела. При остром и сверхостром течении лихорадка постоянного типа, температура тела быстро повышается до 41—41,5° и лишь за 1—2 дня до смерти понижается. При подостром и хроническом течении лихорадки перемежающего типа. Необходимо помнить, что до 42° температура тела при чуме не повышается.

С повышением температуры общее состояние животного ухудшается, развивается общая слабость; на 5—7-й день болезни животное с трудом передвигается, больше лежит, зарывшись в подстилку. Особенно ослабевают задние конечности, походка становится шаткой, голова опущена, спина сгорблена.

При остром течении часто наблюдают конъюнктивит и носовые кровотечения. Конъюнктива опухшая, гиперемирована; вначале истекает серозный, а затем слизистый и слизисто-гнойный экссудат; веки опухшие, склеены, под глазами засохшие корки; на слизистой оболочке глаз кровоизлияния.

Кровоизлияния можно обнаружить на коже в области внутренней поверхности бедер, живота, шеи, у основания ушей и т. д. Они имеют форму линз, двухкопеечной монеты, сыпи красно-фиолетового цвета. Иногда имеют вид папул. Папулезные высыпания могут быть единичные, но чаще их много, и появляются они на тонких частях кожи — у основания ушей, на животе и внутренней поверхности бедер. Нередко, сливаясь, они превращаются в обширные кровоизлияния. При надавливании пятна не бледнеют. Лимфатические узлы увеличены.

При остром и сверхостром течении довольно часто наблюдают поражение центральной нервной системы: сонливость, подавленность, апатию, некоординированные движения, дрожание конечностей, судороги, слабость задних конечностей; иногда отмечаются кратковременное возбуждение и припадки.

Характерна лейкопения (уменьшение лейкоцитов в крови). Ее не наблюдают ни при одной из септических болезней свиней. Погибает до 80% заболевших животных.

Если болезнь затягивается до 10 дней, то нередко может осложняться секундарной инфекцией с преобладанием поражений органов дыхания (грудная форма) или пищеварения (брюшная форма). При осложнении пастереллами развивается грудная форма (кашель, одышка и пр.), а сальмонеллами — брюшная (чередование поноса с запорами).

В этом случае отмечают: серозный катар, геморрагическое, крупозное или дифтеритическое воспаление. На слизистой кишечника образуется дифтероидная пленка, состоящая из свернутого фибрина и тканевого некротического детрита. В процесс часто вовлекаются фолликулы или пейеровые бляшки, которые впоследствии подвергаются коагуляционному некрозу (образование творожистых масс) с образованием на их месте фолликулярных язв (бутонов). Коагуляционный некроз наблюдается, как правило, в ободочной или слепой кишке. Кишечная стенка в местах дифтеродного воспаления утолщена и образует поперечные складки.

Изменяются и лимфатические узлы. Они увеличены, геморрагически воспалены, темно-красного или серовато-красного цвета, имеют мраморный рисунок, пропитаны эритроцитами.

В почках под капсулой на бледном фоне видны точечные кровоизлияния. Почки бледные, селезенка увеличена. Следует иметь в виду, что чума часто осложняется крупозной пневмонией. Характерные изменения — геморрагические или анемические инфаркты — отмечают в селезенке. Под капсулой видны кровоизлияния. Характерным для чумы считают кровоизлияния на слизистой оболочке гортани, прямой кишки и мочевого пузыря.

Очень ценные диагностические данные дает гистологическое исследование. В кровеносных сосудах наблюдаются дегенеративные изменения эндотелиальных клеток, некроз, что приводит к кровоизлияниям. Отмечаются атрофия лимфоидной ткани (селезенки, лимфатических узлов), что приводит к лейкопении. Нередко диагностируются гломерулонефриты, негнойные энцефалиты, с резкими дегенеративными изменениями нервных клеток и клеточной инфильтрацией в виде муфт вокруг сосудов.

В связи с широким, а иногда нерациональным применением вакцин, антибиотиков, некоторых химических препаратов болезнь может протекать атипично, принимая затяжной характер. Поросята-сосуны превращаются в заморышей, пораженных экземой (П. И. Притулин, 1970). Такое же течение наблюдают у животных длительно неблагополучных по чуме хозяйств.

ВИРУС

Вирус не классифицирован и слабо изучен. За последние годы установлено, что он содержит РНК и большое количество липидов (Динтер, 1963; Лоэн, 1964), умеренно чувствителен к трипсину и не стабилизируется $MgCl_2$. Вирион почти сферической формы, содержит нуклеопротеид и имеет оболочку (под электронным микроскопом) (Майер и др., 1968). Диаметр его 40±3 ммк.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Устойчивость вируса во внешней среде зависит от характера вируссодержащего материала (кровь, моча, кусочки органов), температуры, влажности, степени инсоляции и т. п. Инфекционность вируссодержащей крови при воздействии прямых солнечных лучей сохраняется до 9 часов; замораживание консервирует вирус на многие месяцы и даже годы. Лиофилизированный вирус выживает годами. Он хорошо сохраняется в среде с pH 4,8—5,1, но погибает в течение часа при pH 1,4; чувствителен к эфиру. Вирус быстро гибнет в гниющем материале; в разложившейся моче он теряет вирулентность через 2 часа при хранении ее в условиях 22°.

Устойчивость вируса к дезосредствам различна: 2,5%-ный раствор формальдегида убивает его в течение часа; известковое молоко — за 20 минут; хлорная известь в разведении 1 : 5 и 1 : 20 — через 15 минут; 5%-ный раствор фенола и раствор гепохлорида (содержащий 1,66% хлора) — за 15 минут. Мочевина (20%) и глицерин (23%) в условиях комнатной температуры не изменяют вирулентных свойств вируса. Из химических средств лучше всего действу-

ет 1—2%-ный раствор едкого натра. В засоленных свиных тушах вирус с
храняется в активном состоянии более 300 дней.

Хранение и консервирование вируссодержащего м
териала. Лучше вируссодержащий материал сохранять в лиофилизирова
ном виде. Его можно также длительно (6 месяцев при 2—4°) сохранять в н
сыщенном растворе поваренной соли.

Локализация в организме. Вирус, проникший в организм чу
ствительного животного, быстро сорбируется клетками эндотелия кровеносны
сосудов и лимфатической системы, где и происходит его первоначальное ра
множение. Затем он интенсивно размножается в эндотелиальных клетках к
пилляров, мелких и средних кровеносных сосудах всех органов и тканей
В острый период болезни вирус содержится в клетках всех органов и тканей
Кровь становится вирулентной уже через 1—3 суток после заражения и со
храняет свою вирулентность в течение нескольких дней. В моче вирус появля
ется на 4—6-й день.

Антигенные свойства. Достоверных данных в отношении анти
генной вариабельности вируса чумы свиней нет. Это подтверждается высоко
эффективностью штамма SFA (ACB) и К в различных зонах земного шара
В настоящее время моноантигенность этого вируса общепризнана. Антигенная
активность вируса чумы свиней заключается в способности его индуцировать
вируснейтрализующие, комплементсвязывающие и преципитирующие антитела
При помощи реакции диффузионной преципитации (используя для этого в ка
честве антигена л[illegible]е узлы и поджелудочную железу больных поро
сят) удается вы[illegible]й компонент этого вируса, общий с возбудите
лем заболевания [illegible]чек крупного рогатого скота (Дербишер, 1962).
Имеются сообщ[illegible] вирусе, дающем «паузы» в ходе пробной им
мунизации. Та[illegible]) нейтрализуется специфическими антисыво
ротками. Пред[illegible]нтный вирус аналогичен фазе *Q* вируса грип
па, который с[illegible]гомологичными сыворотками.

Патоге[illegible] В естественных условиях к вирусу воспри
имчивы то[illegible]од. Болезнь очень контагиозна и почти
всегда [illegible] в экспериментальных условиях. Не
которы[illegible]ирус чумы свиней к организму кро
ликов [illegible]ммы, нашедшие широкое практическое
применение в[illegible]ной инфекции.

Культивиро[illegible] в лабораторных условиях. Вирус чу
мы свиней можно бесконечно поддерживать в условиях лаборатории или био
фабрики пассажами на восприимчивых молодых свиньях. Вирулентность вируса
в таких случаях возрастает до 10^6—10^7 $ЛД_{50}$/мл. Вирус размножается в куль
турах ткани почки, яичка, костного мозга и лейкоцитов свиньи и перевиваемой
линии клеток почек поросят (Лонг и др., 1960; Терюханов, 1967; Р. Х. Юсупов,
1969). Однако в первых пассажах он не вызывает видимых цитопатических
изменений. Но, как показали исследования Р. Х. Юсупова (1969), методом
флуоресценции удается обнаружить в этой культуре вирус чумы свиней, если
в нее был внесен вируссодержащий материал как в первичных, так и в после
дующих пассажах. В качестве исследуемого вируссодержащего материала для
заражения культуры указанных клеток оказались пригодными: кровь, сыворот
ка крови, экстракты селезенки, лимфатических узлов и мышц свиней, больных
чумой. По данным автора, положительные результаты (до 70%) наблюдались
при исследовании культур клеток, в которые вносили экстракты мяса сви
ней спонтанно или экспериментально зараженных чумой.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Биопроба. При атипичном течении чумы свиней и смешанных формах болезни, когда клинических, эпизоотологических и пато
логоанатомических данных бывает недостаточно для постановки окончательного диагноза, ставят биопробу (с разрешения началь-

ника Ветеринарного управления республики и под методическим руководством директора областной ветеринарной лаборатории).

Для этого из благополучных по инфекционным болезням хозяйств берут 6—8 здоровых подсвинков, не привитых ни вакциной, ни сывороткой против чумы свиней, весом не менее 40—45 кг. В качестве материала используют паренхиматозные органы, костный мозг и сыворотку крови поросят, погибших во время острого течения инфекции. Суспензии из органов или сыворотку крови фильтруют через фильтр Зейтца (пластинку ЕК) или суспензию центрифугируют 2—3 минуты при 1,5 тыс. об/мин. Надосадочную жидкость отсасывают и добавляют к ней антибиотики из расчета на 1 мл 100 ЕД пенициллина и 500 ЕД стрептомицина. Выдерживают эту жидкость 1 час при комнатной температуре, затем проверяют на стерильность путем высева на питательные среды и безвредность на белых мышах. После проверки суспензию, обработанную антибиотиками, вводят подсвинкам под кожу или внутримышечно по 10—15 мл. За сутки до заражения двум подсвинкам вводят гипериммунную сыворотку, двум — сыворотку против пастереллеза и трех не прививают. Если в испытуемом материале есть вирус чумы свиней, то поросята, непривитые и получившие противопастереллезную сыворотку, погибают, а животные, привитые иммунной сывороткой против чумы, остаются живыми.

При проведении биопробы нужно строго соблюдать условия, препятствующие рассеиванию инфекции во внешней среде и исключающие возможность заражения подопытных подсвинков другими болезнями (П. И. Притулин, 1970).

МЕТОД ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Это вспомогательный и надежный метод лабораторной диагностики чумы свиней. Однако использование его предполагает непременный анализ данных эпизоотологических, клинических и патологоанатомических исследований. Животные, иммунизированные против чумы вирусвакциной АСВ, в течение года резко заболевают спонтанной чумой, и поэтому в подобных случаях нет необходимости исследовать их на чуму при помощи метода иммунофлуоресценции.

Сотрудниками Казанского государственного ветеринарного института проф. Х. Г. Гизатуллиным и Р. Х. Юсуповым (1970) разработан и предложен для практического использования метод иммунофлуоресценции в следующем методическом порядке.

Различают три способа иммунофлуоресцентного исследования: прямой (наиболее простой), непрямой и непрямой с использованием комплемента в комплексе «антиген+антитело» (см. ниже).

Для исследований необходимо иметь:

1) флуоресцирующие сыворотки: а) против чумы — кроличьи, свиные и б) антивидовые — противокроличьи, противосвиные и против комплемента морской свинки;

2) люминесцентный микроскоп МЛ-2, МЛ-1; если его нет, то микроскоп, но в сочетании с люминесцентным устройством ОИ-17; применять объектив 90, окуляр 4 или 5, светофильтры ФС-1, СЭС-7 или СЭС-14, ВС-8 и окулярные ЖС-18 или Т-ТН;

3) нефлуоресцирующее иммерсионное масло или его заменитель (приготовляется из деметилфталата чистого — 100 мл, нафталина сублимированного — 1,75 или тимола чистого);

4) глицерин с фосфатным буфером pH 8,0 (9 частей глицерина нейтрального и 1 часть фосфатного буфера pH 8,0);

5) физиологический раствор хлористого натрия с фосфатным буфером, pH 7,4, приготовленный следующим образом: а) в 1 л дистиллированной воды растворяют 1,78 г двузамещенного фосфата натрия; б) в 1 л дистиллированной воды растворяют 1,36 г однозамещенного фосфата калия. Для приготовления 1 л буферного раствора смешивают 850 мл раствора «а» и 250 мл раствора «б»;

6) спирт метиловый, спирт этиловый, ацетон;

7) покровные стекла толщиной не более 0,2 мм;

8) предметные стекла, нефлуоресцирующие и хорошо обезжиренные.

Изготовление противочумных флуоресцирующих сывороток. Специфические диагностические сыворотки для реакции иммунофлуоресценции изготовляются на биофабрике.

Специфические противочумные иммуносыворотки можно получать на кроликах, подвергая их гипериммунизации лапинизированной вирусвакциной АСВ, разведенной физиологическим раствором 1 : 50. Гипериммунизацию можно проводить по двум схемам.

Первая схема. Первую, вторую и третью внутривенные инъекции вакцины в дозе 1 мл делают с интервалом в 34 часа; после 7—10-дневного перерыва делают четвертую, пятую и шестую инъекции по 2 мл вакцины с 24-часовым интервалом. После 7-дневного перерыва делают седьмую, восьмую и девятую инъекции вакцины по 3—4 мл с интервалом в 24 часа. Такой цикл гипериммунизации повторяют через каждые 10 дней до получения сыворотки с высокой специфичностью и активностью. Последние определяются в РДП в агаровом геле.

Вторая схема. Кроликам в нарастающей дозе (от 1 мл до 5 мл) вводят вакцину внутривенно через каждые 3—4 дня; после 5-дневного перерыва гипериммунизацию повторяют, вводят вакцину в убывающих дозах — от 5 до 1 мл; затем после 10-дневного перерыва вновь повторяют гипериммунизацию в нарастающих дозах.

Для получения специфических сывороток с наиболее высоким титром рекомендуется прибегать к неспецифической стимуляции иммуногенеза. В качестве неспецифического стимулятора нужно при каждой инъекции вакцины вводить подкожно витамин B_{12} по 250 мкг.

Точная диагностика чумы свиней при помощи иммунофлуоресценции зависит от специфичности флуоресцирующих глобулинов (сывороток) и от свежести исследуемых патологических материалов.

Для второй ступени непрямого метода глобулины получают: 1) из антивидовой (противосвиной) сыворотки крови кроликов, приготовленной после гипериммунизации кроликов гамма-глобулинами сыворотки крови здоровых свиней; 2) из антивидовой сыворотки крови крыс (против гамма-глобулинов сыворотки кролика), приготовленной после гипериммунизации крыс гамма-глобулинами сыворотки крови здоровых кроликов. Кроликов и крыс гипериммунизируют по второй, описанной выше, схеме.

Глобулиновые фракции из гипериммунных сывороток осаждают насыщенным раствором сульфата аммония *.

* Наиболее простой и удобный способ выделения глобулинов состоит в следующем: к сыворотке, разбавленной 2 : 1 дистиллированной водой, на холоде (ледяная баня) добавляют по каплям в равном объеме насыщенный раствор сульфата аммония при постоянном перемешивании. Через 40—60 минут отстаивания смесь центрифугируют при 7000—8000 об/мин в течение 7—8 минут. Надосадочную жидкость удаляют, а осадок глобулинов растворяют дистиллиро-

Далее соединяют глобулиновую фракцию сыворотки со светящимся красителем — изотиоционатом флуоресцеина: готовят реакционную смесь с таким расчетом, чтобы глобулины в пересчете на сухое вещество составляли 1%; карбонатно-бикарбонатный буфер (pH 9,0) берут в количестве 15% к общему объему смеси; смесь доводят до 100% объема 0,15 М раствором хлорида натрия; изотиоционат флуоресценна (в зависимости от качества) берут из расчета 1—3 мг на 100 г белка. Конъюгирование проводят на холоде при постоянном перемешивании на магнитной мешалке в течение 18 часов. Для удаления избытка краски и других компонентов конъюгат диализируют против 0,15 М раствора хлорида натрия с 0,01 М карбонатно-бикарбонатным буфером при pH 9,0; окончание диализа проверяют в люминесцентном микроскопе МЛ-2 со светофильтром УФС-3. Раствор изотиоционата флуоресценна в разведении 1 : 20 млн. служит контролем. Если зеленоватое свечение диализата не превышает свечения контрольного раствора, диализ заканчивают. Для адсорбции меченых глобулинов порошок, полученный из печени и почек свиней, прибавляют в конъюгат из расчета 60—70 мг на 1 мл. Обычно проводят две последовательные сорбции по одному часу. Глобулин отделяют высокоскоростным центрифугированием при 15 000 об/мин в течение 30—40 минут. Для адсорбции конъюгата используют также активированный уголь, который берут из расчета 40—50 мг на 10 мл конъюгата. Адсорбцию проводят в течение 1—2 минут, при перемешивании на магнитной мешалке. Уголь удаляют центрифугированием при 4000 об/мин в течение 3—5 минут. Специфичность приготовленных противочумных и антивидовых флуоресцирующих сывороток проверяют в реакции диффузионной преципитации в агаре, а также в реакции иммунофлуоресценции.

Мазки-отпечатки, срезы из нормальных тканей и тканей, зараженных вирусом чумы свиней, окрашивают мечеными сыворотками в различных разведениях и просматривают под люминесцентным микроскопом. Для контроля специфичности флуоресцирующих противочумных сывороток применяют нормальные сыворотки крови свиней, кроликов, крыс, конъюгированные тем же флуорохромом. Для усиления контроля рекомендуется применять гетерологические флуоресцирующие гипериммунные сыворотки против болезни Ауески, инфекционного гастроэнтерита, паратифа, а также метод ингибирования или блокирования.

Обнаружение вируса чумы в мазках-отпечатках. При помощи флуоресцирующих антител можно исследовать препараты из свежей или замороженной ткани, полученной после гибели животных. Вирус находится во всех органах и тканях больного животного. Однако для диагностического исследования на чуму при помощи этого метода наиболее пригодны препараты из мезентериальных и подчелюстных лимфатических узлов и селезенки. Лимфоузел или селезенку разрезают острым скальпелем и легким прикосновением к поверхности разреза слегка подогретых чистых предметных стекол готовят мазки-отпечатки. Эти мазки, сделанные на местах, посылают для исследования в лабораторию; можно переслать в контейнере со льдом экстерпированные узел или

ванной водой до прежнего объема и вновь осаждают насыщенным раствором сульфата аммония. Последний берут в равном объеме с дистиллированной водой, взятой для растворения осадка. Переосаждение и центрифугирование проводят трижды и получают в осадке достаточно чистую общеглобулиновую фракцию. Осадок глобулинов растворяют в небольшом количестве дистиллированной воды, переносят в целофановый мешочек и диализуют против 0,15 М раствора хлорида натрия с 0,01 М фосфатным буфером pH 7,4.

селезенку. После подсушивания на воздухе мазки-отпечатки фиксируют метиловым спиртом 5—7 минут, или в смеси этилового спирта и уксусной кислоты (9 : 1) в течение 15—20 минут, или в смеси ацетона и метилового спирта (2 : 1) в течение 15—20 минут; ацетоном при 20° в течение 25—30 минут. Препараты окрашивают меченой сывороткой прямым, непрямым и модифицированным непрямым методами флуоресцирующих антител.

При *прямом методе* окрашивания на мазок-отпечаток наносят каплю меченой, т. е. флуоресцирующей противочумной сыворотки; препарат помещают в чашку Петри и накрывают крышкой. Чтобы капли флуоресцирующей сыворотки не высыхали, на дно чашки помещают кусочек ваты, смоченной водой, окрашивают в течение 20 минут при температуре 37°; затем для удаления флуоресцирующих антител, не связанных с антигенами, окрашенный препарат промывают фосфатно-буферным раствором pH 7,4 в течение 5—10 минут; после промывания препараты высушивают на воздухе.

При *непрямом методе* иммунофлуоресценции на исследуемый препарат наливают каплю гипериммунной противочумной сыворотки, оставляют его на 15 минут при 37°; затем препарат промывают 5 минут в фосфатно-буферном растворе (pH 7,4), меняя его. Избыток влаги с препарата удаляют фильтровальной бумагой, после чего на препарат наносят каплю флуоресцирующей антивидовой сыворотки и оставляют его на 15 минут при 37°. Затем препарат еще раз промывают, высушивают и просматривают под люминесцентным микроскопом.

При *модифицированном непрямом методе* (с использованием комплемента) окрашивания на мазок-отпечаток наносят каплю смеси, состоящей из нефлуоресцирующей противочумной иммунной сыворотки и комплемента (сыворотка морской свинки), разведенного 1 : 10, взятых в равных объемах; далее мазки промывают буферным раствором и наносят на них каплю флуоресцирующей антикомплементарной сыворотки. Мазки-отпечатки промывают в буферном растворе, высушивают на воздухе (для ускорения высушивания можно использовать настольный вентилятор). Обе фазы обработки препаратов проводят при 37° в течение 15 минут.

Перед исследованием на поверхность мазка наносят небольшую каплю глицерина с буфером pH 8,0, накрывают покровным стеклом, излишек глицерина удаляют. На покровное стекло наносят нефлуоресцирующее масло или его заменитель и производят люминесцентную микроскопию. Люминесцентный микроскоп рекомендуется устанавливать в хорошо вентилируемой и затемненной комнате.

Оценка результатов. Флуоресценция считается положительной при наличии довольно ярких, зеленовато светящихся флуоресцирующих образований в структурных элементах клетки (в оболочке, цитоплазме, ядре). Причем сами клетки должны

иметь четкую структуру. Как диагностический тест учитывают специфическое свечение клеток РЭС и эритроцитов. Свечение лейкоцитов, пикнотически и дегенеративно измененных клеток во внимание не принимается.

По степени свечения результаты исследований обозначают: ++++ яркая специфическая люминесценция клеток, флуоресцирующих клеток в поле зрения более 25; +++ яркая специфическая люминесценция клеток, в поле зрения их более чем 15; ++ специфическая люминесценция клеток, в поле зрения их не менее 10; + специфическая люминесценция клеток, в поле зрения их 3—5.

Исследования авторов показали, что в мазках-отпечатках как из мезентериальных и подчелюстных лимфатических узлов, так и селезенки антиген вируса чумы свиней обнаруживается в 85—88% случаев при экспериментальной и 80—84% — при спонтанной чуме свиней.

Для оценки результатов важное значение имеет качество отпечатков. Оно зависит от консистенции органов, которая влияет на прилипание характерных групп клеток к предметному стеклу. Наиболее удобные для исследования однотипные тонкие мазки-отпечатки удается приготовить из лимфатических узлов и селезенки.

Обнаружение вируса чумы свиней в тканевых срезах. Срезы готовят в замораживающем микротоме, толщиной 7—10 мк, подсушивают на воздухе и фиксируют метиловым спиртом 3—5 минут, окрашивают по описанной выше методике. При исследовании тканевых срезов, приготовленных из лимфоузлов и селезенки, удается диагностировать чуму в 95—96% случаев.

Для исследования наиболее пригодны органы в замороженном или в незамороженном виде, взятые сразу после гибели животных. Непригодны материалы из трупов, взятые через 2—3 дня после падежа животных. Хранить материалы при комнатной температуре нельзя.

Обнаружение вируса чумы свиней путем сочетания метода иммунофлуоресценции и метода культуры клеток. Как показали исследования Х. Г. Гизатуллина и Р. Х. Юсупова (1970), такое сочетание еще более повышает диагностическую ценность метода иммунофлуоресценции. Вирус чумы свиней размножается в культуре клеток почек эмбриона свиней и перевиваемой линии клеток почек поросят, однако это не сопровождается видимыми цитопатическими изменениями. Присутствие и размножение вируса в культуре удается обнаружить методом иммунофлуоресценции. В качестве исследуемого материала пригодны кровь, сыворотка крови, экстракты селезе[нки], лимфоузлов и мышц свиней больных чумой. Исследуемый материал вносят в культуру клеток в разведении 1 : 10, в [объеме] 0,2 мл. После 30—40-минутного контактирования

щий материал сливают, а во флаконы с культурой клеток вносят поддерживающую среду. Затем через 24, 48 и 72 часа покровные стекла с монослоем культуры клеток вынимают из флакона, ополаскивают фосфатным буфером (pH 7,4), фиксируют и окрашивают флуоресцирующими антителами. Если в исследуемом материале есть вирус чумы, специфическое свечение наблюдается через 24 часа инкубирования. В последующие дни интенсивность свечения усиливается.

При помощи метода иммунофлуоресценции в сочетании с методом культуры клеток удается диагностировать чуму почти у всех больных свиней. В таком сочетании метод позволяет обнаружить вирус чумы и в мясе вынужденно убитых животных.

ДРУГИЕ ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Помимо иммунофлуоресценции, в комплексе диагностических исследований на чуму свиней, особенно групповых, ориентировочных, вспомогательных методов, применяют реакцию длительного связывания комплемента в модификации Буланже (положительно реагирующих при чуме около 70%), реакцию непрямой гемагглютинации по Бойдену (62—65%), реакцию диффузионной преципитации в агаре (59—69%), феномен интерференции (63—80%), аллергическую пробу по Карловичу (55—60%) и пробу Тейлора.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

При постановке диагноза на чуму необходимо прежде всего исключить паратиф, геморрагическую септицемию, рожу. Паратиф, как правило, поражает поросят, причем все заболевшие погибают. Обнаружение возбудителя паратифа у подсвинков 4—6-месячного возраста и старше не является причиной их болезненного состояния. В подобных случаях болезнь может быть обусловлена чумой, гриппом, вирусом Сендай, а паратиф играет лишь роль секундарной инфекции.

Пастереллез свиней, как правило, не принимает характера эпизоотии. Эта инфекция чаще является вторичной, при которой следует в первую очередь исключить чуму. Кроме того, при пастереллезе сравнительно легко обнаружить возбудителя при бактериологическом и биологическом исследовании.

Рожу свиней диагностируют выделением возбудителя. Не исключено одновременное течение чумы и рожи. В этом случае диагноз ставят на основании биологической пробы на чуму и бактериологического исследования на рожу.

Грипп и парагрипп свиней исключается вирусологическим исследованием материала, взятого из верхних дыхательных путей (наличие гемагглютинации вируссодержащего материала в первых пассажах на куриных эмбрионах, феномен гемадсорбции в культуре ткани, обнаружение цитоплазматических включений при иноцитоскопии).

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Исследования Х. Г. Гизатулина и Р. Х. Юсупова (1969) показали возможность ретроспективной диагностики чумы свиней путем обнаружения в сыворотке крови реконвалесцентов специфических антител. Так, при помощи РДСК, РДП и РНГА авторы обнаруживали антитела в 47—70% случаев.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

В СССР применяют две вакцины: кристаллвиолетвакцину и сухую вирусвакцину из лапинизированного штамма К. Положительные стороны кристаллвиолетвакцины: простота ее изготовления, безвредность, возможность применения без учета возраста и состояния супоросности животных, транспортабельность, продолжительный срок годности. Однако у этой вакцины имеются и серьезные недостатки. Она вызывает образование иммунитета у привитых животных через 18—25 дней. Причем иммунитет приобретают свиньи в возрасте 4—5 месяцев. У более молодых животных (3—4 месяца) стойкого иммунитета не образуется. Поэтому молодых животных приходится вакцинировать двукратно через 2—3 месяца (Н. В. Лихачев, 1963).

Лапинизированная вакцина из штамма АСВ (или К) — высокоиммуногенный препарат, способный оборвать начавшуюся в хозяйстве инфекцию. Его применяют в неблагополучных и угрожаемых в отношении чумы хозяйствах. Широкое применение данной вакцины в хозяйствах Советского Союза позволило сократить число неблагополучных по чуме хозяйств. Методика практического применения инактивированной и живой вакцин изложена в специальных наставлениях.

Показана возможность оценки поствакцинального иммунитета по тем же тестам. Например, при помощи РДСК обнаруживали противочумные антитела в 45% случаев в сыворотке свиней, иммунизированных вакциной АСВ (на 6—7-й день после вакцинации). В сыворотке свиней, иммунизированных КВВ, антитела (на 21-й день после вакцинации) обнаруживали в 80—85% случаев (Р. Х. Юсупов).

АФРИКАНСКАЯ ЧУМА СВИНЕЙ

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Африканская чума свиней — острая контагиозная болезнь, характеризующаяся явлениями острого токсикоза, некробиозом клеток лимфоидной ткани, появлением в органах тромбозов, кровоизлияний и заканчивающаяся почти всегда смертельно.

До 1957 года эта инфекция была распространена в некоторых странах Африки. В 1957 г. она появилась в Португалии, в 1960 г. в Испании, в 1964 г. во Франции и в 1967 г. в Италии. Опасность инфекции заключается в том, что погибают все заболевшие животные. Экономический ущерб, наносимый африканской чумой свиней, колоссален. В Испании, например, в течение первых трех лет погибло свыше 300 000 свиней. Долгое время африканская чума свиней проявлялась в виде интенсивной геморрагической септицемии, как в высшей степени контагиозная, быстро протекающая болезнь, вызывающая гибель всех животных среди контаминированного поголовья.

В естественных условиях инкубационный период продолжается от 5 до 7 дней (Лука и сотр., 1967). В экспериментальных условиях он варьирует в зависимости от штамма и дозы вируса и в среднем длится 3—4 дня. Различают сверхострое, острое, подострое и хроническое течение болезни. Чаще наблюдается сверхострое и острое течение. В настоящее время в Испании и Португалии диагностируют подострое и хроническое течение чумы.

При сверхостром течении температура тела у больного животного повышается до 40,5—42°, наблюдается сильное угнетение, сильная одышка и полное истощение. Животное больше лежит, а через 24—72 часа погибает.

При остром (наиболее характерном) течении температура повышается до 40,5—42,0° и понижается за день до гибели животного. Одновременно с повышением температуры появляются первые симптомы болезни: подавленное состояние, парез задней части туловища. Дыхание становится коротким, учащенным, прерывистым, иногда сопровождается кашлем. Может развиться гнойно-слизистый конъюнктивит. Супоросные свиноматки абортируют. Такое течение болезни наблюдают в среднем семь дней с момента повышения температуры.

Хронически чума протекает у единичных животных, перенесших подострое течение. У некоторых диких свиней отмечают скрытое течение болезни и чуму у них устанавливают биопробой на восприимчивых свиньях.

В естественных условиях африканской чумой болеют домашние и дикие свиньи. У некоторых диких африканских свиней болезнь протекает субклинически. Такие животные представляют большую опасность для свиней культурных пород. К экспериментальному заражению невосприимчивы кошки, собаки, мыши, крысы, кролики, куры, голуби, овцы, козы, крупный рогатый скот и лошади.

Поражения, вызванные вирусом африканской чумы свиней, сходны с поражениями, наблюдаемыми при классической (европейской) чуме свиней. В обоих случаях первичные поражения находят в лимфатических узлах и в стенках мелких сосудов. Поражения сосудов обусловливают появление отеков, кровоизлияний, инфарктов. Наиболее характерным признаком при африканской чуме свиней является сильный распад хроматина ядер клеток лимфоцитов. Иногда у павших свиней отсутствуют макроскопические изменения. Однако трупы

хронических больных животных, как правило, истощены, на коже видны цианотичные пятна. При вскрытии обращают на себя внимание распространенные геморрагии в лимфоузлах, по всему пищеварительному тракту, сильное кровенаполнение и увеличение селезенки, обширные субэпикардиальные и субэндокардиальные кровоизлияния, в хронических случаях болезни и у клинически здоровых вирусоносителей — хронический перикардит.

ВИРУС

Величина вирионов 175—215 ммк. Они состоят из осьмиофильной мембраны толщиной 150—180 Å. Мембрана имеет два или три листка. Капсомеры имеют вид свернутых трубочек диаметром 40—60 Å. Наряду с «полными» формами имеются «неполные» формы вирионов. Вирус проходит через фильтры Беркефельда, Шамберлана и Зейтца. Фильтрат так же вирулентен, как и нефильтрованный материал.

Токсономическое положение вируса не определено; установлено, что это ДНК-содержащий вирус, развитие которого в культуре лейкоцитов ингибируется 5-йод-2-дезоксиуридином.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус обладает большой устойчивостью. При 5° он сохраняется в активном состоянии до 5 лет, при комнатной температуре — от 2 до 18 месяцев, при 37° — 10—30 дней и при 55° — 15 минут. Лиофильно высушенная кровь, хранившаяся более 1000 дней при температуре 4, минус 8° оказалась вирулентной. Фильтрат сыворотки крови остается вирулентным при хранении в условиях комнатной температуры от 9 недель до 14 месяцев. В недезинфицированных свинариках вирус сохраняется летом в течение трех недель. Устойчивость вируса определяется природой вируссодержащего материала. В мясе инфицированной свиньи на холоде его обнаруживали через 150 дней.

Вирус чувствителен к эфиру; 1%-ный раствор толуола инактивирует его за 98 дней при 4°, а 3%-ный раствор хлороформа при той же температуре — за 85 дней.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Вирус можно хранить в дефибринированной крови при 4°. В этих условиях он сохраняет активность в течение 6 лет. Культуральные материалы в этих же условиях сохраняют активность до 3 лет. Методы консервирования вируса не разработаны.

Локализация в организме. Вирус обнаруживают во всех органах и тканях больных животных. В крови он проявляется во время первоначального повышения температуры и обнаруживается там до гибели животного в титрах от 10^5 до 10^8 $ГАд_{50}$/мл. В других органах и тканях содержание вируса несколько ниже (до 10^{-6}—$10^{-7,5}$). При хроническом течении болезни титр вируса в крови быстро снижается; виремия носит прерывающийся характер. При отсутствии виремии вирус может долго (до 480 дней) сохраняться в тканях таких животных (селезенка, лимфоузлы) и выявляется только при заражении восприимчивых животных. Точная локализация вируса при латентном течении болезни не установлена.

Антигенные свойства и вариабельность. Существует несколько антигенных типов вируса, которые подтверждаются иммунологической пробой на животных и реакцией задержки гемадсорбции in vitro. Сыворотки, полученные от выживших животных, задерживают реакцию гемадсорбции со штаммом Hinde Кения, тогда как с другими штаммами этого не происходит. В сыворотках реконвалесцентов появляются преципитирующие, комплементсвязывающие и тормозящие гемадсорбцию антитела, влияющие на цитопатогенное действие вируса. Преципитирующие и комплементсвязывающие антитела не являются типоспецифическими, они общие для всех штаммов, тогда как антитела, тормозящие реакцию гемадсорбции, строго типоспецифичны и могут использоваться для типизации вируса африканской чумы свиней.

Культивирование вируса удается на естественно восприимчивых свиньях и культуре лейкоцитов крови и клетках костного мозга свиньи. Для

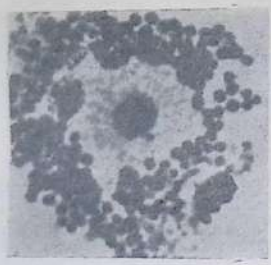


Рис. 1. Инфицированная клетка культуры лейкоцитов через 72 часа после заражения. Адсорбция эритроцитов на поверхности клетки (по Малмквисту и Гею).

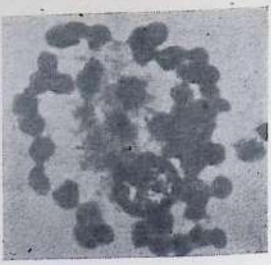


Рис. 2. Многоядерная гигантская клетка культуры лейкоцитов через 72 часа после заражения. Адсорбция эритроцитов на поверхности клетки (по Малмквисту и Гею).

поддержания вируса на свиньях используют ткань селезенки и кровь больны животных, разведенную 10^{-3}—10^{-4}. Вирус вводят подкожно.

В культурах лейкоцитов вирус вызывает цитопатогенное действие и гемад сорбцию. Первые признаки цитопатогенного действия характеризуются сокра щением цитоплазмы, вследствие чего клетка начинает принимать круглую фор му, чем выделяется среди других прикрепившихся к стеклу полиморфных клето Ядро отходит от центра. При окрашивании по Гимза в каждой инфицирован ной клетке видно округленное цитоплазматическое фельгенположительное вклю чение величиной примерно в 5 мк. Параллельно с развитием цитоплазматиче ских включений начинают постепенно поражаться ядра: хроматин уплотняется образуются все увеличивающиеся зерна, которые нагромождаются друг на дру га и локализуются вдоль мембраны ядра. Этот процесс заканчивается распаде нием ядра на несколько мелких капель, рассеивающихся в цитоплазме (Лук Хаас и Ларенади, 1967).

При подкрашивании краской Гимза отделившихся от стекла клеток в контрольном фоне видны мелкие гранулы, рассеянные внутри цитоплазм Полагают, что это сформировавшиеся вирионы, а ранние цитоплазматическ включения — зоны синтеза вирусных компонентов (Буланже и сотр., 1966).

Гемадсорбирующие свойства. В 1960 г. Малмквист и Гей по казали, что вир[illegible]иканской чумы свиней при заражении им культуры ле коцитов или [illegible]ного мозга свиньи вызывает адсорбцию эритроцито подоб[illegible] Фогелем и Щелоковым (1957) с вирусо гр[illegible]

Се[illegible]еток, некоторые из них приобретают сп рые ос[illegible]ерхности эритроциты свиньи и хомяка, кот блюдаетс[illegible] розового цвета. Реакция гемадсорбции легко в ет участ[illegible]ении. Механизм ее пока не ясен. В ней принима вирус не[illegible]ованной клетки, так как свободный внеклеточн всегда св[illegible]тинирующими свойствами. Реакция гемадсорбц поражени[illegible]ами, в цитоплазме которых имеются включения определени[illegible] гемадсорбции бывает четко выражено только п Гемадсорбц[illegible] в культуре, порядка 10^4 LD_{50} (Лука и др., 196 свиней исполь[illegible]опатогенная способность вируса африканской чу фекции (рис. 1, 2).[illegible]качестве метода лабораторной диагностики данной

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Выбор метода диагностики определяется эпизоотической ситуацией данной страны и ее соседей. Как только появляется опасность проникновения вируса африканской чумы на территорию данной страны, диагноз на классическую и африканскую чуму свиней следует ставить одновременно.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА ПРИ ПОМОЩИ РЕАКЦИИ ГЕМАДСОРБЦИИ

Реакция характеризуется тем, что при заражении вирусом африканской чумы свиней культур лейкоцитов (макрофагов) наступает адсорбция эритроцитов на поверхности лейкоцитов с последующим отслаиванием от поверхности стекла (цитопатический эффект). При заражении культур лейкоцитов вирусом обычной чумы свиней феномена гемадсорбции и цитопатогенного действия не наступает.

Методически реакцию ставят следующим образом.

Для обнаружения вируса африканской чумы в исследуемом материале при помощи реакции гемадсорбции выращивают культуру лейкоцитов.

Лабораторная посуда (из нейтрального стекла или стекла «Пирекс») должна быть тщательно вымыта и подготовлена по установленным правилам. Для выращивания культур лейкоцитов лучше использовать чашки Карреля диаметром 6 см или пробирки с плоской скошенной нижней частью стенки. Обычные бактериологические пробирки или другие сосуды со сферической поверхностью можно употреблять после того, как будут получены навыки в оценке результатов реакции.

Выращивание культуры лейкоцитов. *Синтетические питательные растворы.* На основе синтетических растворов готовят питательную среду для культур лейкоцитов. В качестве синтетического раствора используют среду с 0,5% гидролизата лактальбумина (ГЛА) на растворе Хенкса. Удобнее применять модифицированный раствор Тироде (МРТ), так как его легче готовить и по своим качествам он не уступает среде с ГЛА. В состав раствора Тироде входят: натрий хлористый х. ч. 8,0 г; калий хлористый х. ч. 0,2 г; кальций хлористый х. ч. 0,2 г; магний хлористый х. ч. 0,1 г; фосфат натрия однозамещенный х. ч. 0,05 г; глюкоза 4 г; сода двууглекислая х. ч. 1 г; пептон 3 г; цистин хлористоводородный 0,125 г. В качестве растворителя берут дважды дистиллированную воду (1000 мл).

Ингредиенты растворяют в указанном порядке при энергичном встряхивании, после чего ставят раствор в термостат при 37° на 15 часов, затем стерилизуют фильтрацией через фильтр Зейтца (пластина «СФ»). Показатель водородных ионов (pH) раствора доводят до 7,1—7,3 стерильным 3%-ным раствором соды. Для проверки стерильности раствор выдерживают в термостате при 37° в течение 2—3 дней. Раствор можно использовать в течение месяца при хранении его при 4°.

Нормальная сыворотка крови свиньи входит в состав поддерживающей питательной среды. Ее получают из крови заведомо здоровых молодых свиней весом 40—50 кг. Кровь берут в сухой стерильный сосуд и ставят в термостат при 37° на $1^1/_2$—2 часа. Свернувшуюся кровь отделяют от стенки сосуда стеклянной палочкой или пипеткой (обводят), затем ставят в холодильник при 4° на 20—24 часа. Отделившуюся от сгустка сыворотку собирают и стерилизуют фильтрацией через фильтр Зейтца, затем прогревают при 56° в течение 30 минут. Сыворотку можно хранить в течение 1 месяца при температуре 4°. Используют только донорскую (по отношению к лейкоцитам) сыворотку, которую получают из крови животного, служившего источником лейкоцитов.

Эритроциты свиньи. Эритроциты получают из дефибринированной или г
паринизированной ткани трехкратным отмыванием МРТ или ГЛА центрифуг
рованием при 1000 об/мин 5 минут. Используют только донорские эритроцит
Гепарин применяют в качестве стабилизатора для предотвращения сверт
вания крови и выпадения нитей фибрина в суспензии лейкоцитов.
Раствор поливинилового спирта используют для ускорения процесса ра
слоения гепаринизированной крови и получения максимального количест
лейкоцитов и плазмы.
Поддерживающая питательная среда для культур лейкоцитов применяетс
после заражения их вирусом. Ее готовят следующим образом. К 85 мл модифи
цированного раствора Тироде или ГЛА добавляют 15 мл донорской сыворотк
крови свиней и 0,1 мл отмытых эритроцитов. Затем вносят гепарин из расчет
по 5 МЕ на 1 мл среды. Содержимое хорошо взбалтывают, после чего внося
пенициллин и стрептомицин по 100—200 ЕД на 1 мл, pH среды доводят д
7,1—7,3 раствором соды или уксусной кислоты.
Приготовление суспензии лейкоцитов и выращивание культур. Лейкоцит
получают из крови здоровых подсвинков весом 40—50 кг, не вакцинированны
биопрепаратами. Кровь берут из передней полой вены или из сонной артер
(тотальное обескровливание) с соблюдением правил асептики.
Для получения лейкоцитов достаточно взять 50 мл крови в стерильну
колбу, куда предварительно вносят гепарин из расчета 10 МЕ на 1 мл кров
(от этого же животного в другой сосуд берут 100 мл крови для получения до
норской сыворотки). Во время взятия крови колбу осторожно покачивают дл
равномерного распределения гепарина. Кровь после получения доставляют
стерильную камеру, где ее сливают в 100-миллиметровый цилиндр, в которы
предварительно вносят 7 мл раствора поливинилового спирта и после переме
шивания оставляют при комнатной температуре для отстаивания. В течени
30—60 минут кровь разделяется на два слоя: верхний — плазму, в которой на
ходятся во взвешенном состоянии лейкоциты, и нижний — эритроциты.

Примечание. В теплое время года кровь можно отстаивать без приме
нения поливинилового спирта, хотя в этом случае процент выхода плазмы и
лейкоцитов будет значительно ниже.
Приготовление суспензии лейкоцитов и выращивание культур. Плазму ос
торожно отсасывают пипеткой, не касаясь слоя эритроцитов, и суспендируют
в четырехкратном объеме модифицированного раствора Тироде или ГЛА
(pH 7,1—7,3), в который добавляют на каждый миллилитр по 10 МЕ гепарина
и по 100—200 ЕД пенициллина и стрептомицина.
После тщательного перемешивания (пипетирования) суспензии определяют
концентрацию лейкоцитов. Для этого в пробирку берут пробу суспензии в ко
личестве 1 мл и вносят 1 мл 3%-ного раствора уксусной кислоты для лизиро
вания эритроцитов. Лейкоциты подсчитывают в камере Горяева, в 15 больших
квадратах (один ряд). Количество лейкоцитов в 1 мл определяют по формуле:

$$x = \frac{a \cdot 15 \cdot 2x}{0{,}9} \cdot 1000 = \frac{a}{3} \cdot 100\,000,$$

где X — количество лейкоцитов в 1 мл; a — количество лейкоцитов в 15 больших
квадратах одного ряда; 15 — количество рядов; 2 — коэффициент разведения
суспензии добавлением раствора уксусной кислоты; 0,9 — объем камеры в мм³;
1000 — количество мм³ в 1 мл.
Пример. В 15 больших квадратах подсчитано 120 лейкоцитов. Подстав
ляя значение в формулу $x = \frac{a}{3} \cdot 100\,000$, и имеем $\frac{120}{3} \cdot 100\,000 = 4\,000\,000$.

Для посева используют суспензию, содержащую 3,5—4,5 млн. лейкоцитов в
1 мл. Если лейкоцитов в 1 мл суспензии оказалось больше, ее разбавляют со
ответствующим количеством МРТ или ГЛА с гепарином и антибиотиками.
Приготовленную суспензию лейкоцитов разливают в чашки Карреля, п
10 мл на чашку, или в пробирки, по 2 мл на пробирку. Чашки (пробирки) плот
но закупоривают резиновыми пробками и помещают в термостат при 37° н

2—3 суток. Пробирки должны находиться в наклонном положении под углом 5° к горизонтальной плоскости.

Через 2—3 часа лейкоциты прикрепляются к поверхности стекла. В этот период они еще недостаточно прочно удерживаются на стекле, поэтому просматривать их следует через 19—24 часа. Обычно через 24 часа жизнеспособные лейкоциты прочно фиксируются на поверхности стекла и интенсивно растут. На третьи сутки культивирования в клетках наблюдается выраженная зернистость, ядро и цитоплазма сильно гипертрофируются, образуются большие клетки — макрофаги, в 40—50 раз превышающие величину лейкоцитов. Форма их круглая, овальная, некоторые с псевдоподиями. При дальнейшем культивировании иногда появляются гигантские многоядерные клетки, которые превышают величину макрофагов в 20—50 раз.

Приготовление испытуемого и контрольного материала. Материалом для исследования служит дефибринированная кровь или 10%-ная суспензия селезенки или лимфоузлов, полученных стерильно от животного, подозреваемого в заболевании африканской чумой. Если имеются опасения, что материал получен нестерильно, к нему добавляют пенициллин и стрептомицин из расчета по 300 ЕД каждого на 1 мл суспензии или крови.

Кровь дефибринируют в сосуде с бусами и немедленно отсасывают, освобождаясь от сгустка.

Навеску исследуемого материала органов (селезенка, лимфоузлы) измельчают ножницами, а затем растирают в ступке с кварцевым песком, добавляя МРТ или ГЛА до получения 10%-ной суспензии. Суспензию центрифугируют при 1000 об/мин 10 минут. Надосадочную жидкость исследуют.

Контрольным материалом служит дефибринированная кровь или суспензия селезенки или лимфоузлов, полученные от заведомо здоровых свиней.

Перед постановкой опыта материалы разбавляют в 10 раз модифицированным раствором Тироде или средой ГЛА.

Постановка главного опыта. *Заражение культур.* Отбирают чашки (пробирки) с культурами лейкоцитов, просматривая их при малом увеличении микроскопа. Обращают внимание на то, чтобы лейкоциты имели нормальную морфологию.

Если в исследуемом материале содержался вирус в высокой концентрации, то через 15—18 часов на поверхности отдельных клеток адсорбируются эритроциты. Через 30—48 часов гемадсорбция становится отчетливой, так как к этому времени поражается большинство лейкоцитов. Эритроциты прилипают к поверхности лейкоцитов, прочно на них удерживаются и при встряхивании не отделяются. На фоне светло-серых лейкоцитов они имеют красный цвет. Через 48—72 часа некоторые лейкоциты, нагруженные эритроцитами, отслаиваются от поверхности стекла (цитопатический эффект). Через 3—5 суток после заражения (в зависимости от концентрации вируса) лейкоциты полностью отслаиваются от стекла.

Аналогичные изменения происходят в культурах, зараженных материалом с низкой концентрацией вируса. Разница состоит в том, что гемадсорбция наступает позднее — на 3—5-е сутки, а цитопатогенное действие — на 5—7-е сутки.

Реакция считается положительной, если в культурах лейкоцитов, зараженных исследуемым материалом, гемадсорбция отчетливо проявляется на 2—5-е сутки после заражения, с последующим цитопатогенным действием на 3—7-е сутки, при отсутствии гемадсорбции и цитопатогенного действия в контроле.

Примечание. Иногда некоторые образцы исследуемого материа вызывая отчетливой гемадсорбции, дают только цитопатогенное действие. В ких случаях следует сменить питательную среду в зараженных культур момент появления первых признаков цитопатогенного действия (на 2—4-й после заражения) или заразить новые культуры лейкоцитов материалом из вично зараженных культур. Выполнение этих манипуляций возвращает вир гемадсорбирующую активность.

Реакция гемадсорбции — специфическая методика для определения сво вируса африканской чумы, но для применения в практической диагностике имеет следующие неудобства (Лука и сотр., 1967). С одной стороны, слабо рулентные штаммы, такие, как выделенные во Франции, необходимо предва тельно пассировать для того, чтобы их можно было идентифицировать мето Малмквиста. С другой стороны, Лука(1967) считает, что необходимо провер восприимчивость каждой группы лейкоцитарной культуры перед ее исполь ванием.

В благополучной стране, которая не располагает заведомо вирулентным рошо изученным в реакции гемадсорбции вирусом, данная реакция треб большой затраты времени и представляет большой риск заражения.

По данным Лука и др. (1967), из вирусов, выделенных во Франции 1964 г., один сразу дал очень сильную реакцию, гемадсорбции, другие же — лую и сомнительную. По мнению специалистов Испании и Португалии, для л лучения четкой реакции гемадсорбции необходимо, чтобы титр вируса был ниже 10^4 LD_{50}. Появившиеся позднее в Испании и Франции эпизоотичес штаммы имели низкий титр в селезенке, поэтому их трудно было обнаруж при помощи данной пробы. Однако если эти штаммы получали от эксперим тально зараженных свиней в период температурного пика, то они давали четк реакцию гемадсорбции. Приведенный пример касается не вирулентности шта ма, а качества его в образце патологического материала.

По данным испанских специалистов, нужно не менее десяти дней следи за посевом подозрительного материала и провести один пассаж материала новой культуре, как только состояние первично зараженной культуры ста несколько отличаться от контрольных культур. Признаки типичной реакции гемадсорбции, сопровождающиеся цитолизом, свидетельствуют о присутствии в руса африканской чумы свиней. Окончательное суждение возможно только по ле трех последовательных пассажей по следующей схеме (Лука и сотр., 1967)

Первый пассаж

ГАд+ ЦПД + От 2 до 10 дня	ГАд− ЦПД + До истечения 10 дней	ГАд− ЦПД − В течение 10 дней
Результат: ачс +		Результат: ачс −

Второй пассаж

ГАд+ ЦПД + Между 2 и 10 днем	ГАд− ЦПД + До истечения 10 дней	ГАд− ЦПД − В течение 10 дней
Результат: ачс +		Результат: ачс −

Третий пассаж

ГАд+ ЦПД + Между 2 и 10-м днем		ГАд− ЦПД − В течение 10 дней
Результат: ачс +		Результат: ачс −

Цитологические исследования. Лореноди и сотр. (1966) рекомендуют параллельно с реакцией гемадсорбции проводить цитологическое исследование на наличие цитоплазматических включений и поражений ядра. Для этого лейкоцитарные культуры выращивают на слюдинках, которые через 48 часов после инфицирования окрашивают краской Гимза. Метод культуры на слюдинках можно сочетать с иммунофлуоресценцией.

Реакция задержки гемадсорбции. Еще в 1960 г. Малмквист и Гей показали, что сыворотка переболевших свиней способна ингибировать гемадсорбцию и что эта реакция является штаммоспецифической. Реакцию ингибиции гемадсорбции можно ставить двумя методами.

Первый метод заключается в инокуляции культуры лейкоцитов (предварительно освобожденных от эритроцитов) смесью 0,2 мл вируса (титр 10^3 $ГАД_{50}$) и 0,2 мл испытуемой сыворотки после их контактирования в течение часа при 37°. Смесью инокулируют культуру лейкоцитов и инкубируют при 37° в течение 3 суток. Контрольные культуры заражают смесью вируса и нормальной сыворотки.

Второй метод более специфичен. Испытуемую антисыворотку добавляют в культуру лишь в том случае, если изменению, подвергалось 60—90% клеток Степень заражения оценивают по процентному отношению клеток, имеющих характерные включения, к общему числу клеток в поле зрения. Ингибирующую активность испытуемой сыворотки устанавливают на основании процентного отношения зараженных клеток, не имеющих венчика адсорбированных эритроцитов, к клеткам контрольных пробирок. Данный метод постановки реакции ингибиции гемадсорбции имеет преимущества перед предыдущим. Во-первых, удаление эритроцитов из культуры предотвращает возникновение фагоцитоза. Наличие фагоцитарных эритроцитов затрудняет интерпретацию феномена гемадсорбции и маскирует цитоплазматические включения. Во-вторых, восстановление культур перед добавлением эритроцитов позволяет удалить вещества клеточного обмена (метаболиты).

При использовании этого метода культуры лейкоцитов готовят в пробирках со слюдинками. После 2—3-дневной инкубации при 37° и до того, как клетки начнут проявлять признаки фагоцитоза в отношении остаточных эритроцитов, культуры многократно промывают раствором Хенкса до полного удаления эритроцитов, затем восстанавливают средой культивирования и заражают вирусом. В три контрольные пробирки добавляют суспензию эритроцитов. Когда в этих пробирках гемадсорбция наблюдается более чем на 60% пораженных клеток при отсутствии цитолиза, культуральную жидкость сливают и среду культивирования заменяют средой, содержащей различные разведения испытуемой сыворотки. Пробирки помещают на 1 час в термостат (37°), затем в них добавляют по две капли суспензии эритроцитов и вновь помещают на 1 час в термостат. Через час слюдинки осторожно вынимают из пробирок, фиксируют метиловым спиртом и окрашивают по Гимза. Готовый препарат микроскопируют, вычисляют процент клеток, имеющих включения и проявляющих признаки гемадсорбции, а также процент клеток, имеющих только включения, но без гемадсорбции. Результаты учитывают по форме (Корнеро, Лоренади и др., 1967), представленной в таблице 1.

В зараженных культурах клеток в присутствии позитивной антисыворотки, как в контрольных, происходит образование включений, цитолиз и одинаковое накопление вируса. Но наблюдается задержка гемадсорбции.

Данный метод применим при изучении развития антител — ингибиторов гемадсорбции в сыворотках животных, выживших в результате естественного заражения или прививки аттенуированным вариантом вируса, а также для возможного выявления скрытого течения африканской чумы. Антитела, ингибирующие гемадсорбцию, достигают максимального титра с 35-го по 42-й день после инфицирования.

Реакция диффузионной преципитации (РДП) успешно применяется для обнаружения специфического антигена в органах павших свиней (печень, селезенка), а также для выявления специфических преципитирующих антител в сыворотках и тканях хронически больных животных. (Булланже, Баннистер и др., 1967). Положительная реакция была отмечена с тканями, полученными

через 24 часа после подъема температуры, перед появлением других клин ских признаков. Поскольку специфичность РДП была доказана и при евро ской чуме свиней, то авторы предложили данную реакцию для целей диф ренциации двух видов чумы свиней. Авторы использовали сыворотку свиней, мунизированных аттенуированным вариантом вируса, которая давала преци тацию с материалами от больных свиней и с детритом инфицированных клет

ТАБЛИЦ

Форма учета клеток, имеющих признаки гемадсорбции и включения, и тол включения

№ штаммов вируса	Контроль		Разведения антисыворотки											
	зараженные клетки, в %		1 : 10		1 : 50		1 : 100		1 : 200		1 : 500		1 : 10	
	ГАд и включения	включения	ГАд и включения	включения	ГАд и включения	включения	ГАд и включения	включения	ГАд и включения	включения	ГАд и включения	включения	ГАд и включения	
31	80	20	0	100	0,5	99,5	1	99	22	78	40	60	82	1
32	95	5	0	100	0	100	0	100	25	35	42	58	93	
86	95	10	0	100	0	100	0,25	99,7	24	76	35	65	88	

Постановка реакции. *Состав среды:* 1% агара в боратном буфе с содержанием 0,1% тиомерсала pH 7,2. В агаре, разлитом в чашки Петри, д лают семь лунок по 7 мм в диаметре, расположенных на расстоянии 4 мм др от друга и от центральной лунки. Тканевую культуру селезенки или печени м мещают в три лунки (№ 2, 4 и 6). Лунки заполняют мелкими кусочками ткан по Манси (1957). Пробы ткани предварительно промывают физиологическ раствором для удаления крови. В промежуточные лунки (№ 1 и 3) заливаю стандартную иммунную сыворотку. Последнюю, пятую, лунку заполняют ста дартной нормальной сывороткой. Центральную лунку заполняют заведомо и вестной вируссодержащей тканью. Перед постановкой опыта пульпу селезен и печени однократно замораживают и оттаивают. Лунки, содержащие ткан вую массу, заполняют на 1—3 часа раньше, чем заливают сыворотку, чтоб антиген мог диффундировать. Перед опытом сыворотку прогревают при 5 в течение 30 минут. Чашки с реагирующими компонентами в агаре выдерж вают во влажной камере при комнатной температуре 24 часа. Контрольную им мунную сыворотку используют разведенной 1 : 2—1 : 4. Антиген при получени преципитирующей иммунной сыворотки готовят в тканевой культуре, центриф гируют и обрабатывают ультразвуком.

В селезенке животных, убитых в ранней стадии заболевания, содержитс больше антигена, чем в печени. Однако ткань печени лучше идет в реакции о убитых или погибших свиней, так как содержит меньше гемоглобина, чем ткан селезенки. РДП с селезенкой и печенью хронически больных свиней не полу чается, вероятно, вследствие того, что органы таких животных содержат ка антитела, так и антиген.

Все изученные авторами штаммы реагировали в РДП с одной сывороткой, что свидетельствует о широких возможностях применения РДП с диагностиче ской целью. Помимо нативных сывороток, в РДП можно использовать глобу линовую фракцию, которую преципитируют при pH 6,8 добавлением 75%-ного сульфата аммония до получения 30%-ной концентрации. Азот определяют мик рометодом Кьельдаля; концентрацию белка доводят до 1%.

По данным Коччинса (1966), РДП при африканской чуме свиней специфич на и удобна в полевых условиях при остром течении болезни.

Модифицированный прямой метод реакции связывания комплемента, разработанный Буллаже, Баннистером и др. (1961, 1967), высокочувствителен при обнаружении антигена вируса африканской чумы в испытуемых тканях, взятых от свиней в период острого течения болезни (через день после повышения температуры). При хронической инфекции, когда наблюдается выздоровление животных, или после иммунизации модифицированным вариантом при помощи указанной реакции обнаружить специфический антиген не удается. В этих случаях при помощи модифицированной РСК устанавливают лишь сывороточные антитела (в случаях серологической оценки постинфекционного и поствакцинального иммунитетов). Комплементсвязывающий антиген получают методом экстракции испытуемой ткани смесью ацетона и эфира. Ткани (селезенка, печень и др.) гомогенизируют в смеси ацетона и эфира, взятых в равных объемах, соотношение 1 : 20. После осветления и низкоскоростного центрифугирования антиген элюируют из осадка солевым раствором, взятым в двойном количестве от веса пробы ткани. Надосадочную жидкость используют как антиген. В отличие от антител, задерживающих гемадсорбцию, комплементсвязывающие антитела являются общими для всех типов вируса африканской чумы. Специфические свиные комплементсвязывающие сыворотки получают на свиньях, иммунизированных аттенуированным штаммом (вируссодержащая кровь первого пассажа на свиньях) и зараженных гомологичным вирулентным вирусом африканской чумы.

Метод иммунофлуоресценции. Специфический флуоресцирующий антиген впервые обнаружен в цитоплазме инфицированных клеток почки свиньи, а затем были разработаны методы выявления его в мазках-отпечатках органов больных животных. С этой целью от погибших животных берут пробы селезенки, печени, почки, желудочных лимфатических узлов и др. Из каждой пробы готовят мазки-отпечатки, которые высушивают на воздухе и фиксируют. Для фиксации и окрашивания применяют прямой метод Куиса и Каплана. Тканевые мазки-отпечатки фиксируют ацетоном при комнатной температуре 10 минут, высушивают при 37° в течение 20 минут. Меченые антитела наносят на препараты и оставляют при 37° на 30 минут во влажной камере. Затем препараты отмывают 10 минут фосфатным буфером (pH 7,0; 0,16 М) и заливают буферным глицерином (pH 7,0) до проверки.

Антитела, меченные флуоресцеинизотиоционатом, получают из сывороток крови гипериммунизированных поросят после прививки аттенуированным штаммом вируса. Специфический глобулин преципитируют при pH 6,8, добавляя в сыворотку 75%-ный сульфат аммония до 30%-ной концентрации. Преципитат растворяют в солевом растворе, избыток сульфата аммония удаляют диализом. Концентрацию белка доводят до 1% и pH до 9,0; флуоресцеинизотиоционат добавляют из расчета 0,05 мг на 1 мг белка. Свободный флуоресцеин удаляют гельфильтрацией на сефадексе G=50, а флуоресцирующие антитела концентрируют до половины первоначального объема сыворотки при помощи диализа и лиофилизации.

Специфичность флуоресценции антигена возбудителя африканской чумы определяют: 1) по отсутствию флуоресцирующих включений в контрольных препаратах; 2) по блокированию флуоресценции включений в инфицированных препаратах путем предварительной обработки их немеченой антисывороткой африканской чумы и 3) по неспособности иммунных сывороток против классической чумы свиней и нормальных сывороток блокировать окрашивание АЧС-антигена специфическими флуоресцирующими антителами.

Препараты просматривают под люминесцентным микроскопом с ртутной лампой высокого давления; используют возбуждающие фильтры Bg=12 (T=270—470 ммк) и № 47 (ограждение) фильтр (T=470 ммк).

Хеллеле, Кочинс и Стоун (1966) показали, что метод флуоресцирующих антител может быть ценным при диагностике острого течения африканской чумы свиней. Специфический флуоресцирующий антиген африканской чумы свиней, обнаруживающийся в клетках мазков-отпечатков селезенки, желудочных лимфоузлов и печени павших животных, дает основание считать, что данный метод может быть использован как быстрый диагностический тест. Неудачи при обнаружении специфической флуоресценции в тканевых мазках-отпечат-

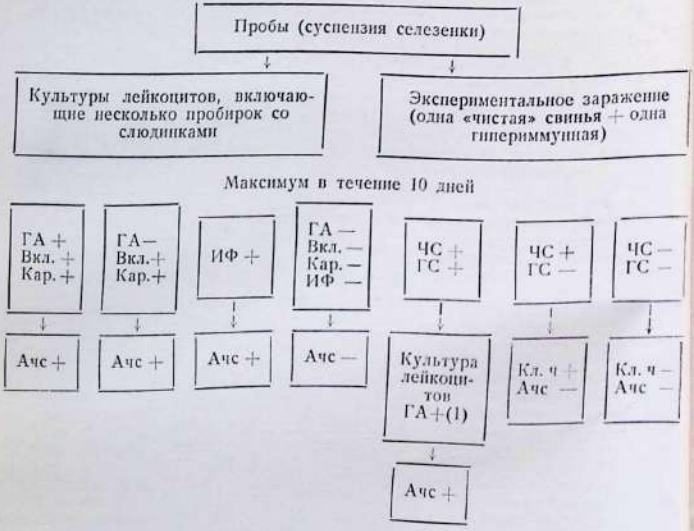
ках животных, не болеющих остро и выживающих, видимо, обусловлены пр
сутствием антител в их тканях, которые блокируют реакцию антигена с ме
ными антителами.

Реакция нейтрализации впервые испытана Коччинсом (1968). Иммунн
сыворотки выживших поросят-реконвалесцентов или вакцинированных осла
ленными штаммами нейтрализуют цитопатогенное действие гомологичного в
руса. Данная реакция еще не нашла практического применения в лабораторн
диагностике африканской чумы свиней.

Иммунологическая проба основана на заражении испытуемым материало
свиней, иммунных и неиммунных к классической чуме (по два животных
Иммунологическая проба технически не сложна, но в санитарном отношени
должна быть проведена с соблюдением всех мер, предупреждающих вынос и
фекции. От экспериментально зараженных больных животных берут крова
селезенку, лимфатические узлы, готовят суспензию и заражают ею культур
лейкоцитов с целью выявления специфических внутриклеточных включений
феномена гемадсорбции.

ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Постановку экспериментального диагноза (с использованием культуры лей
коцитов и иммунологической пробы на животных) можно представить следую
щим образом (Лука и сотр., 1967):



Сокращения: ГА — гемадсорбция; Вкл. — включения; Кар. — кариорексис; ИФ — иммунофлуоресценция; ЧС — «чистая» свинья; ГС — гипериммунная свинья; Ачс — африканская чума свиней; Кл. ч. — классическая чума свиней.

Патология зараженных клеток проявляется в следующие сроки: цитоплазматические включения, кариорексис, Иф появляются на 6-й час, а ГА — на 16-й час.

Французские специалисты (Лука, Хиаг и Лоренади, 1967) разработали несколько вариантов методов практической постановки диагноза на африканскую и классическую чуму, которые следует применять в соответствии с требованиями эпизоотической ситуации, преследуя цель быстрее и максимально точнее выявить очаги африканской чумы. Когда очагов африканской чумы нет, но есть возможность их появления и существуют немногочисленные очаги классической чумы, дифференциальный диагноз ставят методом иммунологической пробы и реакции ГА на культурах инфицированных лейкоцитов. Реакцию проводят во всех случаях с пробами патологического материала, полученного в момент максимального повышения температуры после заражения испытуемым материалом. Этим методом можно быстро обнаружить вирус африканской чумы — через 16 часов после взятия крови, в частности штаммы слабой вирулентности, не проводя слепых пассажей на лейкоцитарных культурах.

Когда очагов африканской чумы нет, но еще не прошла опасность появления их, а число очагов классической чумы свиней увеличивается, применяется та же система диагностики, но при недостаточном количестве свинарников, используемых лабораторией для выделения вируса, каждой свинье инокулируют по 2—3 подозрительные пробы, полученные из одного географического района. В случае обнаружения вируса африканской чумы те пункты, из которых поступили эти 2—3 пробы (введенные одному животному), можно рассматривать как очаги болезни до тех пор, пока не появилась возможность поставить отдельно диагноз в каждом из этих пунктов при помощи реакции ГА или повторной отдельной инокуляцией.

В этом случае, если насчитывается большое число очагов африканской и классической чумы свиней, прежде всего нужно диагностировать африканскую чуму, поэтому полученные пробы инокулируют только свиньям, гипериммунным в отношении классической чумы; реакцию ГА проводят во всех случаях. Когда наблюдается эпизоотическая волна африканской чумы свиней, практически остается проводить только реакцию ГА.

Ретроспективная диагностика не разработана. В сыворотках выживших животных удается обнаружить преципитирующие и комплементсвязывающие антитела указанным выше методом.

Серологическая оценка поствакцинального иммунитета также не разработана, поскольку нет иммуногенных живых и инактивированных вакцин. Применявшиеся аттенуированные варианты не оправдали надежд, так как в зонах их применения возникали очаги атипичного проявления инфекции.

БОЛЕЗНЬ ТЕШЕНА

TESCHEN DISEASE (ENCEPHALOMYELITIS INFECTIOSA SUUM)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Болезнь Тешена (энзоотический энцефаломиелит свиней, полиомиелит свиней, инфекционный паралич свиней, болезнь Талфана, болезнь Клобуока) — вирусная болезнь свиней, характеризующаяся развитием негнойного энцефаломиелита и появлением параличей. Болезнь проявляется клиническими признаками поражения центральной нервной системы (гиперстезия, мышечный тремор, нистагм, опистотонус, тонико-клонические судороги, «ходульная походка», параличи конечностей, мышц шеи, глотки).

К настоящему времени болезнь Тешена и сходные с нею болезни установлены в большинстве европейских стран. В Советском Союзе они не зарегистрированы.

Инфекционный энцефаломиелит свиней, известный в настоящее время под названием болезни Тешена, впервые был описан Трефни (1929), который наблюдал вспышку этой болезни среди свиней в местечке Тешени (Чехословакия); отсюда болезнь и получила свое название. К началу 50-х годов энзоотические [illegible]ники болезни Тешена и тешеноподобных энцефаломиелитов свиней были [illegible]рованы как в Европе, так и на других континентах (Австралия, Южная Америка, Африка).

[illegible]льного варьирования в широте охвата поголовья, возраста [illegible]ных, течения и летальности эти заболевания во многих случаях [illegible]од различными самостоятельными названиями (полиомиелит [illegible]фана, энцефаломиелит поросят и др.). Исследования последних лет [illegible]однако, что по характеру клинических и патологоморфологических [illegible] эти болезни крайне сходны. Использование же современных [illegible]ских и серологических исследований позволило установить, что [illegible]лями их являются вирусы, родственные в антигенном отношении [illegible]зни Тешена. Однако в ряде случаев вспышки энцефаломиелита [illegible]ут быть вызваны энтеровирусами свиней, отличающимися от возбудителя [illegible]олезни Тешена, а также гемагглютинирующими вирусными агентами. [illegible]кономическое положение которых еще точно не определено. Все это позволяет говорить о группе клинически сходных вирусных полиэнцефаломиелитов свиней, среди которых преобладающее значение имеют болезнь Тешена и тешеноподобные болезни. Вопросы взаимосвязей и различий между ними, а также между их возбудителями подлежат дальнейшему изучению и уточнению.

Инкубационный период при болезни Тешена продолжается 1—4 недели. В продромальном периоде, редко превышающем 72 часа, отмечают невысокую лихорадку, потерю аппетита, иногда рвоту, острый ринит, расстройство координации движений. Часто эти нарушения столь незначительны, что остаются незамеченными. Затем появляются клинические признаки поражения центральной нервной системы, которые бывают весьма разнообразны. При энцефаломиелитной форме наблюдают гиперстезию кожи, судорожные сокращения различных групп мышц, непроизвольные движения, ригидность мышц конечностей, нистагм и т. п. Затем развиваются симптомы поражения спинного мозга — шатающаяся, напряженная походка, слабость конечностей, неполное их опирание на землю, прогрессирующий паралич, постепенно захватывающий все конечно-

сти, шею и голову. Из-за паралича глотки часто отмечают частичную или полную утрату голоса. В тяжелых случаях заболевание обычно заканчивается комой и гибелью животных. В более легких случаях отмечают затрудненную походку, развитие полупараличей и параличей без явлений возбуждения.

Существенные патологоанатомические изменения находят только в центральной нервной системе. Обычно они выражаются в гиперемии мозговых оболочек, легкой серозной их инфильтрации; на срезах мозга в различных местах отмечают кровоизлияния. В спинном мозге обнаруживают гиперемию, изредка кровоизлияния. Диагностическую ценность имеют в основном гистологические изменения, обычно наиболее выраженные в средней и каудальной частях головного мозга (особенно на его основании — ножках мозга и четверохолмии), а также в шейной и поясничной частях спинного мозга.

В головном мозге изменения характеризуются общей инфильтрацией и периваскулярной круглоклеточной инфильтрацией с образованием очагов нейронофагии, причем обычно пораженным оказывается лишь серое вещество мозга. В мозжечке, как правило, обнаруживают изменения в клетках Пуркинье. В спинном мозге серое вещество всегда инфильтрировано, наиболее характерные изменения находят в ганглиозных клетках, в особенности поражаются моторные центры вентральных рогов («разжижение» ядер клеток, образование вакуолей, наличие кариорексиса). Значительная нейронофагия преобладает в вентральных рогах поясничной области спинного мозга.

ВИРУС

Возбудителем болезни Тешена является мелкий РНК-содержащий вирус, относящийся к группе пикорнавирусов (семейство свиных энтеровирусов). Вирионы имеют сферическую форму и достигают 25—30 ммк в диаметре. Вирус фильтруется через фильтры Шамберляна L_3, Беркефельда V, N и W и фильтр Зейтца.

Устойчивость. Вирус устойчив к эфиру, хлороформу и трипсину, сохраняет свою активность без изменений в широком диапазоне pH (2,8—9,5). При pH 11,8 инфекционность вируса быстро снижается на 50%. Вирус относительно термостабилен — выдерживает нагревание при 60° в течение 15 минут, но инактивируется за 20 минут. После частичной очистки протаминсульфатом вирус инактивируется при 50° в течение 20 минут. При 37° он может переживать до 17 дней, но быстро погибает при развитии гнилостных процессов. Вирус хорошо сохраняется при 4° и при минус 79°, а также в глицерине; нечувствителен к действию антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, нистатин) и быстро инактивируется 0,15%-ным формальдегидом. Размножение и цитопатогенное действие вируса частично ингибируется 2-(α-гидроксибензил)-бензимидазолом.

Хранение и консервирование вируссодержащих материалов. Вируссодержащие материалы сохраняются в активном состоянии при температурах минус 20—80° и в 50%-ном глицерине в течение нескольких лет. В связи с тем, что вирус быстро погибает в гнющем материале, вируссодержащие материалы надо сразу после взятия поместить в 50%-ный глицерин или в раствор Хэнкса с антибиотиками и поставить в термос со льдом.

Локализация в организме. Местом первичной локализации и размножения вируса болезни Тешена в организме свиней являются ткани желудочно-кишечного тракта, в которых он появляется через 24—72 часа после заражения per os и может быть обнаружен на протяжении 5—7 недель. Наивысшие титры вируса (10^6 $ТЦД_{50}$/г) в пробах фекалий обнаруживают между 5 и 10-м днями после заражения. В миндалинах и мезентериальных брыжеечных лимфоузлах вирус появляется через 48 часов после заражения и может обнаруживаться там в течение 6—8 дней. Виремию, редко длящуюся более 48 часов, отмечают между 4—6-м днями после перорального заражения, но титры вируса в крови обычно бывают невысокими. В это же время вирус в невысоких титрах содержится в печени, селезенке, почках.

В головном и спинном мозге вирус появляется после периода виремии. В максимальных титрах ($10^{5,5}$—$10^{6,6}$ $ТЦД_{50}$/г) вирус содержится там еще до

появления признаков болезни (конец инкубационного периода) и в течение пе
вых 1—2 дней после начала проявления клиники (до начала или в самом на
чале паралитической стадии). В наиболее высоких концентрациях вирус соде
жится в шейном и грудном отделах спинного мозга и в мозжечке, что делае
эти ткани наиболее пригодным материалом для выделения вируса. К пятом
дню после появления клинических признаков болезни содержание вируса в тка
ниях центральной нервной системы становится крайне низким, и к моменту ги
бели животного можно наблюдать так называемую «аутостерилизацию».

Антигенные свойства и вариабельность. В крови больны
и переболевших животных появляются специфические вируснейтрализующие
и преципитирующие антитела. Показано наличие антигенного родства между ви
русами болезни Тешена и болезни Талфана, в реакциях нейтрализации и РСК.
В иммунологическом отношении вирусы группы болезни Тешена являются еди
ным типом, внутри которого можно различить два подтипа, первый из ко
включает штаммы Bozen, Konratice и Reporyie, а второй — Tyrol, Sweden U. G.
и вирус Талфана.

ТАБЛИЦА 1

Классификация энтеровирусов свиней по антигенным свойствам
(по Беттсу, 1962)

Серологическая группа	Штаммы	Примечания
I	Вирусы Тешена—Талфана Bozen, Konratice Reporyie	Первая подгруппа
	Штаммы Talfan, Tyrol Sweden UG	Вторая подгруппа
II	T-80, T-52A, 52, 180/4	Группы T-80, PECSO-вирусы
III	F-7	
IV	V-13, (F-41)*	
V	F-12	
VI	F-34, (F-45), (F-53)	ECPO (ECSO)-вирусы
VII	F-70, (F-39), (F-65)	
VIII	F-76, (F-78)	
XI	F-17, F-26, F-32, F-35, F-38, F-43, F-59	

* В скобках даны названия штаммов, изученных недостаточно полно.

Наряду с вирусами болезни Тешена—Талфана, имеются другие энтеровирусы, способные вызывать энцефаломиелитный синдром у молодых поросят (см. табл. 1). Среди них следует отметить вирусы группы T-80, в которую включены вирусы T-80 и T-52, выделенные Бетсом в Англии, и вирус 180/4, выделенный Сибалин и Ланнек в Швеции. Вирусы этой группы известны под названием PECSO (polioencephalomyelitis cytopathogenic swine orphan). Их выделяют преимущественно из пищеварительного тракта свиней и поросят. Они обычно не связаны с естественными эпизоотиями, но при экспериментальном заражении вызывают полиоэнцефаломиелит у поросят, лишенных антител. Между собой вирусы дают перекрестную или частичную нейтрализацию, но отличаются в антигенном отношении от вирусов болезни Тешена — Талфана.

Среди других энтеровирусов свиней, также обусловливающих развитие энцефалита у поросят, имеется ряд [ECPO (ECSO) — enteric cytopathogenic porcine (swine) orphan] вирусов, которые обычно также выделяются из пищеварительного тракта. Эти вирусы могут вызывать негнойный полиоэнцефаломиелит, особенно после интрацеребрального введения.

Отношения между группами вирусов PECSO и ECPO, а также внутри этих групп не всегда вполне ясны и подлежат дальнейшему изучению и уточнению. Дан с сотрудниками (1967), сравнивая в опытах перекрестной нейтрализации 58 штаммов энтеровирусов свиней, выделенных в США, выявили наличие 15 серологических групп. Представители этих групп реагировали с антисыворотками к вирусам Тешена, Талфана и Т-80. Около $^3/_5$ всех вирусов способны были вызывать выраженные в различной степени энцефалиты у поросят при искусственном заражении. Авторы полагают, что еще большее количество вирусов может оказаться патогенным для поросят, если производить заражение при оптимальных условиях (интракраниальное введение вируса).

Помимо различных энтеровирусов, описанных выше, энцефаломиелиты у поросят могут быть вызваны гемагглютинирующими вирусными агентами, которые, по-видимому, относятся к миксовирусам (группа парагриппозных вирусов). Вирусы этой группы, выделенные в Онтарио (Канада), вызывали заболевание у поросят моложе 2-недельного возраста в естественных условиях и при экспериментальном заражении. В иммунологическом и серологическом отношениях эти вирусы отличаются как от вирусов болезни Тешена—Талфана, так и от других энтеровирусов свиней, этиологически связанных с энцефаломиелитами. Вирус болезни Тешена не имеет антигенного родства с возбудителем полиомиелита человека, мышиного энцефаломиелита, японского энцефалита, западного и восточного энцефаломиелита лошадей.

Гемагглютинирующие свойства. Вирусы группы болезни Тешена—Талфана и другие энтеровирусы, этиологически связанные с полиэнцефаломиелитами свиней, не обладают гемагглютинирующей активностью. Гемагглютинирующие вирусы, выделенные от больных поросят в Онтарио, агглютинируют эритроциты цыплят и хомячков. Гемагглютинация может быть подавлена сыворотками реконвалесцентов. Вирусы эти обладают гемадсорбирующими свойствами и адсорбируют в культуре ткани эритроциты цыплят и хомячков.

Спектр патогенности. В естественных и экспериментальных условиях болеют только свиньи. К экспериментальному заражению наиболее восприимчивы поросята до 1—2-месячного возраста. Французские авторы (Верж и др., 1951) сообщают, что к экспериментальному заражению наиболее восприимчивы поросята весом 8—10 кг. Поросята 2-недельного возраста, лишенные молозива, переболевают тяжелее, чем поросята 3-недельного возраста (Дардири и сотр., 1966). В ряде случаев болезнь удается воспроизвести только у поросят-сосунов 3—5-дневного возраста, лишенных молозива. Экспериментальная инфекция легче удается при интрацеребральном или субдуральном введении вируссодержащего материала. В значительно меньшем проценте случаев оно оказывается успешным при интраназальном или оральном заражении. Иногда применяют комбинированное (интрацеребральное и интраназальное) заражение.

Лабораторные животные (кролики, морские свинки, белые мыши и крысы, мышата-сосунки и хомячки) к вирусу болезни Тешена и возбудителям других полиоэнцефаломиелитов свиней нечувствительны.

Культивирование вируса в лабораторных условиях. Вирус болезни Тешена, хорошо размножается в различных культурах тканей свиней (почки, легкие, сердце, семенники, яичники), полученных как от поросят 3—8-недельного возраста, так и от эмбрионов. Размножение вируса в культуре сопровождается цитопатическим действием. В культурах под агаровым покрытием вирус вызывает появление бляшек.

На куриных эмбрионах вирус болезни Тешена и возбудители тешеноподобных заболеваний не размножаются.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Обычно для диагностики болезни Тешена и сходных с ней инфекций используют комплекс различных лабораторных методов исследования, основными из которых являются: выделение и идентификация вируса; гистологическое исследование тканей цент-

ральной нервной системы (головной и спинной мозг) от животных, больных естественной формой заболевания или экспериментально зараженных; биопроба на поросятах.

В качестве дополнительных методов могут быть использованы РН в культуре ткани, РСК и РДП в агаровом геле.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материала. Чаще используют кусочки из различных отделов головного и спинного мозга (фрагменты коры головного мозга, мозжечок, продолговатый мозг, сегменты из шейной и поясничной частей спинного мозга). Вирус может быть выделен также из фекалий больных животных, однако в связи с возможностью длительного обитания вируса в кишечнике животных, переболевающих без проявления симптомов болезни и с широким распространением среди свиней популяции различных сиротских энтеровирусов, многие из которых могут вызывать у поросят энцефалиты при интрацеребральном заражении, выделение вируса болезни Тешена и возбудителей сходных заболеваний из фекалий или кишечника имеет меньшее диагностическое значение.

При взятии материалов для выделения вируса следует помнить, что в максимальных концентрациях он содержится в тканях центральной нервной системы в конце инкубационного периода и в самом начале (на протяжении 1—2 дней) паралитической стадии; в более поздние сроки содержание вируса в тканях центральной нервной системы становится крайне незначительным, а к моменту гибели животных можно наблюдать так называемую «аутостерилизацию» их. Учитывая эти особенности, для вирусологического исследования следует брать материал от животных, специально убитых в начале или на высоте проявления клинических признаков болезни (не позднее 3—5-го дня).

Вскрытие животных и извлечение головного и спинного мозга проводят общепринятыми в вирусологии методами. Взятые пробы помещают в раствор Хэнкса с антибиотиками или в стерильный забуференный 50%-ный глицерин pH 7,4—7,6.

Для гистологического исследования обычно также направляют кусочки из различных отделов головного и спинного мозга, которые отбирают сразу после взятия материала для вирусологического исследования. Они сразу должны быть погружены в 10%-ный забуференный формалин.

Кусочки тканей из различных отделов головного и спинного мозга от одного животного объединяют в одну пробу и готовят 10%-ную суспензию на растворе Хэнкса с антибиотиками. Суспензию мозговой ткани центрифугируют в течение 30 минут при 2500—3000 об/мин. Надосадочную жидкость после бактериологического контроля используют для заражения поросят или тканe-

вых культур. Суспензии других тканей можно центрифугировать при 1000—1500 об/мин в течение 10 минут.

Материалы для гистологического исследования после фиксации в 10%-ном забуференном формалине заливают в парафин или целоидин, делают из них срезы толщиной 6 мк и окрашивают гематоксилин-эозином.

Выделение вируса в культуре клеток. Для выделения вируса обычно используют первично-трипсинизированные монослойные культуры клеток почек поросят 3—8-недельного возраста или эмбрионов свиней, которые получают по обычной методике и выращивают на 0,5%-ном гидролизате лактальбумина на растворе Хэнкса с 10% сыворотки крови крупного рогатого скота. В качестве поддерживающей среды чаще используют 0,5%-ный гидролизат лактальбумина на растворе Эрла или эту же среду с 10% коровьей амниотической жидкости. Использовать для выделения вируса поддерживающую среду с сывороткой крови лошади нельзя, так как она непригодна для размножения вируса болезни Тешена в культуре клеток (Дардири).

В первых пассажах цитопатогенные изменения могут отсутствовать или появляться позже, причем бывают недостаточно выраженными. При отсутствии деструкции зараженной культуры на 7-й день ее однократно замораживают и оттаивают, после чего этим материалом заражают свежие монослойные культуры (по 0,2 мл). Материал каждого испытуемого образца пассируют не менее 3—5 раз.

При первичном выделении вируса из фекалий часто наблюдают быструю дегенерацию культуры, обусловленную токсическим действием материала. Для предотвращения этого явления рекомендуется после времени, необходимого для адсорбции вируса клетками, культуральную жидкость удалять, монослой двукратно промывать поддерживающей средой, а затем заливать свежей порцией среды и инкубировать, как обычно. Неспецифическое токсическое действие фекального материала можно исключить при дальнейшем пассировании, и появление цитопатических изменений во 2—3-й генерациях свидетельствует о специфическом проявлении вируса.

Цитопатические изменения, вызываемые в клетках культуры вирусом болезни Тешена и возбудителями тешеноподобных заболеваний, аналогичны и не отличаются от изменений, вызываемых другими энтеровирусами. Они характеризуются скоплением округлившихся клеток с повышенной светопреломляемостью (рефрактильностью), которые становятся заметными на 3—5-й день после заражения. При использовании адаптированных «культуральных» штаммов вируса первые признаки цитопатогенного действия появляются значительно раньше (иногда уже через 12—16 часов). Пораженные клетки отделяются от поверхности стекла; помимо очагов дегенерации, появляются участки («окна»), лишенные клеток. При исследовании окрашенных препаратов обнаруживают изменения, выражающиеся в зернистости и ацидофилии протоплазмы, конденсации хроматина и эксцентричном положении ядра.

Развитие цитопатических изменений в основном соответствует нарастанию титров вируса. При работе с адаптированными штаммами вновь образованный вирус появляется в культуре между 9 и 12 часами после инокуляции. Максимальные титры вируса ($10^{6,5}$—$10^{7,6}$—$10^{8,0}$ $ТЦД_{50}$/мл) обычно бывают при дегенерации монослоя на 75% (+++), что чаще всего отмечают в период между 18 и 24 часами после заражения. К моменту полного разрушения монослоя титр вируса начинает снижаться.

Культуральную жидкость, собранную с инфицированных культур при наличии цитопатогенного действия на +++, замораживают и используют для дальнейших пассажей, титрований и исследований по идентификации вируса (РН, биопроба на поросятах и т. п.).

Биопробу ставят только на поросятах старше 2-недельного, но моложе 2-месячного возраста весом 8—10 кг. К остальным вирусам, способным вызывать полиоэнцефаломиелиты, наиболее восприимчивы поросята не старше 1—2-недельного возраста. В некоторых случаях болезнь можно воспроизвести только при заражении поросят-сосунов 3—5-дневного возраста, лишенных молозива. Возможны различные методы заражения, но наилучшим будет введение материала в мозг или эпидурально в дозе 0,5—1,5 мл (в зависимости от возраста животных). В связи с широким распространением среди свиней латентного носительства энтеровирусов биопробу лучше проводить на поросятах, лишенных молозива, которые получены путем гистеректомии.

Во многих случаях даже после интрацеребрального заражения клинические признаки болезни могут развиваться не у всех животных. Поэтому исследуемый материал лучше вводить одновременно 2—3 поросятам, а после окончания опыта (независимо от его результатов) исследовать головной и спинной мозг от всех животных гистологически. Некоторые исследователи рекомендуют сочетать интраназальное и интрацеребральное заражение. При интраназальной инстилляции 0,5 мл материала вводят шприцем с тупой иглой в каждую ноздрю. Введение материала повторяют 2—3 дня подряд. При заражении per os болезнь удается воспроизводить значительно реже, чем при интрацеребральном и интраназальном заражении.

При наличии в исследуемом материале вируса болезни Тешена или возбудителей родственных заболеваний инкубационный период при интрацеребральном введении обычно продолжается 8—10 дней, при интраназальном — 12—14 дней. Для вирусов типа возбудителей североамериканских энцефаломиелитов поросят длительность инкубационного периода в большинстве случаев составляет около 72 часов и никогда не [illegible]ет 7 дней.

Клинические признаки и пат[illegible]гические изменения при экспериментальной инфекции анало[illegible]циям, наблюдаемым при естественном течении [illegible]аломиелит может быть подтвержден только

В организме иссл[illegible] вирус локализуется примерно там же, где и при[illegible]. Содержание вируса в центральной нервной системе к[illegible]тью гистологических изменений и длительностью инкубацио[illegible]и. В низких титрах вирус можно выделить из слюнных ж[illegible] селезенки, поджелудочной железы. Учитывая феномен «а[illegible]ации центральной нервной системы в поздней стадии развит[illegible]изнаков болезни, для выделения вируса животных необходимо[illegible]ые дни появления симптомов болезни. В ранней паралитическо[illegible]ли титры вируса в мозговой ткани могут достигать $10^{6,5}$ $ЛД_{50}$/г мо[illegible].

Гистологические исследования. [illegible] исследования берут ткань головного спинного мозга. Кусочки мозга фиксируют в 10%-ном нейтральном формалине, заключают в парафин, готовят срезы, окрашивают их гематоксилин-эозином и микроскопируют.

Полная гистологическая картина болезни Тешена представляет собой негнойный полиоэнцефаломиелит. В положительных случаях изменения обнаруживают в средней и каудальной частях головного мозга, включая продолговатый мозг, а также в шейной и поясничной частях спинного мозга.

В период острого течения болезни изменения во всех участках спинного мозга выражены в виде интенсивной деструкции нейронов (с нейронофагией и глиозом), причем поражены серое вещество мозга, вентральные и дорзальные рога. На поперечном срезе серого вещества заметны диффузные муфты, состоящие главным образом из лимфоцитов, но иногда также из плазматических клеток и гистиоцитов (рис. 1).

Поражения продолговатого мозга по своему характеру сходны с поражениями спинного мозга, но выражены значительно слабее; дегенерация нейронов

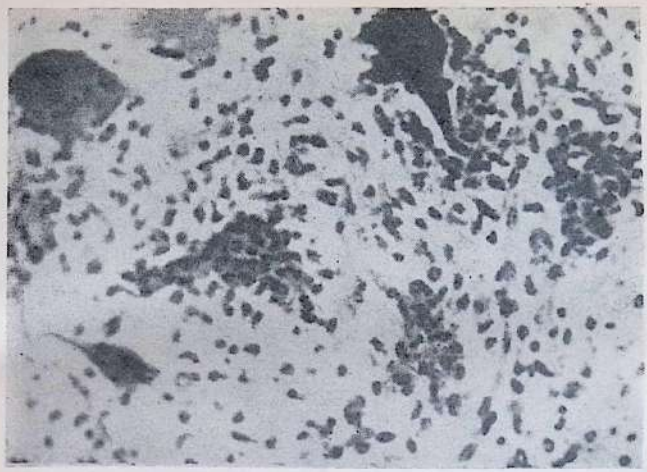


Рис. 1. Поясничный отдел спинного мозга поросенка. Поражение нейронов и различные стадии воспалительного процесса, начиная с гомогенизации (вверху слева) до обширной нейронофагии. Паралитическая стадия. (Окраска гематоксилин-эозином) ×180 (по Фишеру).

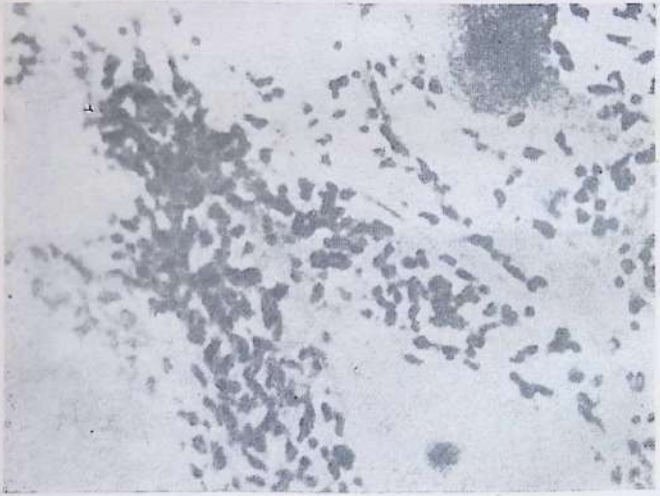


Рис. 2. Поясничный отдел спинного мозга поросенка. Резкий отек нервных клеток с обширной клеточной пролиферацией глии. Лизис субстанции Ниссля (тигроидного вещества). Рексис ядер с образованием «клеток-теней».

Рис. 3. Лейкоцитарно-глиозная нейронофагия поясничного отдела спинного мозга поросенка. Инфильтрация мозгового вещества полинуклеарами (реакция на оксидазу положительная) × 260 (по Фишеру).

Рис. 4. Поясничный отдел спинного мозга поросенка. Вакуолизация нейронов (середина) и пролиферация клеток глии с выраженной нейронофагией. Окраска гематоксилин-эозином) ×140 (по Фишеру).

менее выражена, преобладают периваскулярная инфильтрация и глиальные узелки (рис. 2).

В головном мозге обнаруживают церебральный менингит (рис. 3).

Обнаруживают также интенсивные изменения в зрительных буграх, ядрах основания, гиппокампусе, варолиевом мосту (рис. 4). Изредка отмечают тяжелые поражения мозжечка, причем обычно они развиваются относительно поздно и представлены выраженной деструкцией клеток Пуркинье.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Серологическая идентификация

Наиболее часто для идентификации вируса болезни Тешена и возбудителей сходных болезней используют РН в первичных культурах клеток почки поросят или эмбрионов свиньи. Для проведения идентификации вновь выделяемых вирусов диагностическая лаборатория должна располагать набором моноспецифических антисывороток к эталонным штаммам основных возбудителей энцефаломиелитов свиней (штаммы Bozen, Konratice или Reporyie вируса болезни Тешена, штаммы Talfan, Tyrol или Sweden UG вируса болезни Талфана, штамм Т-80 вируса Т-80, выделенного Беттсом в 1960 г. в Англии, а также штамм HEV гемагглютинирующего вируса, выделенного Григом с сотр. в Канаде в 1961 г.). Такие антисыворотки позволяют провести достаточно точную и своевременную идентификацию вирусов этой группы. Что касается использования эталонных штаммов этих вирусов, то работа с высокопатогенными штаммами вируса болезни Тешена (например, штамм Konratice и другие) может проводиться только в отдельных хорошо оборудованных учреждениях в условиях, обеспечивающих строгую изоляцию и не допускающих возможности распространения вируса. Это связано с тем обстоятельством, что на территории СССР болезнь Тешена не зарегистрирована. В условиях диагностических лабораторий работу можно проводить с аттенуированным культуральным мутантом Tübingen штамма Konratice вируса болезни Тешена, а также вирусом Т-80 (штамм Т-80 или Т-52А), которые не представляют опасности для распространения. Все штаммы вирусов, используемые для приготовления антигенов для РН, РСК или РДП, должны быть хорошо адаптированы к культуре свиных почечных клеток и обеспечивать получение вируса с высокой активностью ($10^{7,0}$—$10^{8,5}$ $ТЦД_{50}$/мл).

Реакцию нейтрализации чаще применяют для идентификации выделенных вирусных агентов путем использования моноспецифических гипериммунных эталонных сывороток. При наличии хорошо адаптированных к культуре клеток лабораторных штаммов возбудителей болезни Тешена—Талфана, вируса Т-80 и других вирусных агентов, связанных с энцефалитами у свиней, данную реакцию используют для обнаружения специфических вируснейтрализующих антител в сыворотках крови переболевших животных при ретроспективной диагностике, а также для проведения серологической разведки путем определения широты распростране-

ния антител к этим вирусам среди свиней в той или иной географической зоне с целью выяснения эпизоотологической ситуации. Учитывая возможность длительного латентного носительства указанных вирусов, важное значение имеет РН с парными сыворотками поросят, собранными в период острого течения болезни и в периоде реконвалесценции.

При использовании РН с целью определения титра вируснейтрализующих антител в качестве антигена применяют модельные лабораторные штаммы вирусов болезни Тешена—Талфана, Т-80, предварительно адаптированные к культуре клеток почки поросенка или эмбриона свиньи.

Расплодку вируса для реакции готовят в культуре клеток, заражая их большой дозой вируса и снимая после развития интенсивного цитопатогенного действия. Собранную культуральную жидкость центрифугируют при 2500—3000 об/мин в течение 15—30 минут для удаления клеточных фрагментов, после чего вирус титруют. Основную партию его расфасовывают, замораживают и хранят до использования при минус 30—70°. Непосредственно перед постановкой реакции вирус размораживают, разводят поддерживающей средой до концентрации 100—1000 $ТЦД_{50}$/0,1 мл и используют в реакции.

Моноспецифические иммунные сыворотки получают на гистеректомированных поросятах, содержащихся до 2-недельного возраста в условиях строгой изоляции и искусственного кормления. Для гипериммунизации их используют лабораторные штаммы, трижды клонированные методом бляшек.

Каждый вирус вводят 2—3 поросятам орально и интраназально. Для предотвращения перекрестного загрязнения (контаминации) животных, зараженных каждым из вирусов, нужно содержать в отдельных боксах. Через 2—3 недели после заражения поросят убивают и обескровливают. Полученные сыворотки замораживают и хранят при минус 20—50°. Их проверяют на специфичность и определяют титры антител. Приготовленные по этой методике антисыворотки к вирусам группы болезни Тешена—Талфана имеют титры антител 1 : 200—1 : 800, а к вирусу Т-80 — 1 : 800—1 : 1600.

Учитывая сложность получения моноспецифических антисывороток к вирусам этой группы на поросятах, лучше использовать для иммунизации ими гетерологичных хозяев (кроликов, морских свинок, цыплят).

Для получения высокоактивных сывороток к вирусу болезни Тешена на кроликах и морских свинках разработана специальная схема гипериммунизации с использованием в качестве адъюванта геля гидроокиси алюминия (Дардири с сотр., 1964). Используют взрослых кроликов весом около 2 кг и морских свинок весом 500—800 г. Культуральный вирусный материал, используемый для иммунизации, должен иметь титр не ниже 10^7 $ТЦД_{50}$/мл. Отдельных животных иммунизируют незараженной культуральной жидкостью. Культуральный вирус смешивают в равных объемах с 10%-ной суспензией гидроокиси алюминия pH 7,0, выдерживают в течение 1 часа при 37°, через каждые 15 минут тщательно встряхивают по 3 минуты. Полученную взвесь депонированного антигена до использования хранят при 4°.

В течение восьми недель указанный антиген в дозе 10 мл вводят кроликам внутримышечно с 7-дневным интервалом. Через 30 дней после последней инъекции животным вводят однократно еще 20 мл антигена и через 16 дней после этого их обескровливают для получения сыворотки.

Морских свинок иммунизируют по той же схеме, но доза материала на каждую инъекцию составляет 2 мл. Последняя доза, вводимая однократно после 30-дневного перерыва, составляет 10 мл.

Полученные по этой схеме кроличьи антисыворотки при постановке РН с 1000—1500 $ТЦД_{50}$/0,1 мл вируса могут иметь титры, достигающие 1 : 4096, а сыворотки морских свинок — 1 : 2048—1 : 4096.

Для получения антисывороток к свиным энтеровирусам типа возбудителей болезни Тешена—Талфана можно использовать петушков 5—7-месячного возраста (Дербишир и Джессет, 1968). Для этого расплодку вируса готовят на субкультуре свиных почечных клеток, соблюдая предосторожность для предотвращения перекрестной контаминации посторонними вирусами. После развития максимального цитопатического эффекта зараженную культуру замораживают и размораживают, культуральную жидкость центрифугируют в течение 10 минут при 1000 об/мин и надосадочную жидкость расфасовывают по 1 мл в ампулы, которые запаивают и хранят до использования при минус 65°. Петушкам-донорам делают 10 инъекций с интервалом в 3—4 дня, вводя каждый раз по 2 мл вирусного материала. Инъекции чередуют попеременно внутривенно и внутримышечно. Гипериммунных петушков обескровливают через неделю после последней инъекции. Сыворотки крови петушков, полученные перед началом иммунизации, будучи разведенными 1 : 10, как правило, реагируют с вирусом отрицательно. После полного цикла иммунизации титры антител к вирусу Тешена достигают 1 : 3000—1 : 3800, к вирусу Талфана — 1 : 6900—1 : 7100 (реакция с 30—300 дозами $ТЦД_{50}$/0,1 мл вируса).

Сыворотки крови от здоровых, больных и переболевших свиней сохраняют до использования при минус 20—30°. Перед постановкой реакции их размораживают, инактивируют прогреванием в водяной бане при 56° в течение 30 минут, после чего разводят поддерживающей средой.

Сыворотки крови от здоровых поросят из благополучных районов могут нейтрализовать вирус Тешена, будучи разведенными 1 : 8—1 : 16, в связи с чем их считают титрами нормальных антител.

Постановка реакции нейтрализации со специфическими антисыворотками. Данную реакцию обычно ставят для идентификации выделенных вирусных агентов, чаще всего определяя параллельно титры вируса без сыворотки и в присутствии постоянного разведения (например, 1 : 10—1 : 40) антисывороток. Обычно реакцию нейтрализации одновременно проводят с антисыворотками к основным возбудителям полиоэнцефаломиелитов свиней (вирус Тешена, Талфана, Т-80 и др.) с целью более быстрой идентификации выделенного агента.

Контроли реакции: титрование серийных разведений вируса в объеме 0,1 мл без сыворотки; титрование вируса в присутствии антисывороток от животных, иммунизированных неинфицированной культуральной жидкостью; параллельная постановка перекрестной реакции нейтрализации с использованием эталонных штаммов вируса — возбудителей полиоэнцефаломиелитов свиней.

Результаты реакции учитывают на 4—6-й день после заражения культур ткани по развитию цитопатических изменений. Индексы нейтрализации определяют по методу Кербера или Рида и Менча. Сопоставление индексов нейтрализации, полученных с разными антисыворотками, позволяет сразу же легко идентифицировать выделенный вирус. При исследовании сывороток крови свиней титры 1 : 20 и выше рассматривают как положительные. Вируснейтрализующие антитела в крови свиней, как правило, появляются на 5—7-й день после инфицирования, еще до начала развития параличей. В период четко выраженного клинического синдрома титры антител быстро нарастают и могут достигать 1 : 640—1 : 1280 и выше. У переболевших животных антитела могут сохраняться в течение 280 дней.

Серологический ответ на инаппарантную инфекцию может быть двояким: в одних случаях он аналогичен ответу, развивающемуся при клинически выраженном заболевании, а в других — титры вируснейтрализующих антител остаются невысокими (1 : 40—1 : 80—1 : 160). По времени обнаружение антител совпадает с появлением вируса в фекалиях, что является подтверждением вирусной инфекции среди обследуемой группы свиней. Однако у некоторых животных выявить вирус не удается, хотя антитела к нему можно обнаружить. У поросят после отъема титры антител обычно не превышают 1 : 16, однако при наличии в стаде инфекции вирусом Тешена они в дальнейшем повышаются до 1 : 64—1 : 128.

В связи с широким распространением среди свиной популяции вирусов, вызывающих полиоэнцефаломиелиты, наличием длительного носительства этих вирусов в кишечнике и бессимптомной инфекции само по себе обнаружение широкого распространения антител к этим вирусам не приносит большой пользы. Однако при такой ситуации особое диагностическое значение приобретает исследование парных сывороток от больных и переболевших животных, собранных с интервалом 3—4 недели. Сравнение нейтрализующей активности парных сывороток позволяет выявить быстрое и существенное (>четырехкратного) нарастания титров антител и подтвердить тем самым роль выделенных вирусов в этиологии вспышки заболевания.

Другие методы серологической идентификации вирусов этой группы (РСК, ДРП) пока еще не вышли за рамки лабораторных испытаний, хотя в принципе показана возможность использования РСК для идентификации вируса болезни Тешена при наличии хороших антигенов (Дербишир и Даусон, 1963). Витман (1958) показал возможность использования РДП в агаровом геле для выявления антител к этому вирусу в сыворотках крови переболевших животных. Ни одна из этих реакций не может быть использована для выявления антигена вируса Тешена непосредственно в тканях больных животных. Реакции бывают положительными только при наличии высокоактивного культурального антигена.

Реакция связывания комплемента может быть использована для идентификации вируса болезни Тешена и дифференциации его от возбудителей тешеноподобных заболеваний, однако она часто дает отрицательные результаты, что, по-видимому, обусловлено низкой чувствительностью антигена, а не отсутствием комплементсвязывающих антител. Учитывая особое значение качества антигена, ниже приводится описание методик приготовления антигена и антисывороток для постановки РСК, апробированных в исследованиях Дербишира и Даусона (1963).

Антиген. При постановке РСК в качестве антигена используют культуральный вирус, выращенный в монослойных культурах клеток почек свиньи или клеток почки эмбриона свиньи. Культуральную жидкость собирают во время максимального проявления цитопатогенного действия, замораживают при минус 20°, после чего размораживают, погружая на 10 минут в водяную баню при 37°, а затем центрифугируют 10 минут при 1500—2000 об/мин для удаления фрагментов клеток. Средний титр полученного [illegible] составляет не менее 10^7 ТЦД$_{50}$/мл. Для изучения комплементсвязы[illegible]йств вируса лучше использовать его после предварительного [illegible]тиленгликолем. Однако Дербишир и Даусон (196[illegible]ментсвязывающую активность неконцентрир[illegible]

Попытки выявить специфичес[illegible]ктивность с антигенами, приготовленными непосред[illegible] больных свиней, и сыворотками переболевших животных, [illegible]вались безрезультатными.

Антисыворотки для данной реакции [illegible]изацией кроликов и морских свинок.

Кроличьи антисыворотки. Кроликам ве[illegible]дят интраперитонеально по 1 мл культурального вируса, [illegible] концентрированного в 20 раз (центрифугирование в течение 90 [illegible]00 об/мин — центрифуга «Спинко Л», ротор № 21); полученный [illegible]спендируют буферным раствором (pH 7,2) в $^1/_{20}$ исходного объема, после чего расфасовывают по 1—1,2 мл в ампулы, которые запаивают и хранят до использования при минус 70°. Каждому животному делают по 8 инъекций материала с интервалом в 3 дня. Обескровливают кроликов через 10 дней после последней инъекции.

Антисыворотки морских свинок. Морским свинкам весом 500—600 г вводят интраперитонеально по 0,25 мл неконцентрированного культурального вируса.

Каждая последующая доза больше предыдущей на 0,25 мл. Максимальный объем вводимого при последней инокуляции материала 1,5 мл.

«Нормальные» сыворотки получают от кроликов или морских свинок до начала иммунизации; кроме того, используют сыворотки от животных, иммунизированных по аналогичной схеме незараженной культуральной жидкостью.

Сыворотки, полученные от каждой пары животных, смешивают и обрабатывают суспензией промытых свиных почечных клеток, диспергированных трипсином, для удаления из антисывороток специфических антител к клеточным фрагментам. Обработку проводят в водяной бане при 37° в течение 1 часа. Обработанную сыворотку осветляют путем 10-минутного центрифугирования при 1500—2000 об/мин. Указанную обработку сыворотки повторяют дважды, после чего их стерилизуют фильтрованием, расфасовывают, замораживают и хранят до использования при минус 20°. Перед постановкой РСК сыворотки размораживают и инактивируют прогреванием в водяной бане при 56° в течение 30 минут.

При постановке реакции обычно используют количественную РСК по методу Брадиша с сотрудниками (1964).

Реакция диффузионной преципитации в агаровом геле может быть использована для выявления преципитирующих антител в сыворотках крови от свиней, выздоровевших после переболевания.

Антиген. В качестве антигена для РДП используют эталонные штаммы вируса болезни Тешена, хорошо адаптированные к первичной культуре свиных почечных клеток. Для приготовления антигена культуру клеток со сформированным монослоем, выращенную в матрасах Ру, заражают неразведенным культуральным вирусом (0,1 мл на матрас). После адсорбции в течение 30—60 минут при 37° в каждый матрас заливают по 120—150 мл поддерживающей среды и инкубируют 48 часов при 37°. К этому времени обычно происходит полное разрушение монослоя (ЦПД ++++). Культуральную жидкость центрифугируют 15 минут при 3000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость выдерживают в течение 24 часов при 4° и титруют (обычно она имеет титр 10^8—$10^{8,5}$ $ТЦД_{50}$/мл). Дальнейшая обработка вируса заключается в его концентрировании в 50 раз и более путем ультрацентрифугирования или диализа.

Для лучшего осаждения вируса при центрифугировании к вируссодержащей жидкости непосредственно перед заполнением центрифуги добавляют 0,12% желатины. Для этого к 200 мл подогретого до комнатной температуры культурального вируса добавляют 2,4 мл расплавленной желатины (10%-ный раствор), после чего встряхивают и центрифугируют 2 часа при 40 000 об/мин в центрифуге «Спинко Л» (ротор № 40). Осадок ресуспендируют в $^1/_{99}$ М NaCl на вероналовом буфере (pH 7,3—7,4), доводя объем жидкости до $^1/_{10}$ исходного, после чего встряхивают в течение ночи при 4° на шуттель-аппарате, следя за тем, чтобы не было значительного образования пены. На следующий день к этому материалу добавляют желатину (0,24 мл) и снова центрифугируют 2 часа при 40 000 об/мин.

Полученный осадок ресуспендируют в таком количестве буфера, чтобы общий объем составлял $^1/_{50}$ исходного, а затем встряхивают в течение ночи при 4°, как и при первой обработке, после чего центрифугируют 30 минут при 3000 об/мин для удаления грубых частиц. К надосадочной жидкости добавляют пенициллин и стрептомицин из расчета 1000 ЕД/мл.

Антиген, очищенный и сконцентрированный путем кислотной преципитации и диализа, готовят по модифицированному Витманом методу Альбано. Культуральный вирус диализуют в течение 72 часов при 4° с 40-кратным объемом деминерализованной воды, подкисленной до pH 4,0 добавлением 0,1 н. HCl. Воду меняют каждые 24 часа. Диализат центрифугируют 60 минут при 3000 об/мин, осадок ресуспендируют в $^1/_{50}$ исходного объема забуференного раствора NaCl (pH 8) — 0,11 М NaCl и 0,01 М Na_2HPO_4 с антибиотиками. Для элюции вируса суспензию выдерживают в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем оставляют на 18—20 часов при 4° после чего центрифугируют еще раз в течение 1 часа при 3000 об/мин. Полученную надосадочную жидкость используют в качестве антигена.

Концентрированные антигены хранят до использования при 4°. Они термолабильны и разрушаются после 30-минутного прогревания при 56°. При 4° антигены сохраняют преципитирующую активность без изменения на протяжении 16 дней, но начинают утрачивать ее после 23 дней.

Способ приготовления и свойства антигена влияют на результаты реакции. Более четки они с антигеном, имеющим титр инфекционности 10^9 $ТЦД_{50}$/мл. При более низкой инфекционности антигена сыворотки с невысоким содержанием антител дают отрицательные результаты. Антигены, полученные путем диализа, менее активны, чем полученные при ультрацентрифугировании. Хорошие результаты с диализованными антигенами удается получать лишь при 100-кратном концентрировании вируса. Неконцентрированный вирус дает отрицательные результаты, даже если титр его 10^9 $ТЦД_{50}$/мл. Концентрированные антигены часто дают положительный результат даже при титрах вируса $10^{8,5}$ $ТЦД_{50}$/мл.

Сыворотки. Для исследования в РДП используют сыворотки крови от больных свиней с выраженной клинической картиной болезни, а также сыворотки реконвалесцентов. Все сыворотки хранят до использования при минус 20°. Для постановки реакции используют стерильные сыворотки без добавления антибиотиков. Непосредственно перед постановкой реакции сыворотки инактивируют прогреваниями в водяной бане при 60° в течение 30 минут.

Для постановки РДП используют высококачественные сорта агара, такие, как Rein Agar, Difco Noble Agar, которые применяют без предварительной очистки; применяемые в бактериологической практике тихоокеанский, одесский и другие виды агара перед использованием в РДП промывают и осветляют. 1,5%-ный агар на 1%-ном растворе NaCl (без добавления бактерицидных веществ) расплавляют в кипящей водяной бане, после чего, добавляя 1 Н NaOH, доводят pH до 7,0 и разливают в пробирки по 10 мл, затем стерилизуют и хранят до использования при 4°.

Перед использованием агар расплавляют и разливают по 3 мл в стерильные чашки Петри диаметром 4,5 см. После застывания агара в нем при помощи штампа делают пять лунок диаметром по 4 мм — одна лунка в центре и четыре вокруг, на расстоянии 8 мм от края центральной лунки.

В центральную лунку стерильной пипеткой вносят антиген, в боковые — предварительно инактивированные исследуемые сыворотки. Антиген и сыворотки добавляют трижды, с интервалом в 24 часа. Чашки оставляют при комнатной температуре (22—24°).

Реакцию учитывают на 5-й день после постановки.

Оценка реакции: ±сомнительная реакция, линия преципитации заметна слабо и не всегда воспроизводится при повторной постановке; +положительная реакция, линия преципитации выражена достаточно четко; ++резко положительная реакция, линия преципитации выражена очень четко.

При стерильной работе бактериального загрязнения воздушной микрофлорой обычно не бывает, однако иногда через несколько дней могут появляться колонии плесени.

В большинстве случаев сыворотки реагируют положительно в разведениях от 1:2 до 1:40 (++). Положительную реакцию они обычно дают между 3 и 5-м днем; слабоактивные сыворотки проявляют реакцию на 5-й день. При дальнейшем увеличении экспозиции интенсивность линий преципитации остается без изменения или возрастает незначительно.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

При дифференциальной диагностике следует исключить болезнь Ауески, бешенство, чуму свиней, отравления хлоридами и соланином.

Для дифференциации от болезни Ауески используют биопробу на кроликах, а также РН в культуре ткани и данные гистологического исследования. Бешенство может быть исключено или под-

тверждено на основании данных микроскопического исследования по выявлению телец Бобеша—Негри, результатов иммунофлуоресцентного теста, а также биопробы на кроликах или мышах. Чуму свиней дифференцируют от болезни Тешена и сходных болезней по данным РДП и иммунофлуоресценции. Отравления исключают по данным анамнеза и результатам токсикологических исследований.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагноз на прошедшую инфекцию, а также латентное вирусоносительство ставят при помощи РН в культуре клеток почечной ткани свиней с использованием лабораторных штаммов вирусов болезни Тешена, болезни Талфана, Т-80 и других путем определения титров антител в сыворотках крови реконвалесцентов.

При установлении латентного вирусоносительства и инаппарантной инфекции чаще всего используют сыворотки крови от взрослых свиней, забиваемых на мясокомбинатах, или собранные от животных непосредственно в хозяйствах. Обычно в таких случаях процент положительно реагирующих сывороток (титры антител 1 : 20—1 : 128 и выше) варьирует от 10—15 до 40—50%, а иногда и до 70% (Хак с сотр., 1962; Картрайт с сотр., 1963; Золетто и Берзани, 1964). Динамика появления вируснейтрализующих антител в сыворотках животных описана выше.

Строгого параллелизма между вируснейтрализующими и преципитирующими антителами в сыворотках крови от свиней с клинически выраженными параличами не отмечают. При пероральном заражении уже на 1—2-й день после появления параличей титры вируснейтрализующих антител могут достигать 1 : 64—1 : 128, но преципитирующих антител обычно еще не обнаруживают; они появляются лишь с 3-го дня. На 18-й день заболевания сыворотки бывают резко положительными в РДП, хотя титры вируснейтрализующих антител в это время все еще могут находиться на уровне 1 : 64. По-видимому, вируснейтрализующие и преципитирующие антитела образуются независимо друг от друга; преципитирующие антитела появляются позднее, а исчезают из крови раньше, чем вируснейтрализующие антитела. В связи с этим сыворотки, дающие положительный результат в РДП, постоянно положительны и в РН.

Серологический ответ на инаппарантную инфекцию может быть двояким: в одних случаях, как и при развитии клинически выраженного заболевания, появляются как нейтрализующие, так и преципитирующие антитела, а в других — низкие титры вируснейтрализующих антител при отсутствии преципитирующих.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

Для специфической профилактики болезни Тешена используют гидроокись-алюминиевую формолвакцину, приготовленную из головного и спинного мозга зараженных поросят (Трауб), и живую вакцину из культурального мутанта Тюбинген, представляющего собой штамм Konratice вируса болезни Тешена, утративший вирулентность для свиней в результате серийного пассирования в культуре клеток почки свиней, но сохранивший иммуногенность.

Формолвакцина защищает около 80% вакцинированных животных. Эффективность живой вакцины достигает 85—86%. Нейтрализующие антитела в титрах 1 : 32—1 : 128 на введение живой вакцины появляются на 4—5-й день. Титр их быстро нарастает, достигая максимума (1 : 256—1 : 512) через 4—6 недель после вакцинации. Ревакцинация через четыре недели после первой прививки приводит к повышению титров антител до 1 : 1024, причем при подкожном введении вакцины достаточно высокие титры антител сохраняются до 6 месяцев.

Преципитирующие антитела появляются через 1—2 недели после появления нейтрализующих антител.

Инактивированная вакцина, введенная свиноматкам, способствует появлению антител в молозиве; эти антитела могут передаваться поросятам при кормлении.

Количественной связи между иммунитетом и уровнем антител не установлено. Гуморальный иммунитет не идентичен тканевому. Высокие титры вируснейтрализующих антител могут предохранять против развития паралитических форм болезни при естественном заражении, предотвращая, возможно, размножение вируса в кишечнике. Животные с высоким уровнем нейтрализующих антител в крови после интрацеребрального заражения заболевают с появлением параличей, так как при этом способе инокуляции происходит непосредственно контакт вируса с чувствительными клетками. После интрацеребрального заражения у животных в крови обычно отмечают низкие титры вируснейтрализующих антител.

ИНФЕКЦИОННЫЙ ГАСТРОЭНТЕРИТ СВИНЕЙ
(INFECTIOUS GASTROENTERITIS OF SWINE)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Инфекционный (вирусный) гастроэнтерит свиней (трансмиссивный гастроэнтерит, инфекционный гастроэнтероколит, вирусный гастроэнтерит, вирусная диарея) — высококонтагиозное заболевание животных всех возрастных групп, характеризующееся диареей, десквамативным или десквамативно-некротическим воспалением слизистых оболочек пищеварительного тракта (в особенности тонкого отдела кишечника). Болезнь проявляется сильной рвотой, профузным поносом, выраженной дегидратацией тканей и заметным ухудшением общего состояния.

Инфекционный гастроэнтерит зарегистрирован в США, Канаде, Англии, Венгрии, ГДР, Италии, Польше, ФРГ, Японии и в ряде других стран. В Советском Союзе массовые вспышки болезни отмечают с 1954 г. Инфекция, по-видимому, довольно широко распространена среди свиней в странах с интенсивно развитым свиноводством, но не везде еще ее диагностируют.

Вирусная природа болезни впервые установлена Дойлом и Хатчингсом (1946). В результате исследования выделены нецитопатогенные и цитопатогенные штаммы вируса гастроэнтерита свиней (Ли, 1956; Пел и Бендорф, 1960; Ито с сотр., 1962; В. В. Никольский с сотр., 1963; Харада с сотр., 1963; Мак-Клуркин с сотр., 1965, и др.).

ВИРУС

Таксономическое положение вируса еще не определено, хотя, по данным электронной микроскопии, чувствительности к эфиру, предполагают, что он может быть отнесен к миксовирусам или герпесвирусам (Картрайт с сотр., 1965; Ристик с сотр., 1965; Шеффи, 1965; Оканива с сотр., 1966). Вирус, выделенный на Украине, сходен с представителями группы аденовирусов (В. В. Никольский с сотр., 1967). Ряд цитопатогенных изолятов вируса гастроэнтерита представляет собой смешанную вирусную популяцию, причем часть из них обладает свойствами как ДНК-содержащих, так и РНК-содержащих вирусов (Мак-Клуркин и Норман, 1966, 1967). Такая необычная ситуация может быть обусловлена присутствием в смеси по крайней мере двух различных вирусных агентов.

Работами некоторых исследователей (Шеффи, 1965; Кларк, 1968, и др.) показано, что вирус является РНК-содержащим. Норман, Марк-Клуркин и Бахрах (1968) подтвердили этот факт, но приводят данные, позволяющие предполагать наличие в цитопатогенных изолятах вируса гастроэнтерита свиней по крайней мере двух РНК-содержащих вирусных агентов, причем оба они связаны с этиологией гастроэнтерита. По мнению этих авторов, более тяжелое течение болезни и гибель поросят во время полевых вспышек гастроэнтерита может быть обусловлено совместным действием смеси вирусов.

Взаимоотношения между всеми выделенными вирусами пока не ясны, однако можно предполагать, что под названием возбудителя инфекционного гастроэнтерита свиней описываются несколько вирусных агентов (Кларк, 1968), а сама болезнь, возможно, представляет группу сходных заболеваний, вызывае-

мых различными вирусами или смесью вирусов. Имеющиеся данные свидетельствуют о существовании цитопатогенных и нецитопатогенных штаммов вируса или нескольких различных вирусов, этиологически связанных с гастроэнтеритом свиней, о возможности комплексной (смешанной) этиологии болезни или контаминации вируса гастроэнтерита другими вирусами.

Положение еще больше осложняется частым выделением из кишечника и фекалий здоровых и страдающих диареей животных различных цитопатогенных вирусных агентов (сиротские энтеровирусы, аденовирусы), обычно не связанных с какой-либо определенной патологией у свиней.

Однако среди большого изобилия разноречивых данных большинство исследователей считают, что возбудителем инфекционного гастроэнтерита свиней является сферический эпителиотропный РНК-содержащий вирус, таксономическое положение которого еще не определено. Частицы вируса окружены наружной оболочкой, по-видимому липопротеиновой природы. Диаметр частиц от 60 до 200 ммк. Вирус фильтруется через фильтры Шамберлана L_1, L_3, L_5 и Зейтца Е. К. Центрифугирование в течение 1 часа при 15 000—18 000 об/мин приводит к значительному снижению титров вируса в надосадочной жидкости. Вирус можно осадить и сконцентрировать центрифугированием в течение 1 часа при 34 000 об/мин (центрифугирование лучше проводить в рефрижераторной центрифуге при 4°).

Устойчивость. Вирус фоточувствителен (Хельтерман, 1963; Картрайт, 1965; Велтер, 1966). Он чувствителен также к эфиру и хлороформу; отдельные штаммы при обработке эфиром и хлороформом инактивируются лишь частично (Мак Клуркин и Норман, 1966). Английские цитопатогенные штаммы вируса чувствительны к дезоксихолату натрия и додецилсульфату натрия, но нечувствительны к кристаллическому трипсину и устойчивы в кислой среде (pH 3,0) (Картрайт с сотр., 1965). Американские и японские штаммы кислотолабильны: при pH 3,0 в течение [illegible] при комнатной температуре инактивируется до 94% вируса, но [illegible] стабилен (Мак Клуркин и Норман, 1966). При [illegible] тивирует вирус за 20 минут. Прогревание [illegible] ус в течение 30 минут. При 37° в течение 4 [illegible] жается более чем на 90%, за 8 часов — на 99,9%. [illegible] ратуре в темноте инфекционность вируса не изменяется на [illegible] ей, тогда как на свету за один день она снижается на 99%.

При температ[illegible] вирус стабилен. Он нечувствителен к пенициллину, стрепто[illegible] ну и нистатину.

Хранение [illegible] вание вируссодержащих материалов. Вирус [illegible] териалы сохраняются в активном состоянии в течение нескольких [illegible] пературах минус 20—70°. При минус 28° вирус остается активным [illegible] лет. При 4° вирус может храниться в течение одного месяца.

В связи с фоточувствительностью вируса все вируссодержащие материалы следует защищать от действия света.

С целью длительного сохранения патологический материал (фрагменты кишечника) можно замораживать до минус 30—70° и использовать по мере надобности в течение 2—3½ лет.

Локализация в организме. Вирус локализуется главным образом в клетках слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, в особенности в двенадцатиперстной и тощей кишках. В наиболее высоких концентрациях (10^6—10^7 ID_{50}/г ткани) вирус содержится в тканях кишечника 1—3 дня после начала заболевания. Примерно в такой же концентрации его часто обнаруживают в почках, но виремию наблюдают в течение короткого промежутка времени лишь в период острого течения болезни. В фекалиях переболевших животных вирус удается обнаруживать на протяжении 8—10 недель.

Антигенные свойства и вариабельность. Вирус инфекционного гастроэнтерита свиней обладает выраженной антигенной активностью. Вируснейтрализующие антитела обнаруживают в крови переболевших животных. При помощи перекрестной нейтрализации in vitro и опытов перекрестного заражения показано антигенное родство (возможно, идентичность) штаммов

вируса гастроэнтерита свиней, выделенных в США, Англии и Японии, как обладающих цитопатогенной активностью, так и нецитопатогенных. Вопросы об антигенных и иммунологических связях и различиях между ними подлежат дальнейшему изучению.

Спектр патогенности. К экспериментальному заражению наиболее восприимчивы поросята-сосуны в возрасте от 1 до 5 дней, хотя во многих случаях болезнь удается воспроизвести и у взрослых животных. Заражение легко удается только при введении материала per os. Поросят 1—5-дневного возраста можно заразить интраназально; очевидно, что интраназальной инстилляции материала около 90% его попадает в желудочно-кишечный тракт. При парентеральных методах, заражения воспроизвести болезнь обычно не удается или требуются для этого в 1000 раз бо́льшие концентрации вируса, чем при оральном заражении.

Морские свинки, белые мыши и мышата-сосунки 1—5-дневного возраста, кролики, хомячки к вирусу гастроэнтерита свиней нечувствительны.

Культивирование вируса в лабораторных условиях проводится на первичных культурах клеток почки поросят, причем многие штаммы вируса размножаются без проявления цитопатических изменений. В последние годы в различных странах выделен ряд цитопатогенных штаммов вируса, вызывающих гастроэнтерит у поросят при экспериментальном заражении. Такие штаммы вируса ценны для проведения серологических исследований. Витт и Истердай (1967) сообщают о возможности культивирования цитопатогенного штамма вируса гастроэнтерита свиней в культурах клеток почки взрослых свиней и свиных эмбрионов, а также клеток щитовидной железы поросят.

Учитывая существование нецитопатогенных штаммов вируса гастроэнтерита свиней, а также возможность выделения от больных животных различных цитопатогенных вирусных агентов, не имеющих отношения к гастроэнтериту, все материалы следует предварительно и на разных этапах культивирования проверять на наличие вируса гастроэнтерита биопробой на поросятах.

Вирус гастроэнтерита свиней не размножается на куриных эмбрионах, однако недавно японские исследователи (Ичихара с сотр., 1964) сообщили о возможности культивирования вируса гастроэнтерита (штамм Ukiha) на куриных эмбрионах при инокуляции в амниотическую полость, при этом вирус 10 и 20-го пассажа сохранил патогенность для поросят.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Клинических симптомов и патологоанатомических изменений недостаточно для диагностики болезни. Внезапное появление инфекционного заболевания, сопровождающегося сильной рвотой и профузным поносом, высокой смертностью среди поросят-сосунов моложе 10—14 дней при отрицательных результатах бактериологических исследований, позволяет заподозрить появление вирусного гастроэнтерита.

Основными методами лабораторной диагностики его служат: биопроба на поросятах-сосунах моложе 10-дневного возраста; выделение и идентификация вируса; индикация вируса в клетках тканей желудочно-кишечного тракта поросят при помощи иммунофлуоресценции; гистологическое исследование тканей желудочно-кишечного тракта, особенно тонкого отдела кишечника естественно больных и экспериментально зараженных животных.

При наличии цитопатогенных штаммов вируса гастроэнтерита удобным и достаточно точным методом лабораторной диагностики является выявление нарастания титра вируснейтрализующих ан-

тител при исследовании парных сывороток от переболевших животных.

В качестве дополнительных методов индикации и идентификации вируса могут быть использованы реакция кольцепреципитации, а также реакции агглютинации частиц бентонита, сенсибилизированных вирусом гастроэнтерита, сыворотками переболевших животных. В последнее время для этого все шире используют реакцию иммунофлуоресценции.

Окончательный диагноз может быть поставлен только на основании результатов биопробы на восприимчивых поросятах, зараженных per os.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материала. Для выделения вируса инфекционного гастроэнтерита свиней чаще всего используют кусочки различных отделов кишечника, особенно двенадцатиперстной и тощей кишок, полученные при вскрытии павших поросят или животных, забитых с диагностической целью на высоте проявления клинических признаков болезни. Вирус может быть также выделен из почек и печени. При жизни животных в качестве материала для исследования используют фекалии, пробы которых берут непосредственно из прямой кишки во время дефекации или ватным тампоном. В наибольших количествах вирус содержится в патологических материалах в первые 2—3 дня после начала болезни, однако в отдельных случаях при исследовании фекалий его удавалось обнаруживать в течение 8—10 недель.

Вскрытие производят в возможно короткие сроки после гибели животных. Жидкость из просвета тонкого отдела кишечника отбирают через его стенку шприцем с толстой иглой. Фрагменты различных отделов кишечника, кусочки почечной ткани из паренхиматозных органов помещают в отдельные стерильные банки или флаконы из темного стекла. Для предотвращения развития кишечной микрофлоры лучше помещать материал в банки или флаконы, содержащие раствор Хенкса или среду для тканевых культур (pH 7,2—7,4) с антибиотиками (пенициллин, стрептомицин по 1000 ЕД/мл). Ватные тампоны погружают в пробирки, содержащие по 2—3 мл раствора Хенкса или среды для тканевых культур с антибиотиками. Материалы хранят до отправки и транспортируют в лабораторию на холоде в условиях, обеспечивающих отсутствие прямого воздействия света.

Поступивший в лабораторию материал для исследования хранят до обработки при 4° или замораживают при минус 10—30°. Все манипуляции по обработке материалов проводят в условиях, исключающих длительное воздействие интенсивного света.

Пробы жидкого содержимого тонкого отдела кишечника и пробы жидких фекалий разводят 1 : 5 охлажденным до 4° раствором

Хенкса или средой для тканевых культур, интенсивно встряхивают в течение 3—5 минут, после чего их центрифугируют.

Фрагменты двенадцатиперстной и тощей кишок вскрывают и промывают 2—3 раза охлажденным раствором Хенкса, после чего гомогенизируют с охлажденным раствором Хенкса (1 : 9). Полученную суспензию центрифугируют 30 минут при 2500—3000 об/мин в рефрижераторной центрифуге при 4°.

Надосадочную жидкость собирают во флаконы из темного стекла, после чего добавляют антибиотики (1000 ЕД/мл пенициллина, 1000 ЕД/мл стрептомицина, 50 ЕД/мл нистатина). Если необходимо, pH доводят до 7,2—7,4 5%-ным раствором $NaHCO_3$ и выдерживают 2—3 часа при комнатной температуре.

Материалы замораживают и хранят при минус 20—60° до завершения проверки их на стерильность, после чего их можно использовать для заражения поросят или культур клеток.

Во многих руководствах для получения свободных от микробного загрязнения материалов рекомендуют фильтровать суспензии через различные бактериальные фильтры, однако использование для этого таких фильтров, как свечи Шамберлана и Беркефельда, пластинки Зейтца марки СФ, обычно приводит к столь сильному снижению инфекционности получаемых фильтратов, что заставляет предпочесть использование описанной выше методики.

Биопроба. В связи с наличием большого количества штаммов вируса инфекционного гастроэнтерита свиней, не обладающих цитопатогенным действием, биопроба на восприимчивых поросятах является основным методом выделения вируса. Ее обычно ставят на восприимчивых поросятах 3—5-дневного возраста, полученных из хозяйств, благополучных по этой болезни.

Поросят отнимают от свиноматок за 24—48 часов до заражения. Кормят их искусственным молоком, для приготовления которого берут (О. В. Теплов, 1958): 1 л свежего коровьего молока; 0,25 л остуженной кипяченой воды; одно свежее куриное яйцо; 15 г сахара; 5 мл рыбьего жира; 10 мл 1%-ного раствора сернокислого железа; 0,1 г солянокислого биомицина.

Поросятам до 10-дневного возраста скармливают в день по 0,5 л смеси. Можно использовать и пастеризованное коровье молоко.

Исследуемый материал, проверенный на отсутствие бактериального загрязнения, в количестве 1—2 мл вводят per os или закапывают в носовые ходы 2—3 поросятам. Контрольным животным аналогичным образом вводят по 1—2 мл раствора Хенкса или среды для тканевых культур, содержащей антибиотики в такой же концентрации, как и в исследуемом материале. За поросятами наблюдают 72—96 часов, осматривая и измеряя температуру 2 раза в день. Вследствие высокой контагиозности вируса гастроэнтерита за животными контрольной и подопытной групп должен быть раздельный уход. Появление рвоты и диареи в течение 24—72 часов после инокуляции доказывает, что в исследуемом материале есть вирус гастроэнтерита. Симптомы болезни у поросят после экспериментального заражения соответствуют описанию клинических проявлений при естественном течении болезни. На 3—5-й день после начала поноса животные погибают.

Если признаки болезни в течение четырех дней отсутствуют, поросят повторно инфицируют материалом, заведомо содержащим вирус ИГЭС, чтобы проверить на отсутствие резистентности к вирусу гастроэнтерита.

При вскрытии павших животных обнаруживают явления катарального энтерита, а при гистологическом исследовании — атрофию кишечных ворсинок, особенно резко выраженную в тощей кишке.

У зараженных животных вирус сравнительно легко удается выделить из фекалий, однако в наивысших концентрациях он содержится в слизистых оболочках тонкого отдела кишечника, особенно двенадцатиперстной и тощей кишок. Уже через 24—72 часа после клинического проявления болезни титры вируса в этих тканях достигают 10^6—10^7 ID_{50}/г). Поэтому, если необходимо выделить вирус, поросят убивают через 24 часа после появления диареи и полученные от них материалы (содержимое и соскобы слизистой тонкого отдела кишечника) подвергают вирусологическому исследованию.

В крови и почках поросят вирус удается обнаружить через 24—48 часов после заражения, но титры его обычно низкие (10^1—10^2 ID_{50}/г), лишь изредка концентрация вируса в почечной ткани может достигать 10^5—10^6 ID_{50}/г.

У новорожденных поросят, зараженных интраназально, через 2 часа после заражения вирус может быть обнаружен в ткани легких (титры до 10^4 ID_{50}/г), а у поросят, зараженных интраназально в 6-дневном возрасте, вирус может быть обнаружен в слизистой оболочке носа (титры до 10^4 ID_{50}/г).

Для подтверждения диагноза важно также исследование в реакции нейтрализации парных сывороток, первую из них берут на 3—5-й день после начала болезни, а вторую (от выживших животных) — через 1—2 недели.

Выделение вируса в культуре клеток. Для выделения вируса используют первично-трипсинизированные культуры клеток почки поросенка или свиного эмбриона, которые получают по общепринятой методике. В качестве поддерживающей среды используют 0,5%-ный гидролизат лактальбумина на растворе Эрла или Хенкса, к которому добавляют 2—5% лошадиной или телячьей сыворотки или сыворотки ягненка; можно использовать среду без сыворотки. Культуру лучше заражать до завершения формирования сплошного монослоя.

После 3—4 дней культивирования среду меняют. Культуральную жидкость из пробирок, зараженных одним материалом, собирают вместе и замораживают, а культуры со сменennой средой инкубируют еще 3—4 дня, после чего также замораживают. Для пассажей используют смесь культуральной жидкости, собранной при смене среды и в конце инкубирования. Каждый образец пассируют 5—7 раз.

Отсутствие цитопатических изменений при пассировании вируса еще не свидетельствует об отсутствии в материале вируса гастроэнтерита свиней. Прежде чем считать опыт отрицательным, культуральную жидкость 2—5-го пассажа проверяют на наличие вируса биопробой на восприимчивых поросятах-сосунах 2—5-дневного возраста.

При наличии в исследуемом материале цитопатогенных штаммов вируса гастроэнтерита цитопатические изменения обычно появляются с 3—4-го пассажей. В первом пассаже они либо отсутствуют, либо бывают минимальными и отмечаются на 4—7-й день. При дальнейшем пассировании цитопатические изменения появляются раньше — через 48—72 часа. Первыми признаками служит образование гроздьевидных скоплений крупных округлых клеток, как бы лежащих на поверхности клеточного пласта, который кажется интактным. При встряхивании округлые клетки отслаиваются, и остающийся клеточный слой выглядит вполне нормальным. По мере развития цитопатических изменений количество крупных округлых клеток увеличивается, в монослое появляются небольшие «окошки», свободные от клеток, окаймленные мелкими темными округлыми клетками. Размер «окошек» постепенно увеличивается, однако дегенерация редко бывает полной, хотя иногда появляется лизис клеток.

По Картрайт с сотр. (1965), цитопатические изменения обычно начинаются с изменения рефрактильности клеток, часть которых становятся набухшими, округляются. На этой стадии цитопатические изменения определяются легко, позднее они становятся менее специфичными, клетки утрачивают рефрактильность, становятся зернистыми и отделяются от стекла. Большие дозы вируса разрушают весь монослой, но при малых дозах цитопатические изменения преходящи, и после отслоения пораженных клеток остающийся монослой кажется вполне нормальным.

По Харада с сотр. (1963), цитопатические изменения выражаются в грануляции клеток, их сморщивании, а также в появлении небольшого количества округлых клеток на поверхности клеточного монослоя. Клетки отстают от по-

верхности стекла и друг от друга, образуя сеть из частично дегенерировавших клеток. При дальнейших пассажах изменения развиваются значительно быстрее и становятся более деструктивными. Округлые клетки появляются через 24 часа после инокуляции и образуют агрегаты, которые подвергаются дезинтеграции и отстают от поверхности стекла. В окрашенных препаратах выявляют вакуолизацию и грануляцию цитоплазмы.

Используя для выделения вируса гастроэнтерита культуры перевиваемых клеток (НЕР-2, С-18, «Детройт-6»), мы наблюдали, что первые признаки цитопатических изменений, появляющиеся при первичном выделении на 3—4-й день после инокуляции, выражались в усилении рефрактильности клеток, которые затем разбухали, округлялись, а позднее отделялись от поверхности стекла, образуя очаги, свободные от клеток. Во 2—5-м пассажах, как правило, отмечалось некоторое ослабление интенсивности цитопатогенного действия, но в дальнейших пассажах оно опять становится более выраженным.

В окрашенных препаратах обнаруживают маргинацию ядерного хроматина и конденсацию нуклеоплазмы; в некоторых случаях они создают видимость наличия телец-включений.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Серологическая идентификация

Для идентификации вируса инфекционного гастроэнтерита свиней обычно используют РН, которую для цитопатогенных штаммов вируса ставят в культуре ткани или проводят на восприимчивых поросятах-сосунах, а также реакцию иммунофлуоресценции.

Реакцию нейтрализации обычно используют как для идентификации выделенного вируса, так и для обнаружения специфических вируснейтрализующих антител в сыворотках крови переболевших животных при ретроспективной диагностике. Важное значение имеет постановка РН с парными сыворотками от поросят, полученными в период острого течения болезни и в период реконвалесценции. В связи с тем, что имеются штаммы вируса гастроэнтерита свиней, не обладающие цитопатогенной активностью, РН часто ставят на восприимчивых поросятах-сосунах 1-дневного возраста. В остальных случаях ее ставят в культуре клеток почки поросенка или эмбриона свиньи, используя в качестве антигена цитопатогенные штаммы вируса.

Для нейтрализации вируса в опытах in vivo используют постоянную дозу вируса (10^2 ID_{50}, или 10^5 $ТЦД_{50}$), и неразведенную антисыворотку или антисыворотку в разведении 1 : 5—1 : 20. Опыты нейтрализации in vitro обычно ставят, используя постоянную дозу вируса — переменные дозы сыворотки.

Компоненты реакции. *Антиген.* В качестве антигена для постановки реакции in vivo можно использовать как культуральный вирус, так и вирус, поддерживаемый пассажами на поросятах (не содержащая бактерий жидкость, полученная при центрифугировании 10%-ной суспензии тонкого отдела кишечника от больных животных), а при постановке реакции в культуре клеток — только цитопатогенные штаммы культурального вируса, хорошо адаптированные к этой системе. До постановки реакции вирус

предварительно титруют. В зависимости от титра вирусного материала его разводят до содержания 10^2 ID_{50}/мл, или 10^5 $ТЦД_{50}$/мл, для постановки опытов на поросятах; 10^3 $ТЦД_{50}$/0,1 мл, или 10^3 БОЕ/0,1 мл, для постановки опыта в культуре клеток по цитопатогенному действию или методом бляшек.

Антисыворотку готовят гипериммунизацией поросят, полученных из хозяйства, благополучного по инфекционному гастроэнтериту. Лучше брать животных, доставленных в лабораторию сразу после рождения, вскармливаемых искусственно и содержащихся в условиях строгой изоляции.

Для иммунизации обычно используют поросят старше 3—4-недельного возраста, так как более молодые животные являются плохими продуцентами антител. Перед началом иммунизации от них берут кровь и полученные сыворотки проверяют на отсутствие вируснейтрализующих антител.

Для получения антисыворотки применяют следующие схемы иммунизации. По первой из них поросят 3—5-дневного возраста, полученных из благополучного хозяйства, содержат изолированно до 19-дневного возраста, после чего им скармливают по 5 мл суспензии, содержащей лабораторный штамм вируса гастроэнтерита, поддерживаемого пассажами на поросятах. Материал представляет свободную от бактерий жидкость, полученную после центрифугирования 10%-ной суспензии тонкого кишечника больных поросят; титр 10^6—10^7 ID_{50}/мл. Обычно уже через 24 часа у животных развиваются симптомы гастроэнтерита, но в течение двух недель поросята выздоравливают. Через 19 дней после заражения животным подкожно вводят 100 мл концентрированного препарата вируса, который получают центрифугированием при 34 000 об/мин в течение 5 часов. Через 19 дней инокуляцию повторяют, а через пять дней после последней инокуляции поросят обескровливают.

По второй схеме поросят 4-месячного возраста, проверенных на отсутствие антител к вирусу, заражают per os, вводя 10^6 ID_{50} вируса. После переболевания, через 14 и 28 дней после заражения, животным вводят внутримышечно по 3×10^6 оральных ID_{50} вируса. Обескровливание проводят через 21 день после последней инокуляции.

По третьей схеме поросятам 4—5-недельного возраста вводят 7 раз с 5-дневным интервалом по 10^7 ID_{50}, или 10^5 $ТЦД_{50}$, вируса (дозу делят на 3 части и вводят одновременно внутримышечно, per os и внутривенно). Сыворотку получают через пять дней после последней инокуляции. Для получения контрольной сыворотки 1—2 животным вводят по этой же схеме по 2 мл культуральной жидкости, собранной с не инфицированной вирусом культуры.

И, наконец, последний вариант иммунизации состоит в том, что поросятам 3-недельного возраста скармливают 1—2 мл неразведенного культурального вируса. После легкого переболевания (обычно через 9—10 дней после заражения) животным вводят по 20 мл неразведенного культурального вируса подкожно, а еще че-

рез 3—4 недели — по 20 мл того же вируса внутривенно. Кровь для получения сыворотки берут через 10 дней после последней инокуляции.

Полученные сыворотки проверяют на присутствие антител, расфасовывают, замораживают и хранят до использования при минус 20°.

Такая сыворотка обычно содержит достаточно антител, чтобы в разведении 1 : 32 нейтрализовать 1000 интраназальных ID вируса для 5-дневных поросят. Перед постановкой реакции сыворотки размораживают и инактивируют прогреванием в течение 30 минут при 56°.

Реакцию нейтрализации in vivo со специфической антисывороткой ставят обычно лишь для идентификации вируса. Для постановки реакции используют поросят 1—5-дневного возраста; 2 мл разведенного вируса, содержащего 10^2 ID_{50}/мл или 10^5 ID_{50}/мл, смешивают с равным объемом неразведенной гипериммунной сыворотки, встряхивают и выдерживают 30—60 минут при 37°, после чего скармливают по 2 мл этой смеси двум поросятам. За животными наблюдают на протяжении четырех дней, осматривая и измеряя температуру 2—3 раза в день. Отсутствие клинических признаков болезни свидетельствует о нейтрализации вируса. Для проверки восприимчивости (исключения резистентности) животных на 5-й день после скармливания смеси им вводят per os по 1 мл неразведенного вируса. Появление болезни в течение 1—3 дней после введения вируса указывает на отсутствие естественной резистентности и подтверждает специфическую природу нейтрализации вируса.

В связи с тем, что естественный пассивный иммунитет при инфекционном гастроэнтерите обусловлен нейтрализацией вируса в просвете пищеварительного тракта, а комплекс антиген-антитело может диссоциировать при прохождении материала через желудок поросят из-за сильной кислотности его содержимого (pH 2,0—3,0), опыты нейтрализации in vivo можно проводить по несколько иной методике.

Поросятам 1-дневного возраста скармливают по 5 мл неразведенной гипериммунной сыворотки, предварительно прогретой 30 минут при 56°; через 8 часов им вводят per os 5 мл смеси, содержащей 10^2 ID_{50} или 10^5 $ТЦД_{50}$ вируса с неразведенной антисывороткой (смесь предварительно выдерживают в течение ночи при 5°). Через 8—16 часов после введения смеси вируса с антисывороткой животным опять скармливают по 5 мл неразведенной гипериммунной сыворотки.

При постановке реакции нейтрализации на поросятах с использованием гипериммунной сыворотки, полученной при иммунизации культуральным вирусом, могут наблюдаться случаи, когда такая сыворотка не предохраняет поросят от заболевания. Это явление может быть обусловлено присутствием в вирусном материале других вирусных агентов, этиологически связанных с заболеванием,

антитела к которым в антисыворотке на культуральный вирус отсутствуют.

Реакция нейтрализации вируса в культуре клеток может быть поставлена лишь при наличии цитопатогенных штаммов вируса, адаптированных к определенной культуре клеток (клетки свиной почки, клетки щитовидной железы взрослых свиней и т. п.). Реакцию ставят общепринятым методом, с постоянной дозой вируса (100 $ТЦД_{50}$) и двукратными разведениями сыворотки (от 1 : 20 до 1 : 640). Сыворотку предварительно инактивируют 30 минут при 56°. Смесь ее с вирусом перед заражением культуры выдерживают в течение часа при 37°. Результаты учитывают по ЦПД на пятые сутки.

Титры антител в сыворотках, полученных от свиней в период острого течения болезни, не превышают 1 : 8 (обычно 1 : 2). В сыворотках реконвалесцентов, полученных на 21-й день после начала заболевания, титры антител варьируют в широких пределах (от 1 : 8—1 : 32 до 1 : 640 и выше). Титры антител в гипериммунной сыворотке могут достигать 1 : 640—1 : 1280 (Витт и Истердей, 1967).

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ

Иммунофлуоресценцию (прямой метод флуоресцирующих антител) используют для быстрой индикации и идентификации антигена вируса инфекционного гастроэнтерита в клетках культур ткани, инфицированных вирусным материалом, а также в гистологических срезах, приготовленных из патологических материалов (фрагменты тонкого отдела кишечника) от животных, естественно заболевших или заболевших после экспериментального заражения.

Приготовление меченых флуоресцирующих антител. Для выделения глобулиновой фракции используют гипериммунную сыворотку крови свиней с титром антител не ниже 1 : 320—1 : 640. Глобулиновую фракцию осаждают добавлением $^1/_3$ объема насыщенного раствора сульфата аммония. Осажденный гаммаглобулин отделяют и растворяют в 0,85%-ном растворе NaCl. Процедуру переосаждения повторяют трижды. Последний раствор для полного освобождения от ионов сульфата подвергают диализу против 0,85%-ного раствора NaCl в течение ночи. Концентрацию белка определяют фотометрически при длине волны 540 ммк.

Раствор гамма-глобулина разводят 0,01 М фосфатным буфером (pH 7,4—7,6) до содержания 1% белка. Приготовленный раствор подщелачивают до pH 9,0—0,5 М $Na_2CO_3/NaHCO_3$ буфера.

Изоционат флуоресцеина добавляют в соотношении 1 мг изоционата на 40 мг белка, помещают на поверхность раствора гамма-глобулина и оставляют на 10 минут. Затем смесь перемешивают на магнитной мешалке в течение 6—10 часов при 4°. Конъюгированную сыворотку диализируют в целлофановых мешках против холодного физиологического раствора до отсутствия флуоресценции в диализирующей жидкости, а затем пропускают через колонку с сефадексом G-50. Перед использованием конъюгированную сыворотку обрабатывают высушенным порошком из печени, селезенки, почек и мезентериальных лимфоузлов здоровых поросят.

Подготовка и окрашивание образцов. Препараты культур клеток на покровных стеклах. Культуру клеток почки свиньи, выращенную на покровных стеклышках, заражают исследуемым вирусом в разведении 1 : 100; через различные промежутки времени (обычно через 24—36—48 часов) стеклышки извлекают из пробирок, прополаскивают в фосфатном буферном раство-

ре (pH 7,2), после чего тщательно высушивают на воздухе при комнатной температуре, а затем фиксируют в течение 1 часа ацетоном при минус 20°. После фиксации их вынимают из ацетона и высушивают. Для окрашивания на высушенные стеклышки наносят конъюгированную сыворотку и выдерживают препараты во влажной камере в течение 30 минут при 37°. Затем стеклышки тщательно промывают охлажденным 0,01 М фосфатным буфером (pH 7,2) и помещают на 20 минут в свежую порцию буферного раствора, а затем промывают холодной дистиллированной водой.

После высушивания стеклышки погружают в забуференный глицерин (1 г глицерина на 1 г фосфатного буферного раствора с двойной концентрацией солей, pH 7,2) и исследуют под флуоресцентным микроскопом, используя конденсор темного поля и ртутную лампу высокого давления.

В препаратах, приготовленных через 24 часа после инокуляции, флуоресценцию обнаруживают только в цитоплазме в виде мелких частиц или тонких цепочек, обычно ориентированных в одном направлении. В некоторых клетках обнаруживают фокусы флуоресценции, окружающие ядра. Через 48 часов клетки имеют интенсивные диффузные флуоресцирующие массы в цитоплазме и незначительное количество флуоресцирующих гранул в ядре, однако заметного увеличения количества флуоресцирующих клеток не происходит. Около 50% клеток остаются интактными. Контроли: клетки неинфицированной культуры, окрашенные конъюгатом, не показывают флуоресценции; специфичность свечения подтверждается отсутствием его в препаратах инфицированных клеток, обработанных перед окрашиванием специфической неконъюгированной антисывороткой к вирусу гастроэнтерита.

Выявление вирусного антигена в препаратах, приготовленных из патологических материалов от больных свиней. Для выявления вирусного антигена при помощи флуоресцирующих антител используют препараты-отпечатки или замороженные срезы. Патологический материал берут не позже чем через 30 минут после гибели или убоя больных животных.

Препараты-отпечатки делают на тщательно вымытых и обезжиренных предметных стеклах. Многие ткани дают хорошие отпечатки только после предварительного выдерживания на полосках фильтровальной бумаги для удаления избытка влаги. Для приготовления препаратов-отпечатков обычно используют мезентериальные лимфатические узлы, печень, легкие, селезенку, а также соскобы слизистой оболочки желудка и различных отделов тонкого и толстого кишечника. Из каждого материала готовят по два препарата.

Препараты-отпечатки фиксируют и окрашивают по той же методике, как и препараты культур клеток на покровных стеклышках.

Для приготовления замороженных срезов от каждого из поросят берут по три коротких кольцевых кусочка тонкого кишечника. Каждый кусочек ткани помещают в желатиновую капсулу, которую заполняют уплотнителем (обычно для этого используют карбовакс). Ткань, помещенную в капсулу, ориентируют таким образом, чтобы открытый просвет кишечника был расположен параллельно открытому просвету капсулы. Чтобы ткань лучше пропиталась, просвет сегмента кишечника слегка приоткрывают, что позволяет сосочкам занять более естественное положение и обеспечивает хорошую ориентацию их на срезах. Капсулы затем закрывают и погружают в баню с сухим льдом и спиртом для быстрого замораживания и выдерживают в течение некоторого времени при минус 25°. Когда препараты готовы для резки, капсулу извлекают, быстро удаляют желатиновую оболочку капсулы с поверхности блока, а сам блок монтируют водой на приемнике образцов криостата, помещенном на блок сухого льда. Срезы делают при минус 25°, помещают их на чистые стекла, оставляют для высушивания в течение 10—15 минут при 37°, а затем хранят до использования при минус 20°. При необходимости подготовленные таким образом препараты могут храниться при минус 20° в течение нескольких недель.

Окрашивание срезов. Перед окрашиванием срезы фиксируют ацетоном при минус 25° в течение 20 минут и высушивают в течение 15 минут при 37°. Препараты промывают 10 минут в фосфатном буферном растворе (pH 7,3), после чего окрашивают неразведенным конъюгатом в течение 40 минут при 37°. Стеклыш-

ки промывают в фосфатно-буферном растворе, меняя его 3 раза, и в дистиллированной воде один раз (по 5 минут каждый раз), затем высушивают и монтируют препараты, используя забуференный глицерин (4 части глицерина и 1 часть фосфатного буферного раствора). Препараты просматривают при помощи флуоресцентного микроскопа.

Контроли — нормальная ткань кишечника, обработанная конъюгатом (отсутствие свечения); инфицированная ткань, предварительно обработанная немеченой антисывороткой (отсутствие свечения).

Наиболее важно обнаружение желтовато-зеленых флуоресцирующих масс внутри инфицированных клеток в препаратах, приготовленных из тканей от больных животных. Особенно интенсивно свечение в препаратах из тонкого отдела кишечника.

Неинфицированные клетки обычно светятся светло-зеленым или темно-голубым светом, что позволяет легко дифференцировать его от специфического свечения.

Гистологические исследования. Кусочки ткани двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишок фиксируют в 10%-ном нейтральном забуференном растворе формалина, готовят из них гистологические препараты при помощи обычных методов и исследуют под микроскопом на наличие поражений, характерных для вирусного гастроэнтерита свиней.

Особенно характерно обнаружени[кишечных ворсинок, которая наиболее ярко бывает выра[дней после начала заболевания. Соотношение [убине крипт у здоровых животных состав[строэнтеритом оно составляет около 1 : 1.

Для выявления укороченных [которых считают специфическим для вирусного гастроэнте[точках по всей длине кишечника вырезают короткие сегм[ывают и погружают в водуу, а затем просматривают при [пического микроскопа под малым увеличением. В качестве [гменты начального участка двенадцатиперстной кишки от тех [о вирус гастроэнтерита редко вызывает атрофию ворсинок в [енадцатиперстной кишки.

Наиболее характерными измене[руживаемыми при гистологическом исследовании, являются выра[дегенерация эпителия слизистой кишечника, поверхностный некроз эпителия кишечника и кишечных ворсинок (рис. 1, 2, 3, 4, 5, 6).

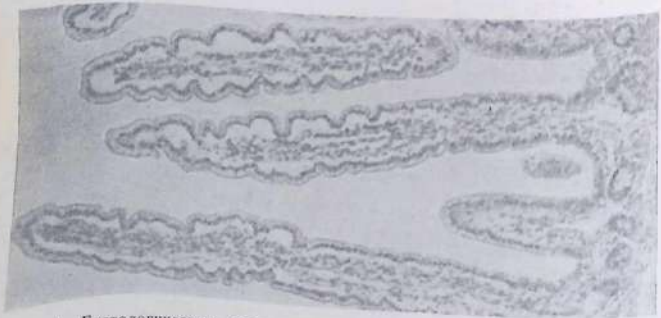


Рис. 1. Гистологические изменения эпителия слизистой оболочки тонкого отдела кишечника свиней при вирусном гастроэнтерите. Слизистая оболочка тощей кишки здорового поросенка (контроль). Нормальная длина ворсинок. (Окраска гематоксилин-эозином) ×93,5.

Рис. 2. Слизистая оболочка тощей кишки больного поросенка. Уменьшение ворсинок с выраженной клеточной инфильтрацией стромы и дегенерацией железистого эпителия. (Окраска гематоксилин-эозином) ×206.

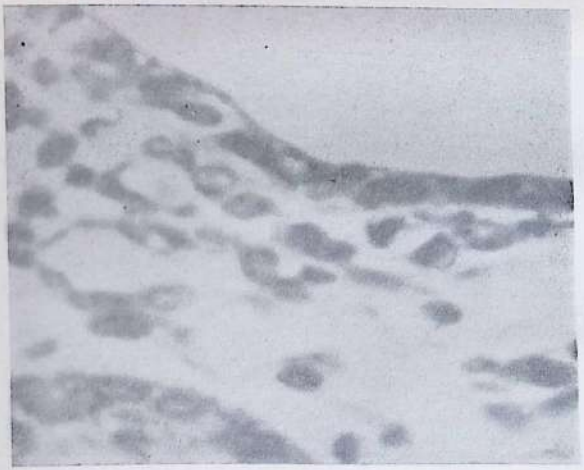


Рис. 3. Слизистая оболочка тощей кишки больного поросенка. Исчезновение ворсинок мерцательного эпителия. Атрофические и деструктивные изменения в эпителии. (Окраска гематоксилин-эозином) ×1150.

Рис. 4. Резко выраженный отек сосочков эпителия слизистой оболочки тонкого отдела кишечника при инфекционном гастроэнтерите поросят. (Окраска гематоксилин-эозином) ×400 (по Окаинва и Маеда, 1965).

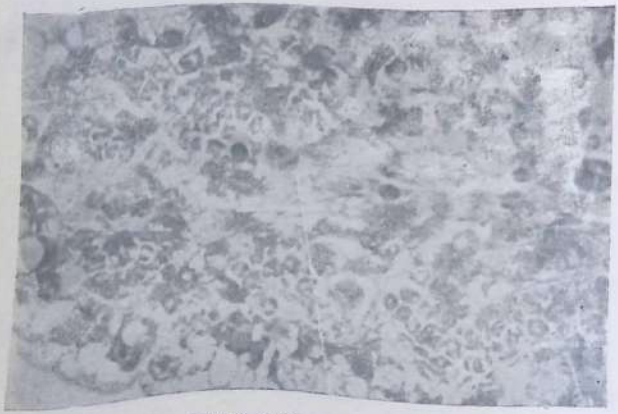


Рис. 5. Резко выраженный отек и пикноз ядра в эпителии слизистой оболочки тонкого отдела кишечника поросенка при вирусном гастроэнтерите. (Окраска гематоксилин-эозином) ×700.

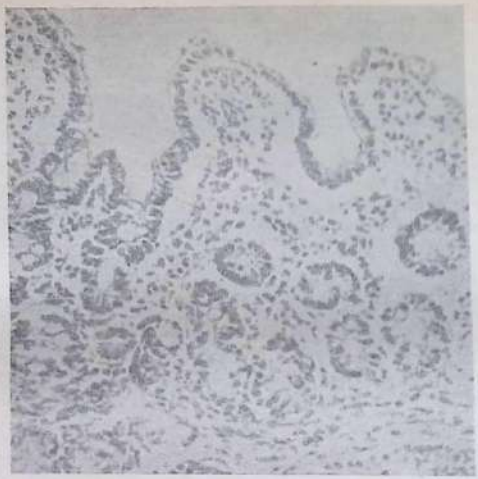


Рис. 6. Типичные для вирусного гастроэнтерита свиней поражения в 12-перстной кишке поросенка. Атрофия ворсинок с резко выраженной клеточной инфильтрацией подслизистой ткани. (Окраска гематоксилин-эозином) ×160 (по Окавина и Маеда, 1965).

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

При дифференциальной диагностике следует исключить чуму свиней, которая иногда может протекать с явлениями гастроэнтерита, а также различные гастроэнтериты бактериальной этиологии и алиментарного происхождения.

При дифференциации от чумы свиней учитывают эпизоотологические данные, а также используют серологические методы (реакция нейтрализации на поросятах-сосунах или в культуре клеток с использованием антисыворотки к вирусу гастроэнтерита свиней).

Массовые поносы бактериальной этиологии могут быть исключены на основании данных бактериологических исследований.

При проведении бактериологических исследований следует иметь в виду возможность активации условнопатогенных микроорганизмов при вирусном гастроэнтерите.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагноз на прошедшую инфекцию обычно ставят при помощи РН в культуре ткани, определяя титры вируснейтрализующих антител в сыворотках крови реконвалесцентов.

В реакции используют постоянную дозу вируса и серийные двукратные разведения сыворотки. Техника постановки реакции описана выше.

Для более точной диагностики лучше исследовать парные сыворотки, взятые с интервалом в 3—4 недели. Титры антител у переболевших животных могут колебаться от 1 : 8—1 : 32 до 1 : 640—1 : 1280.

В первые дни после начала заболевания антител в крови животных нет (титры от 1 : 2 до 1 : 8), но к седьмому дню они уже могут достигать уровня 1 : 20—1 : 80. На 21-й день после начала заболевания титры антител могут достигать 1 : 64—1 : 640 и выше.

Динамика угасания титров антител не изучена.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

Вопросы вакцинации против вирусного гастроэнтерита свиней вакциной из убитого вируса находятся в стадии экспериментального изучения. Методы серологической оценки поствакцинального иммунитета не разработаны.

ГРИПП СВИНЕЙ
(MYXOVIRUS INFLUENZA. A/SUIS)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Грипп свиней (инфлюэнца, энзоотическая бронхопневмония) — контагиозная, остро протекающая болезнь, возникающая обычно в холодные сезоны года и характеризующаяся внезапным началом, резко выраженной лихорадкой, общей слабостью животного и поражением респираторного тракта. Вирус гриппа свиней может вызвать заболевание людей, и, наоборот, установлена возможность заражения свиней вирусом гриппа человека.

Шоуп показал, что вирус гриппа может длительное время сохраняться в легочных гельминтах свиней (Metastrongilus elongatus и Chaerostrongilus pudendorectus), инфицированные яйца которых попадают во внешнюю среду и заглатываются дождевыми червями. При поедании свиньями инфицированных дождевых червей создаются условия для возникновения энзоотии. Вирус может сохраняться в червях до 19 месяцев.

Болезнь впервые установлена в США в 1918 г. во время пандемии гриппа у людей. Вирус идентифицирован в 1931 г. Шоупом и Левинсом. Грипп свиней встречается во многих государствах Европы и Америки. Зарегистрирован он и в СССР.

В отдельных хозяйствах грипп причиняет большой экономический ущерб, вызывая высокую летальность молодняка (от 10 до 60%) и снижение продуктивности переболевших свиней.

Инкубационный период продолжается от 1 до 6—7 дней. Болезнь протекает остро, подостро, типично и атипично. Начинается она повышением температуры тела до 41—42°. Отмечают вялость, отказ от корма, конъюнктивит, слизистое истечение из носовой полости, чихание, кашель. В области пятачка образуются струпьевидные корки. Дыхание становится сопящим вследствие набухания слизистой оболочки носа и сужения воздухопроводящих путей. Больные животные чаще лежат, зарывшись в постилку, не реагируют на окружающее, при поднимании у них возникают признаки болезненного кашля. При типичном течении болезни у животных развивается воспаление легких — затрудненное дыхание брюшного типа. Из-за ослабления сердечной деятельности кожа в области живота приобретает синюшную окраску. Иногда поражаются мышцы и суставы.

При благоприятных условиях болезнь продолжается 7—10 дней. При типичном течении летальность не превышает 1—4%. Поросята-сосуны и отъемыши переболевают гриппом тяжело. У большинства из них наблюдаются поражение легких, плевриты, перикардиты, дерматиты, истощение.

На вскрытии находят изменения в верхних дыхательных путях и легких; на слизистой оболочке носовой полости — пенистая слизь красноватого цвета; в просвете бронхов — слизистые пробки; в легких — пневмонические очаги катарального характера, увеличение, гиперемия и отечность бронхиальных и средостенных лимфатических узлов. Иногда развиваются односторонние или двусторонние плевриты.

ВИРУС

Согласно современной классификации, вирус гриппа свиней относится к семейству вирусов гриппа типа А. Это РНК-содержащий вирус. Размер вирионов колеблется от 78 до 120 ммк. Вирионы имеют сферическую форму, но иногда

принимают характер цепочек, нитей, диплококков. Вирус проходит через бактериальные фильтраты Беркефельда V и N, Шамберлана L_2 и L_3 и пластины Зейтца. Химический состав вируса сложен и не отличается от состава возбудителя гриппа человека.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Возбудитель гриппа свиней сравнительно мало устойчив к факторам физического и химического воздействия. Нагревание до 60° в течение 20 минут полностью инактивирует его. При комнатной температуре он значительно теряет активность в течение первых суток. Низкие температуры способствуют сохранению его; при температуре минус 20—70° он сохраняется без изменения несколько месяцев. Лиофилизированный, сохраняющийся под вакуумом вирус активен в течение 3½—4 лет. Оптимальный pH среды для хранения 7,0—7,7. При воздействии 3%-ным фенолом, 0,1%-ной настойкой йода, 1%-ным раствором Люголя, сулемой (1:1000), марганцовокислым калием (1:1000) и 1%-ным медным купоросом вирус инактивируется за 3—5 минут.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Тканевой вируссодержащий материал (соскобы слизистой, смывы носовой полости, кусочки легкого и др.) до исследования лучше сохранять в замороженном (при минус 40—70°) виде. При 2—4° материал (содержащий антибиотики) можно хранить не более 20 дней.

Локализация в организме. В период острого течения болезни вирус в высоких концентрациях содержится в трахеальном экссудате, слизи носовой полости, носовых истечениях, бронхах и легочной ткани.

Антигенная вариабельность. Штамм, выделенный Шоупом, был обозначен по месту его выделения A (suis) Jowa/31 и признан эталоном для идентификации вновь изолированных штаммов. До сих пор многие ученые считают, что истинный грипп свиней регистрируется только в Северной Америке. Штаммы, родственные вирусу Шоупа, до последнего времени выделяют в США.

В странах Европы выделены вирусы, родственные американскому. В Англии в 1939 г. был выделен штамм Кэмбридж, относительно которого известно, что он лишь отдаленно напоминает вирус Шоупа. Более сходные с вирусом Шоупа штаммы были выделены в Чехословакии (Харнах, 1950; Меншик, 1951; Гонс с сотр., 1963), в Польше (Парнас, 1954), в Эстонии (Э. А. Лавер, 1957), в РСФСР (Д. Ф. Осидзе, 1964). В то же время большинство европейских штаммов, выделенных от свиней, оказались своеобразными вирусами, обозначенными впоследствии «вирус пневмонии поросят», «вирус энзоотической пневмонии свиней». В Германии в 1933 г. Кебе выделил вирус при гриппоподобном заболевании свиней, который, по данным автора, не мог быть отнесен к вирусу гриппа свиней Шоупа (Кебе и Фертиг, 1938). Сходные вирусы были выделены от свиней в Швеции и Англии. В настоящее время эти вирусы отнесены к организмам группы орнитоза-лимфогранулемы-трахомы (Гульрайани, Беверидж, Беттс, 1951, 1953).

В 1955 г. в Японии от больных свиней был выделен вирус, идентифицированный впоследствии как вирус парагриппа I (Сендай).

В последнее время установлено, что гриппоподобные болезни свиней могут быть обусловлены микоплазмами. Таким образом, необходимо строго дифференцировать респираторные болезни свиней, из которых, по-видимому, лишь незначительная часть, по крайней мере в странах восточного полушария, может быть обусловлена истинным вирусом гриппа свиней, открытого Шоупом.

Начиная с 1959 г. стали появляться сообщения о случаях выделения от больных гриппом свиней штаммов, сходных с человеческими. Так, Андрияскас и В. М. Стаханова в 1959 г. выделили пять штаммов в Литве, сходных с человеческим вирусом АО (Шклявер); Коротич с сотр. (1966) на Украине выделили 14 штаммов, идентифицированных как человеческие типа А, А1, А2 и В; Попович в Румынии выделил от свиней штамм, сходный с АО (PR_8); Барб, Фаркаш, Ромварри, Такачи (1962) в Венгрии выделили 8 штаммов, идентичных PR_8. В начале пандемии азиатского гриппа в 1957 г. штаммы А2 были выделены от свиней в Китае и в Испании. Наконец, во время эпидемии гриппа в СССР в 1969 г. в хозяйстве под Ленинградом был выделен от свиней штамм А2

(168) 69, неотличимый по антигенной структуре от человеческого штамма А2 (Гонконг) 68 (Епиколопова и Жилова, 1969).

Сообщение о выделении от свиней штаммов, сходных с человеческими, было встречено с недоверием, высказывались предположения о лабораторной контаминации материала эталонными вирусами. Однако следует принять во внимание, что в ряде случаев штаммы были выделены ветеринарными вирусологами, не имевшими дела с вирусами, патогенными для человека.

По вопросу о происхождении вируса гриппа свиней существует широко распространенное мнение, что во время пандемии 1918—1919 гг. свиньи на фермах в США инфицировались от солдат, вернувшихся с европейского фронта в 1919 г. Адаптировавшись к организму свиней, вирус дал начало новой болезни, поскольку до пандемии испанского гриппа американские фермеры не знали о подобной болезни в свиноводческих хозяйствах.

Экспериментальное заражение свиней вирусами гриппа человека А0, А1, А2 вызывало скрытую инфекцию без клинических проявлений. Исходя из этих данных, нельзя отрицать возможность инфицирования свиней вирусами гриппа человека, широко распространенными среди населения и в наши дни. Возможно, штаммы вируса гриппа, ныне циркулирующие среди домашних животных и птиц, сформировались в результате инфицирования последних в прошлом одним из вирусов, патогенных для человека.

Нейраминидаза составляет основу малого антигена, который может передаваться в процессе рекомбинации. Была получена рекомбинация вирусов человека с вирусами гриппа лошадей и свиней. Видимо, подобное генетическое взаимодействие может произойти и в естественных условиях, что может привести к образованию новых вирусов, обладающих вирулентностью и пандемическим потенциалом на первом этапе (Кильборн, 1967).

Антигенная активность. У переболевших животных формируются антитела, обнаруживаемые в реакциях нейтрализации, задержки гемагглютинации и связывания комплемента.

Гемагглютинирующие свойства. Вирус гриппа свиней агглютинирует эритроциты курицы, морской свинки, человека (О группы), утки, галки, хорька, крысы, собаки, ежа, но в более низких разведениях, чем вирусы гриппа человека типа А и В.

Спектр патогенности. Из лабораторных животных к вирусу гриппа свиней чувствительны белые мыши, крысы, хорьки и хомяки. У мышей уже через 24—48 часов после заражения появляются первые клинические признаки болезни. Животные гибнут через 3—8 суток после заражения. Смертность зависит от вирулентности штамма.

По мере серийного пассирования вируса на белых мышах вирулентность его для свиней ослабевает. В легких павших мышей отмечаются долькообразные темно-красные участки, влажные на поверхности разреза, гепотизация.

Вышеуказанные лабораторные животные заболевают только при интраназальном заражении. Они нечувствительны и к подкожному, интраперитонеальному и внутримозговому заражению. Исключение составляют хорьки, у них легко возникает контактное заражение. Установлена высокая восприимчивость к вирусу гриппа серых крыс пасюков, которые рассматриваются как резервуар поддержания вируса в природе. Кролики и щенки к данному вирусу невосприимчивы.

Культивирование. В условиях лаборатории вирус гриппа свиней можно адаптировать к организму белых мышей или хорьков и непрерывно вести интрацеребральные пассажи. Помимо организма мышей, он хорошо размножается и в куриных эмбрионах. Адаптированные к хорионаллантоису штаммы вызывают появление на мембране беловатых точечных бляшек. При заражении эмбрионов в аллантоисную полость отмечается появление геморрагий. Для культивирования используют 10—11-дневные эмбрионы. Максимальное накопление вируса происходит в течение 48—72 часов, титр его в аллантоисной или амниотической жидкости обычно достигает 10^7—10^8 EID_{50}/мл.

Помимо эмбрионов, доказана возможность выращивания вируса в культурах тканей почки человека, обезьяны, хомяка, мышей и теленка. Вирус приобретает цитопатогенные и гемагглютинирующие свойства и накапливается в высоких

титрах (10^5—10^6 EID_{50}, 10^6 $ТЦД_{50}$/мл). В культуре почки поросенка и легких эмбриона свиньи вирус накапливался в титре $10^{4,5}$—$10^{5,75}$ $ТЦД_{50}$ и вызвал цитопатогенное действие.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Трудность распознавания гриппа свиней связана с тем, что вирусные респираторные болезни (инфекция Сендай, пневмонии хламидозойной природы, аденовирусная инфекция), а также наличие микоплазмоза сопровождаются катаральными процессами в дыхательных путях. Атипично протекающий грипп свиней иногда может иметь хроническую форму и эпизоотологически напоминать вирусную пневмонию свиней. Наконец, возможны случаи смешанной инфекции, когда поросята заражаются бактериальными и вирусными агентами.

Диагностика гриппа свиней основана на клинических, эпизоотологических, патологоанатомических и лабораторных данных. Сходство возбудителя гриппа человека типа А и гриппа свиней определило общие методические приемы исследований в медицине и ветеринарии, иногда несколько различающиеся спецификой объектов исследования.

Различают ранюю и ретроспективную лабораторную диагностику гриппа свиней. Методы ранней диагностики включают выделение вируса из органов и секретов больных животных и изучение его свойств (индентификацию). В частности, в ранней диагностике используют:

выделение и культивирование вируса на лабораторных животных (белые мыши, хорьки, хомяки, крысы);

выделение и культивирование вируса на куриных эмбрионах;

выделение и культивирование вируса в культурах тканей;

обнаружение вируса в носовых смывах в реакции гемагглютинации;

вирусоскопические исследования с целью обнаружения телец-включений.

Взятие и подготовка материала. Материал от больного животного можно получить в форме слизи, собранной путем тщательного протирания носовых ходов стерильными ватными тампонами, которые сразу же погружают в пробирки с раствором Хенкса (pH 7,6—7,8) для дальнейшей транспортировки в лабораторию. Для получения секрета из полости носа в большом объеме в оба носовых хода на эластичной проволоке вводят влажные (смоченные физиологическим раствором) ватные тампоны на 15—20 минут. Тампон извлекают и отжимают в стерильную пробирку 0,2—0,5 мл секрета, который помещают на лед и быстро отправляют в лабораторию. Кроме того, материал можно получить введением шприцем или резиновой грушей 10 мл физиологического раствора в каждый носовой ход. Смывную жидкость собирают в стерильные бактериологические чашки и переливают в пробирки. Носовые смывы больных животных берут от 3—4 животных в первые 5—6 дней после проявления клинических признаков болезни.

При выделении вируса гриппа из трупного материала вырезают кусочки ткани легкого и трахеи размером до 5 см в диаметре и отправляют в лабораторию в стерильной посуде и в охлажденном или замороженном состоянии (в термосе или сосуде со льдом).

Полученный материал используют для заражения развивающихся куриных эмбрионов в день их доставки в лабораторию; если это невозможно, его сохраняют не более 30 дней в замороженном виде от минус 15° до минус 70°.

Перед заражением мышей или куриных эмбрионов проводят подготовку патологического материала. Замороженный материал оттаивают при комнатной температуре. Тампоны эмульгируют в растворе Хенкса или бульоне. Смывную жидкость осветляют центрифугированием, добавляют антибиотики, выдерживают для контакта в холодильнике при 4° или 1—2 часа при комнатной температуре, затем ее используют для заражения куриных эмбрионов. Ткань легких растирают 1 : 10 (по весу) в растворе Хенкса или физиологическом растворе в ступке со стеклянным песком, затем суспензию центрифугируют при 1500—2000 об/мин 20 минут и надосадочную жидкость используют для выделения вируса. Соскоб, взятый из трахеи, суспендируют в растворе Хенкса или физиологическом растворе и отстаивают 30 минут при температуре 2—4°.

На каждый миллилитр испытуемого материала (суспензии или секрета из носа) добавляют по 200 ЕД пенициллина и стрептомицина. Для суспензии ткани легкого или соскоба из трахеи дозу антибиотиков увеличивают в 3 раза.

Если объем испытуемого инфекционного материала превышает 10 мл, то можно вирус из него адсорбировать эритроцитами крови кур. Для этого инфекционный материал предварительно фильтруют через тонкий марлевый фильтр и добавляют 1 мл 5%-ной суспензии эритроцитов. После часового контакта на холоде смесь центрифугируют, осадок эритроцитов в объеме 1—2 мл используют для заражения куриных эмбрионов (О. М. Чалкина, 1943).

Выделение вируса на лабораторных животных. Используют хорьков, белых крыс, но чаще белых мышей. В качестве исходного материала для выделения вируса используют кусочки легкого, трахею, бронхеальный экссудат, носовые смывы от больных свиней.

Мышей заражают под эфирным наркозом и в течение 5—7 дней наблюдают за ними, обращая внимание на общее состояние животных. Если животные не гибнут, их убивают. На вскрытии отмечают изменения в легких, а затем проводят еще 3—4 пассажа. По мере адаптации вирулентность вируса для белых мышей значительно усиливается, и они гибнут на 4—7-й, а иногда на 14-й день после заражения.

При заражении свежевыделенными штаммами гриппа свиней, взятыми в тот момент, когда еще отсутствуют макроскопические изменения в легких белых мышей, гемагглютинирующая активность вируса бывает отрицательной. При развитии лобарной пневмонии проявляется и гемагглютинирующая активность вируса. По-видимому, гемагглютинирующая активность вируса в легких тесно связана с его патогенными свойствами.

В процессе серийных интраназальных пассажей возможна активизация латентных пневмотропных вирусов и бактерий, носительство которых у мышей, по мнению многих авторов, широко распространено. В связи с этим слабоадаптированный вирус грип-

на часто теряется. Кроме того, спонтанные латентные вирусы часто затрудняют правильную постановку диагноза, поэтому для выделения вируса чаще используют куриные эмбрионы.

Выделение вируса гриппа свиней на куриных эмбрионах. Для подавления посторонней микрофлоры и плесени применяют пенициллин, полимиксин, стрептомицин, микостатин и нистатин. В зависимости от интенсивности загрязнения материала добавляют от 100 до 1000 ЕД/мл.

Испытуемый материал чаще инокулируют в аллантоисную или амниотическую полости 9—12-суточных куриных эмбрионов, которые после заражения инкубируют 48—72 часа, иногда до 96 часов при температуре 37°.

Для выделения вируса обычно проводят 2—3 слепых пассажа. Присутствие вируса в экстраэмбриональной жидкости определяют реакцией гемагглютинации с эритроцитами кур. Если после 3-го пассажа гемагглютинация не установлена, пассажи прекращают.

При введении вирусного материала в полость амниона происходит прямое инфицирование органов и тканей эмбриона. Этот метод выделения вируса самый чувствительный, так как происходит непосредственное инфицирование трахеи эмбриона и генерализация инфекции.

Собранную аллантоисную и амниотическую жидкость после центрифугирования 15 минут при 1500—2000 об/мин разливают в пробирки (или лунки на досках из плексигласа) в объеме по 0,5 мл и исследуют на присутствие вируса гриппа добавлением 0,2 мл 1%-ной суспензии отмытых эритроцитов курицы или морской свинки (А. А. Смородинцев, 1965).

Результаты учитывают после оседания эритроцитов в пробирках с контрольной аллантоисной и амниотической жидкостями незараженного эмбриона. Если произошла специфическая агглютинация, она повторяется и при следующих пассажах этого материала на эмбрионах и обычно предупреждается специфической сывороткой против вируса А.

В тех случаях, когда аллантоисная и амниотическая жидкости зараженного эмбриона не дают гемагглютинации после первичного заражения эмбрионов материалом от больных животных делают 2—3 дополнительных пассажа с проверкой по реакции гемагглютинации. Последующие пассажи на эмбрионах проводят введением амниотической жидкости и растертых с красным песком амниотических оболочек, пока вирус не адаптируется и не обнаружится по данным реакции гемагглютинации. В дальнейшем пассажи продолжают введением в аллантоисную полость аллантоисной жидкости. Количество «слепых» пассажей от амниона к аллантоису различно. Иногда вирус выделяют уже на первом пассаже, обычно это происходит на 2—3-м пассаже. Исследование считают отрицательным, если гемагглютинация отсутствует после второго дополнительного пассажа.

Использование культуры ткани для выделения вируса *. Однослойная трипсинизированная культура из почек поросенка является универсальной культурой, применяя которую можно выделить от больных свиней вирус гриппа.

Для быстрой индикации вируса гриппа в однослойных культурах почечного эпителия поросят используют реакцию гемадсорбции с эритроцитами курицы, морской свинки или О-группы человека. Гемадсорбция, положительная реакция гемагглютинации, а также дегенеративные изменения клеток почечного эпителия указывают на присутствие вируса в исследуемом материале.

Вирус, вызвавший явление гемадсорбции, должен адаптироваться к развивающимся куриным эмбрионам и вызывать у них накопление гемагглютининов.

Обнаружение вируса гриппа в носовых смывах при помощи реакции гемагглютинации. При постановке реакции гемагглютинации обычно используют эритроциты кур или морской свинки. Берут 0,5 мл носового смыва, добавляют 0,5 мл 0,5%-ной взвеси эритроцитов, тщательно встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 1—2 часа. Результаты реакции учитывают общепринятым методом. Чувствительность реакции можно повысить, увеличив объем испытуемых смывов. Реакцию гемагглютинации со смывами используют только при массовом заболевании гриппом, так как процент специфических реакций иногда не превышает 30%.

Риноцитоскопическая диагностика (по А. А. Смородинцеву, 1965). Делают мазки-отпечатки со слизистой носа. Для этого тонкие сухие ватные тампоны на палочке вводят в полость носа и прижимают со всех сторон к слизистой нижней носовой раковины. Извлеченный из носа тампон осторожно прижимают к предметному стеклу для получения мазка, который после подсушивания на воздухе окрашивают.

Приготовление красителя. К 200 мл дистиллированной воды добавляют 0,1 мл насыщенного на метиловом спирте раствора основного фуксина и 0,4 мл насыщенного на метиловом спирте раствора метиленовой сини. Полученная смесь двух красок должна сохранять синий цвет с фиолетовым оттенком. На фильтровальной бумаге краска дает фиолетовое пятно, окруженное темным ободком с розовыми лучами. Полученная краска сохраняется длительное время при хранении раствора в темной склянке.

Техника окрашивания мазков-отпечатков. Высушенные при комнатной температуре препараты опускают на 10—15 минут в краску, споласкивают водопроводной водой и исследуют под микроскопом. При правильном соотношении красителей через 10—15 секунд ядра клеток окрашиваются в синий цвет, хроматиновые зерна — в темно-фиолетовый, а цитоплазма — в светло-сиреневый.

Важной особенностью гистологических изменений слизистой оболочки носа является ранний некроз и десквамация клеток цилиндрического эпителия. Этот признак считают патогномичным для данной болезни.

---

* Выращивание вируса гриппа на переживающих взвешенных кусочках хорионаллантоисной оболочки во вращающихся пробирках с индикацией вируса по реакции гемагглютинации применяется не для выделения вируса от больных животных, а для постановки реакции нейтрализации с сыворотками переболевших животных для изучения взаимодействия вируса с сывороточными ингибиторами и антителами.

При других инфекциях дыхательных путей цилиндрический эпителий в э
сроки не повреждается.

При гриппе, кроме единичных клеток цилиндрического эпителия и лейкоц
тов, можно видеть клетки плоского эпителия, лейкоциты, иногда гистиоцит
Почти все клетки цилиндрического эпителия лишены ресничек и дегенеративн
изменены: протоплазма вакуолизирована, контуры клетки расплывчаты, клет
уменьшены или увеличены в размере.

Положительный диагноз ставят на основании обнаружения количества кл
ток цилиндрического эпителия в отпечатке первые 1—3 дня болезни. Позд
количество цилиндрических клеток в мазке уменьшается.

Вопрос о диагностическом значении цитоплазматических включений пр
гриппе свиней не ясен, так как в литературе нет достаточно обоснованных со
общений. При гриппе человека вирусные включения обнаруживаются в цит
плазме клеток цилиндрического эпителия или, расположенные вне клеток, о
рашиваются в красный цвет. Они имеют вид округлых мелких образовани
иногда достигающих размеров ядра клетки. Нередко клетка содержит нескол
ко включений. Крупные включения хорошо видны при средних увеличения
микроскопа. В некоторых препаратах единичные мелкие включения обнаружи
ваются только при помощи иммерсии. Если после окраски в препарате преоб
ладают красные тона и ядра плохо дифференцируются, то к приготовляемом
раствору краски следует прибавить метиленовую синь по каплям до получени
правильного цвета клеток.

При гриппе свиней базофильные включения имеют округлую, овальную, се
повидную формы и окрашиваются положительно по Фельгену. В цитоплазм
клетки они встречаются в разном количестве, расположены вблизи ядра и инос
да бывают окружены оболочкой из оксифильного вещества. Включения эти от
мечают в клетках эпителия в тот период, когда в легких обнаруживается вирус
Они представляют собой колонии вируса.

Результаты риноцитоскопии важны для эпизоотологического анализа, сигна
лизируя о начавшейся вспышке гриппа.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ТИПА ВЫДЕЛЕННОГО ГРИППОЗНОГО ВИРУСА

Все ранее выделенные эпизоотические штаммы гриппа свиней относятся к типу А. Однако это не исключает возможности обна ружения вируса гриппа иной типовой принадлежности. Поэтому тип выделенных вирусов определяют методом задержки гемагглю тинации с типоспецифическими сыворотками против вирусов грип па типа А (Шоупа), A_1, A_2 и В. Типоспецифические иммунсыво ротки получают на белых крысах и белых мышах. Для точной диф ференциации более пригодны иммунсыворотки белых мышей. Основной опыт РТГА ставят с четырьмя дозами вируса. Сыворотки каждого серотипа разводят с коэффициентом 2 от 1 : 10 до ранее определенного титра и берут 0,2 мл. К каждому разведению сыво ротки добавляют 0,2 мл вируса в разведении, соответствующем четырем гемагглютинирующим дозам вируса. В контрольные про бирки с разведением сывороток 1 : 10 и 1 : 20 добавляют по 0,2 мл физиологического раствора. После одночасового контакта вируса с сывороткой в пробирки вносят по 0,4 мл 1%-ной суспензии эрит роцитов кур и учитывают реакцию при комнатной температуре.

Сыворотка, задерживающая реакцию гемагглютинации до раз ведения не меньше четверти ее гомологичного титра, соответству ет типу вируса. Например:

Сыворотки к вирусу гриппа	Гомологичные титры сывороток	РТГА со штаммами					
		2		3		4	
		титр	отношение	титр	отношение	титр	отношение
Штамм № 1 типа А	1:320	1:80	0,25	1:160	0,5	1:40	0,125

В данном примере штаммы 2 и 3 принадлежат к вирусу гриппа свиней типа А и родственны штамму № 1, так как сыворотка к этому штамму нейтрализует гемагглютинирующую активность штаммов 2 и 3 соответственно до 0,25 и 0,5 своего гомологичного титра (1:320).

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

При ретроспективной диагностике важно выяснить, отмечалась ли циркуляция вируса гриппа на данной ферме. Для этого исследуют кровь 10—20 животных на присутствие антигемагглютининов. Начиная с 7—10-го дня после начала заболевания в крови реконвалесцентов появляются антитела, которые в зависимости от метода их определения условно подразделяют на нейтрализующие, комплементсвязывающие и антигемагглютинины.

Нейтрализующие антитела у свиней появляются на 6—7-й день. Максимальный титр их обычно бывает между 14 и 27-м днями. Реакцию нейтрализации проводят на мышах и куриных эмбрионах общепринятым методом.

Антигемагглютинины в крови экспериментально зараженных поросят образуются во всех случаях на 8—10-й день, на 21-й день наблюдается некоторое снижение их титра, и к 40-му дню титры их в РТГА колеблются от 1:8 до 1:32 (Д. Ф. Осидзе, 1966).

Обнаружение антигемагглютининов в крови переболевших животных — наиболее простой, достаточно точный и пригодный метод для проведения единичных и массовых исследований при диагностике гриппа. Для этого при помощи РТГА определяют сдвиг специфических антител в парных сыворотках, взятых от животных в различные сроки после переболевания. Для этого необходимо получить от каждого больного животного две пробы сыворотки: в первые дни болезни (первая проба) и в период реконвалесценции (вторая проба). Интервал между взятием первой и второй пробы должен быть не менее 8—14 дней. Если в сыворотке, полученной от больных свиней, в стадии выздоровления через 14—30 дней от начала болезни, количество антител возросло по сравнению с исходным уровнем антител в первой сыворотке (взятой в первые дни болезни) в 4 раза и более, это свидетельствует о прошедшей вспышке гриппа.

Кровь от больных свиней берут из вены или надреза уха. Сыворотки получают общепринятым способом и сохраняют до мо-

мента взятия второй пробы крови в замороженном состоянии при минус 15—20°. Обе пробы сыворотки, собранные от одного больного, исследуют одновременно после предварительного прогревания при 60° в течение 30 минут. Затем их освобождают от термостабильных ингибиторов (обработкой CO_2)* и неспецифических агглютининов**. После обработки сывороток реакцию торможения гемагглютинации ставят следующим методом (А. А. Смородинцев, 1965).

Для постановки этой реакции с парными сыворотками от больных животных необходимо иметь следующие ингредиенты:

1) две пробы сывороток, собранные от больного животного в начале заболевания и в период реконвалесценции, прогретые 30 минут при 60°;

2) специфические антигены вируса гриппа типов А (Шоуп), A_1 и A_2. Для РТГА необходимо отбирать ингибиторорезистентные штаммы;

3) эритроциты крови кур (1%-ная суспензия), отмытые физиологическим раствором в центрифуге. При титровании рабочей дозы штаммов вируса гриппа А, A_1 используют эритроциты кур. Вирус гриппа A_2 лучше титровать с эритроцитами О-группы человека.

Перед постановкой основного опыта РТГА определяют рабочую дозу вируса указанных типов, содержащих 4 АЕ. Рабочее разведение вируса готовят общепринятым методом.

Постановка реакции. Первую и вторую пробы сывороток разводят в физиологическом растворе в объеме 0,25 с коэффициентом 2, начиная с 1 : 10 до 1 : 2560. Готовят столько рядов разведений сывороток, сколько взято в опыт гриппозных вирусов, и еще один дополнительный (контрольный) ряд. В каждый ряд разведений сыворотки добавляют по 0,25 мл физиологического раствора. После тщательного встряхивания пробирки или панели с разведенными сыворотками и антигенами оставляют при комнатной температуре или в рефрижераторе при 4° до следующего дня, после чего добавляют к ним эритроциты в объеме 0,5 мл. В ряды сывороток, залитые вирусами гриппа А и A_1, наливают эритроциты кур, а в ряды сывороток с вирусами гриппа типа A_2 добавляют суспензию эритроцитов О-группы человека.

---

* Для этого прогретую сыворотку разводят (1 :10) дистиллированной водой, насыщенной CO_2. Выпавший осадок удаляют центрифугированием в течение 10 минут при 1000—1500 об/мин. Затем к отделенной надосадочной жидкости добавляют 8,5%-ный раствор поваренной соли для восстановления исходной концентрации в сыворотке. Приготовленная таким образом сыворотка уже разведена 1 : 10 и используется в реакции задержки гемагглютинации.

** Для этого к нормальной и испытуемой сыворотками в разведении 1 : 5 добавляют в равном количестве 50%-ную взвесь куриных эритроцитов, смешивают и оставляют на 30 минут при температуре 4°; после этого центрифугируют и отделенную надосадочную жидкость проверяют на наличие спонтанной гемагглютинации.

Результаты РТГА учитывают по мере оседания эритроцитов по осадку, сформировавшемуся на дне пробирок.

Для проверки специфичности РТГА с парными сыворотками переболевших гриппом свиней необходимо ставить следующие контроли.

Контроль обследуемых сывороток больных животных на отсутствие спонтанной агглютинации использованных эритроцитов. Для этого готовят лишний ряд разведений сывороток, куда добавляют эритроциты, а вместо вируса — физиологический раствор. Ни одно разведение исследуемой сыворотки не должно вызывать спонтанную агглютинацию эритроцитов. При наличии гемагглютинации в контрольной сыворотке последнюю разводят 1 : 5 и предварительно истощают равным объемом 50%-ной суспензии отмытых куриных эритроцитов, центрифугируют и снова обследуют истощенные сыворотки на наличие антител.

Контроль рабочей дозы вируса. Методика титрования рабочего разведения вируса описана в руководствах по вирусологии.

Контроль специфичности использованных вирусов (антигенов). С этой целью параллельно с обследованием сывороток крови больных животных ставят РТГА с типоспецифическими иммунными сыворотками и рабочими разведениями вирусов (антигенов). Если использованные вирусы нейтрализуются иммунными сыворотками до их титра, их считают специфичными.

Для оценки результатов РТГА с обследуемыми сыворотками больных свиней сравнивают титры антител против вирусов гриппа типов А (Шоуп), A_1 и A_2 в первой и второй пробах сыворотки. Результат исследования считают положительным, если титр антител во второй сыворотке к тому же типу вируса превышает не менее чем в 4 раза титр антител в первой сыворотке (А. А. Смородинцев, 1965).

Бывают случаи, когда выделенный штамм вируса не дает отчетливой нейтрализации в РТГА с одной из лабораторных сывороток, тогда как сыворотки больных животных из того же очага обнаруживают прирост антител к одному из лабораторных штаммов вируса гриппа. Это объясняется пониженной чувствительностью выделенного вируса к специфическим для него антителам в условиях РТГА. В этом случае эритроциты кур, используемые для постановки РТГА, вступают в конкуренцию с антителами, адсорбируют вирус и гемагглютинируют, что приводит к развитию отрицательной РТГА (А. А. Смородинцев, 1965).

В таких сомнительных случаях А. А. Смородинцев рекомендует поставить РТГА в другой модификации, предусматривающей усиление авидных свойств антител иммунной сыворотки в результате добавления к ней неспецифического стимулятора антител (кофактора), содержащегося в титре до 1 : 200 в любой нативной нормальной сыворотке.

Для этого иммунные сыворотки типов А, A_1 или A_2 разводят с коэффициентами 2 параллельно в физиологическом растворе и нагретой нормальной сыворотке морской свинки или кролика, взятой в разведении 1 : 40, содержащей избыточное количество неспецифического стимулятора антител. В таких условиях авидность антител резко повышается, и штаммы, не реагирующие с антителами в РТГА в обычных условиях, дают хорошо выраженное торможение. При этом необходимы дополнительные контроли на отсутствие ингибиции вируса взятым

для работы разведением нормальной сыворотки, а также гемагглютинации эритроцитов курицы в присутствии этой сыворотки. Штаммы вируса гриппа с низкой чувствительностью к антителам в условиях РТГА или реакции нейтрализации с прогретыми иммунными сыворотками встречаются часто среди ингибиторезистентных штаммов вируса гриппа типа A_2 (А. А. Смородинцев, 1965).

Особенности штаммов выделенного вируса уточняют дополнительно по результатам перекрестной адсорбции антител с различными сыворотками гомологичного типа. Чем ближе антигенная структура выделенного штамма к уже известным представителям того же серологического типа, тем полнее исследуемый вирус истощит антитела гетерологичной иммунной сыворотки (А. А. Смородинцев, 1965).

В 1956 г. А. А. Смородинцев предложил следующую методику определения антигенных свойств выделенных штаммов вируса гриппа при помощи перекрестной адсорбции антител иммунных сывороток. Используют моновалентные иммунные сыворотки, полученные от белых крыс, 3—4-кратно внутрибрюшинно иммунизированных аллантоисным вирусом лабораторных штаммов типов A_1, A_2 или В. Титр сыворотки в РТГА должен быть не ниже 1 : 320 с 4 АЕ вируса. Более активные сыворотки разводят до титра 1 : 320.

Иммунные сыворотки истощают разведением в 20 раз испытуемым гетерологичным штаммом цельного аллантоисного вируса (с минимальным титром по реакции гемагглютинации 1 : 160). Для этого к 0,2 мл иммунной сыворотки добавляют 3,8 мл цельного аллантоисного вируса. Смесь выдерживают 18 часов в леднике при 0—4°, после чего проверяют на присутствие свободного вируса в реакции гемагглютинации (отсутствие гемагглютинации, т. е. свободного вируса, указывает на недостаточность истощения). Для удаления свободного вируса истощенную холодную сыворотку добавляют к осадку эритроцитов, полученному после трехкратного отмывания в центрифуге 5 мл дефибринированной или цитратной крови курицы. Сыворотку встряхивают с осадком эритроцитов, выдерживают 2 часа в леднике для адсорбции вируса, центрифугируют и отсасывают от осадка эритроцитов. Сыворотку освобождают от избытка вируса и обследуют в реакции гемагглютинации. Полноту истощения проверяют с контрольным гомологичным штаммом, который должен извлечь из своей сыворотки все вируснейтрализующие антитела, а также с вирусом другого серотипа (например, тип В для сывороток A_1 или A_2), когда истощенная сыворотка сохраняет свой исходный титр.

Сыворотку, истощенную гетерологичным штаммом, испытывают на количество оставшихся антител в реакции торможения гемагглютинации с 2 АЕ гомологичного вируса. Количество оставшихся антител будет тем больше, чем меньше антигенная структура испытуемого штамма соответствует лабораторному вирусу.

Истощенную иммунную сыворотку испытывают в ряде разведений, начиная с 1 : 20, с коэффициентом 2. Если контрольная (неистощенная) сыворотка активна до 1 : 320, то истощенная сыворотка с гомологичным штаммом не активна в разведении 1 : 20. Сыворотка, истощенная гетерологичными штаммами с другой антигенной структурой, будет активна в разведениях от 1 : 20 и выше.

Реакция перекрестного истощения антител раскрывает антигенные связи и антигенные различия между отдельными штаммами более полно, чем реакция перекрестной нейтрализации, и дополняет ее результаты более точными данными.

Данную реакцию необходимо ставить не только с истощенными сыворотками против лабораторных эталонных штаммов, с которыми сравнивают выделенные полевые штаммы, но и с сыворотками, полученными против этих новых штаммов. В последнем случае их истощают лабораторными культурами вирусов того же серотипа.

Результаты опыта перекрестной адсорбции антител в реакции торможения гемагглютинации учитывают по следующей форме (табл. 1).

Реакция связывания комплемента (по А. А. Смородинцеву, 1965). В ветеринарной практике применение реакции связывания комплемента для диагностики гриппа свиней не разработано; эту реакцию ставят в исследовательских целях по методике, принятой в медицинской практике.

Схема учета результатов опыта перекрестной адсорбции антител в реакции торможения гемагглютинации

Испытуемые штаммы	Иммунные сыворотки белых крыс против штаммов															
	В-Ли				В-49				$B-53_1$				$B-53_2$			
	истощены вирусами															
	В-Ли	В-49	$B-53_1$	$B-53_2$	В-Ли	В-49	$B-53_1$	$B-53_2$	В-Ли	В-49	$B-53_1$	$B-53_2$	В-Ли	В-49	$B-53_1$	$B-53_2$
В-Ли	0	$^1/_2$	$^1/_2$	$^1/_4$	0	0	$^1/_{32}$	$^1/_{64}$	0	0	0	0	0	0	0	0
В-49	0	0	$^1/_{64}$	$^1/_{32}$	$^1/_4$	0	$^1/_4$	$^1/_8$	$^1/_{64}$	0	0	0	$^1/_{64}$	0	0	0
$B-53_1$	0	0	0	0	$^1/_{32}$	0	0	0	$^1/_2$	$^1/_4$	0	0	$^1/_4$	$^1/_8$	0	0
$B-53_2$	0	0	0	0	$^1/_{32}$	0	0	0	$^1/_4$	$^1/_8$	0	0	$^1/_4$	$^1/_8$	0	0
А1-3711 (контроль)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Условные обозначения: 1 — нейтрализация до титра с гомологичным штаммом; $^1/_2$, $^1/_8$, $^1/_{16}$, $^1/_{32}$, $^1/_{64}$ — нейтрализация до $^1/_2$—$^1/_{64}$ титра с гомологичным штаммом; 0 — реакция нейтрализации отрицательная.

Примечание. Метод перекрестной адсорбции антител иммунных сывороток может с успехом использоваться для характеристики антигенных свойств выделенных штаммов гриппа кур (классическая чума), уток, лошадей и свиней.

Приготовление антигенов. Применяемые для РСК антигены должны быть активны в высоком титре, не давать неспецифических реакций с нормальными сыворотками свиней и не обладать антикомплементарным свойством.

В качестве антигенов вируса гриппа можно применять вируссодержащую аллантоисную жидкость 10—11-дневных куриных эмбрионов, зараженных в аллантоисную полость. Свежие аллантоисные и амниотические антигены очень нестойки, при хранении на холоде в них выпадает осадок из трудно растворимых уратов. Перед употреблением антигены, содержащие осадок, встряхивают и центрифугируют. Для стабилизации аллантоисных антигенов к ним рекомендуется прибавлять 10% глюкозы.

Для постановки реакции связывания комплемента с сыворотками гриппозных больных животных можно с успехом применять диагностикумы вируса гриппа, приготовленные методом диализа *.

Для постановки РСК свежие антигены вируса гриппа и диагностикумы разводят с таким расчетом, чтобы в единице объема содержалось 10—16 гемагглютинирующих единиц. Неразведенные антигены применять не следует, так как они могут давать неспецифическую реакцию.

Эритроциты барана, отмытые 3 раза физиологическим раствором, доводят до исходного объема крови, откуда готовят 5%-ную взвесь при постановке пробирочной реакции и 4%-ную взвесь при постановке реакции капельным методом.

Гемолитическую кроличью сыворотку используют в разведении, равном тройному титру при постановке РСК с аллантоисными антигенами, а при постановке опыта с антигенами из культуральной жидкости сыворотку берут в четырехкратном титре.

От каждого больного животного необходимо получить две пробы сыворотки: в первые дни болезни (первая проба) и через 14—30 дней, в период реконвалесценции (вторая проба). Первые пробы сыворотки получают обычным способом и сохраняют непрогретыми при 4° или замороженными до получения второй пробы крови от каждого больного животного. Обе пробы сывороток обследуют в РСК одновременно.

Перед опытом сыворотки тщательно центрифугируют, разводят 1 : 10 физиологическим раствором и прогревают в водяной бане при 56° в течение 20 минут для разрушения собственного комплемента и устранения антикомплементарных свойств.

Комплементом служит сыворотка морских свинок, сохраняемая в замороженном виде. Можно с успехом применять также сухой комплемент, изготовленный производственным способом.

Постановка реакции. Реакцию ставят в общем объеме 0,5 мл. Каждый ингредиент используют в объеме 0,1 мл. В контрольных пробирках отсутствующие ингредиенты (антиген, сыворотка) замещают физиологическим раствором.

В нескольких рядах, в соответствии с числом антигенов, готовят разведения сывороток с коэффициентом 2, начиная с 1 : 10 до 1 : 320.

Если сыворотки проверяют, например, в пяти рядах, готовят в отдельной пробирке разведение сыворотки 1 : 10 в объеме 1 мл. Берут 0,5 мл этой сыворотки и распределяют по 0,1 мл в первые пробирки каждого ряда. К оставшейся в этой пробирке сыворотке (0,5 мл) добавляют в равном количестве (0,5 мл) физиологический раствор и таким образом снова увеличивают разве-

* Диализованный антиген. Целлофановый мешочек заполняют необработанной вируссодержащей аллантоисной жидкостью, к которой добавляют мертиолят в конечной концентрации 1 : 20 000 и в течение 17 часов при 4° диализуют в стерильном сосуде против четырехкратного объема глицерина, также содержащего мертиолят. Перед использованием диализационный мешочек стерилизуют кипячением в дистиллированной воде, а глицерин — фракционированным автоклавированием. Титр ГА диализованного антигена значительно выше, чем нативного вируса. Он сохраняется шесть месяцев при 4° после добавления 0,08% NaN_3.

дение сыворотки в 2 раза (1 : 20), восстанавливая ее исходный объем (1 мл). Половину восстановленного объема снова распределяют по 0,1 мл во вторые пробирки каждого ряда и снова к оставшейся части добавляют 0,5 мл физиологического раствора, повторяя эту процедуру до конечного разведения. Такой метод разведения сывороток гарантирует минимальную ошибку опыта, поскольку все разведения сывороток для каждого ряда антигенов готовят в одной пробирке. При меньшем числе антигенов соответственно уменьшают объем исходного разведения сыворотки (1 : 10).

Титрование комплемента. Комплемент титруют в пробирках в присутствии антигенов. В пробирки нескольких рядов в соответствии с числом применяемых антигенов разливают физиологический раствор по 0,1 мл. В пробирки каждого ряда добавляют по 0,1 мл каждого антигена.

ТАБЛИЦА 2

Схема приготовления разведения комплемента

Объем физиологического раствора	0,6	0,5	0,9	0,7	2,0	2,5
Объем комплемента в разведении 1 : 10	0,3	0,2	0,3	0,2	0,5	0,5
Полученные разведения комплемента	1:30	1:35	1:40	1:45	1:50	1:60

По приведенной схеме (табл. 2) готовят разведения комплемента из его исходного разведения 1 : 10, сохраняемого в течение опыта в воде со льдом. Приготовленные разведения комплемента переносят по 0,1 мл в пробирки с антигенами, добавляют туда по 0,2 мл гемолитической системы, ставят на 30 минут в водяную баню при 37°, а затем учитывают результаты титрования комплемента.

Титром комплемента считают наибольшее разведение его, давшее полный гемолиз эритроцитов. Для постановки пробирочной реакции связывания комплемента рекомендуется применять две дозы комплемента. Например, при титре комплемента 1 : 50 двум дозам комплемента соответствует разведение 1 : 25.

Когда комплемент протитрован, рассчитывают его дозу и к разведенным сывороткам добавляют комплемент и антигены. Для этого готовят смесь антигена с комплементом. Каждый антиген в определенном объеме, необходимом для постановки опыта, смешивают с равным объемом комплемента, взятого в разведении, соответствующем двум рабочим дозам. Смесь хранят в воде со льдом. Смесь комплемента с антигеном по 0,2 мл добавляют отдельными пипетками к разведенным сывороткам. Пробирки, содержащие сыворотку, комплемент и антигены, помещают в холодильник (4°) на 16—18 часов. На следующий день готовят свежую гемолитическую систему (смесь из равных объемов гемолитической сыворотки и бараньих эритроцитов), подогревают ее до 37° и разливают по 0,2 мл во все пробирки.

Пробирки встряхивают и помещают на 30 минут в водяную баню с температурой 37°. Через 30 минут учитывают результаты реакции.

В каждый опыт реакции связывания комплемента включают следующие контроли:

1) контроль антигенов с заведомо положительной и отрицательной сыворотками;

2) контроль сывороток с нормальными антигенами, произведенными по идентичной методике (незараженная тканевая культура или экстраэмбриональная жидкость нормального эмбриона);

3) контроль сывороток на антикомплементариость без антигена (первые разведения каждой сыворотки 1 : 10);

4) контроль комплемента без сыворотки с каждым антигеном.

При постановке перекрестных опытов или опытов с несколькими антигенами последние два контроля могут быть исключены, так как в этом случае возможен взаимный контроль сывороток и комплемента по отрицательным результатам, полученным с отдельными антигенами.

ОСПА СВИНЕЙ
(SWINE POX)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Оспа свиней — инфекционная контагиозная болезнь, проявляющаяся лихорадкой и пузырьково-пустулезной сыпью, появляющейся на коже и слизистых оболочках. Вызывается она или оригинальным эпителиотропным вирусом оспы свиней и вирусом оспы коров или вирусом осповакцины.

Свиньи чаще заболевают при совместном содержании их с больным крупным рогатым скотом или при использовании в корм инфицированного молока или обрата. Иногда вспышки болезни обусловлены проведением противооспенных прививок людям. В ряде случаев причиной болезни служат иммунологически самостоятельные вирусы оспы свиней. Вирус проникает в организм аэрогенным путем или через поврежденные кожу и слизистую оболочку ротовой полости.

Вспышки оспы свиней зарегистрированы в различных странах земного шара, в том числе в СССР.

Первые признаки болезни — розеолы появляются почти одновременно на некоторых участках тела, чаще на слабо покрытых щетиной (морда, уши, живот, внутренняя часть бедер). Через 2—3 дня они превращаются в папулы с красноватыми ободками. Везикулы у свиней образуются редко. Чаще микроскопически видимых пузырьков нет, а папулы превращаются в пустулы. От скопившихся лейкоцитов они становятся гнойными, темного желтовато-серого цвета с некротизирующейся тканью. Такие оспины увеличиваются в размерах. Иногда, сливаясь между собой, достигают 2,5 см в диаметре. Подсыхая, они образуют черно-коричневые корочки, которые обычно через 5—8 дней начинают отпадать, оставляя после себя небольшие быстро исчезающие белые пятна. У отдельных животных можно наблюдать напряженную, неустойчивую походку, зуд с расчесами, иногда понос. С появлением на коже оспенных поражений температура тела обычно снижается, и аппетит несколько улучшается. В период нагноения и вскрытия пустул, а также перед появлением вторичных оспин и при осложнениях оспы другими инфекциями температура тела вновь может повышаться.

Болезнь продолжается 19—30 дней, но может затягиваться до 45—60 дней, особенно при появлении вторичных оспин. При поражении большой части кожи и слизистых оболочек (сливная форма) болезнь протекает тяжелее и принимает затяжной характер. В этом случае прогноз неблагоприятный. Примерно такой же прогноз и при геморрагической форме оспы (черная форма). В остальных случаях, если нет осложнений, оспа протекает доброкачественно. Оспа чаще осложняется бронхопневмонией, паратифом, энтеритом и кокковым сепсисом. Вообще летальность при оспе, особенно при осложнениях, среди поросят-сосунов может достигать 40—80%.

Оспа у свиней, вызванная вирусом оспы коров, протекает более доброкачественно. Легко протекает оспа у свиней, зараженных вирусами осповакцины и оспы кур, причем эти вирусы проходят через свиней на протяжении обычно не более трех пассажей и поражают главным образом молодняк. Однако при часто встречающихся осложнениях тяжесть болезни усиливается, и прогноз может быть также неблагоприятным.

ВИРУС

Оригинальный вирус оспы свиней является самостоятельным видом (Zoovariola suis), относится к роду Zoovariola, семейству Borreliotaceae, порядку Strongyloplasmales и классу Ienneria. Это ДНК-содержащий вирус, размножающийся в цитоплазме эпителиальных клеток. Размеры вирионов 320×240 ммк. Белковая оболочка вирионов состоит из сети полых нитевидных структур — филаментов, имеющих диаметр около 90 Å и центральный канал — около 20 Å. Филаменты представляют спираль сферических белковых субъединиц размером около 30 Å (Е. И. Скалинский, Ю. Ф. Борисович, 1966).

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Очищенный вирус малоустойчив, он быстро разрушается ультразвуком (при 8900 циклах в секунду), прямым солнечным светом и ультрафиолетовыми лучами. При комбинированном воздействии солнечного света и нейтрального красного (10^{-7}) вирус инактивируется в течение 7 часов. Особенно губительно на вирус действуют слабые растворы йода ($1 : 10^{-4}$), 0,5%-ный раствор формалина, 3%-ный раствор едкой щелочи, 2,5%-ные растворы серной и соляной кислот. Хорошим дезинфицирующим средством является 20%-ный раствор свежегашеной извести и 3—5%-ные растворы хлорамина. К антибиотикам вирус нечувствителен.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Водный раствор глицерина (4—10%) консервирует вирус в течение 4—5 лет. Лиофилизированный вирус сохраняется жизнеспособным до трех и более лет, особенно при хранении под вакуумом при низкой температуре. Слабые (3%-ные) растворы борной кислоты и хинозола (1 : 1000) инактивирующего действия почти не оказывают.

Локализация в организме не изучена. Максимальное развитие вируса в эпителиальных клетках кожи отмечают на седьмой день после внутрикожного заражения животного. Еще до появления кожной сыпи вирус можно выделять с секретом из поражений слизистых верхних дыхательных путей. В крови его нет уже через 6 часов после внутривенного заражения.

Антигенная вариабельность. Антигенные и вирулентные варианты вируса натуральной оспы свиней пока не установлены. Вирусы натуральной оспы свиней, осповакцины, оспы коров и вариолы имеют общий антиген, выявляемый в перекрестных серологических реакциях. Однако это не свидетельствует об иммунологической идентичности этих вирусов. Натуральный вирус оспы свиней имеет односторонюю антигенную связь с вирусом осповакцины; антисыворотка против этого вируса не нейтрализует вирус натуральной оспы свиней и не обладает привентивными свойствами его.

Антигенная активность и гемагглютинирующие свойства не изучены.

Спектр патогенности. К оригинальному вирусу оспы свиней восприимчивы только свиньи. Экспериментально удается заразить свиней введением вируса внутрикожно, внутривенно, внутритрахеально, подкожно и per os (скармливание). Отмечались случаи заражения человека вирусом оспы свиней.

Культивирование. Вирус натуральной оспы свиней пассируется на восприимчивых поросятах. Размножение его в первично-трипсинизированной культуре клеток почки эмбриона свиньи удается только в первых 2—3 пассажах, далее потенция размножения его в этой системе угасает. Не удалось размножение данного вируса в развивающихся куриных эмбрионах.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагностика оспы свиней основана на обнаружении характерных клинических признаков у заболевших животных, эпизоотической обстановке неблагополучного по оспе хозяйства и результатов вирусоскопии.

ТАБЛИЦА 1

Дифференциальная диагностика оспы свиней (по Е. И. Скалинскому и Ю. Ф. Борисовичу)

Вирусы	Восприимчивость свиней	Методы заражения	Инкубационный период (в днях)	Морфология оспин	Появление вторичных оспин	Течение болезни	Длительность болезни (в днях)	Время наступления иммунитета	Культивирование вируса на хорионаллантисе куриного эмбриона	Размножение в культуре ткани
Натуральной оспы свиней	Часто и легко, преимущественно молодняк	Накожно, внутривенно	4—7 10—14	Центральная часть длительное время окаймлена черно-коричневой возвышенностью с корочками	Бывает через 15—20 дней	Медленное, с явлениями лихорадки	20—60	Через 21—22	0	Только в культуре клеток эмбриона свиньи
Осповакцины	Часто и легко, свиньи любого возраста	То же	2—3 4—5	Пузырьки со светло-коричневым возвышающимся центром	—	Быстрое, с явлениями лихорадки	9—14	Через 10—14	+	На разных видах тканевых культур
Оспы коров	Редко, свиньи любого возраста	Накожный	4—5	Обычно быстро подсыхающие пузырьки меньшей величины, чем от вируса натуральной оспы свиней	—	Обычно без лихорадки (если нет осложнений)	6—8	Через 10—14	+	То же
Оспы кур	Редко, обычно подсвинки до 6-месячного возраста	То же	4—5	Крупные, в центре с пузырьком и углублением, по краям вторичные пузырьки, в дальнейшем в центре корочка	Бывает через 15—20 дней	То же	6—8	Через 12—16	+	» »

Примечание. Свиньи оспой от овец и коз обычно не заражаются. Среди указанных вирусов перекрестный иммунитет образуется только между вирусами оспы коров и осповакцины.

Вирусоскопия. Свежую папулу протирают ватой, смоченной спиртом, срезают (лучше бритвой) и поверхностью среза делают несколько тонких мазков на предметном стекле. Мазки подсушивают на воздухе и окрашивают методом серебрения (по Морозову) (см. вирусоскопия при оспе овец).

Окончательный диагноз ставят на основании комплексных исследований с учетом всех особенностей течения болезни, указанных в таблице 1.

Серологическая идентификация вируса оспы свиней не разработана.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

У поросят поражения, напоминающие оспенную сыпь, могут быть при нарушениях обмена веществ, при некоторых инфекционных болезнях (паратиф, грипп). Но характерной для оспы стадийности при развитии этих поражений нет. Во всех сомнительных случаях следует поставить биопробу. Дифференциацию возбудителей, выделенных от больных свиней с клинической картиной оспы, проводят на основании данных, приведенных в таблице 1.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Иммунитет у поросят-реконвалесцентов бывает до 3—6 и более месяцев; у взрослых животных он более продолжителен. Ретроспективная диагностика с помощью серологических реакций не разработана.

Серологическая оценка поствакцинального иммунитета не разработана. Для профилактики натуральной оспы свиней в качестве вакцины часто применяют детрит (осповакцину), используемый в медицинской практике. Положительный эффект от такой иммунизации получается лишь в тех случаях, когда оспа свиней была вызвана вирусом оспы коров или вирусом осповакцины; в случаях натуральной оспы свиней такие прививки бесполезны. В этих случаях приходится проводить прививки натуральным вирусом оспы свиней. Материал для иммунизации берут от свиней, у которых оспа протекает без осложнений.

Оспенный детрит или натуральный вирус оспы свиней наносят на иммунизированную кожу тыльной поверхности уха или внутренней поверхности бедра. При вакцинации детритом на коже животных делают 4—5 царапин длиной 1—1,5 см. При иммунизации вирусом натуральной оспы делают не больше двух коротких царапин.

Местная реакция у привитых свиней исчезает через 13—18 дней. Помимо вакцинации, необходимо уничтожить переносчика вируса — вшей Haematopinus suis.

ЭНЗООТИЧЕСКАЯ ПНЕВМОНИЯ СВИНЕЙ
(ENZOOTICA PORCELLORUM)

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКОПЛАЗМ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

В связи с прогрессом в области лабораторной диагностики вирусных болезней животных и человека внимание исследователей все больше привлекают микоплазмы, как возможные агенты ряда нерасшифрованных заболеваний, в частности вирусной пневмонии свиней. Некоторые инфекции, ранее относимые к вирусным, имеют микоплазмозную природу (контагиозная плевропневмония коз, энзоотическая пневмония свиней, первичная атипичная пневмония человека). Микоплазмы имеют целый ряд признаков, свойственных вирусам, в связи с чем возможны различные диагностические ошибки.

Во-первых, микоплазмы, как и вирусы, вызывают остро и хронически протекающие деструктивные и пролиферативные процессы. Наряду с крупными элементами, свойственными M. gallisepticum, эти организмы существуют в виде фильтрующихся форм размером от 70 до 125 ммк. Многие виды микоплазм устойчивы к антибиотикам, широко применяемым при обработке материалов для вирусологических исследований. Некоторые виды микоплазм продуцируют гемолизин (M. pneumonia), и это свойство используется для их идентификации.

Для некоторых микоплазм характерно свойство вызывать феномен гемадсорбции в клеточных культурах с эритроцитами морской свинки. Установлено также, что патогенные микоплазмы в своем составе имеют рецепторразрушающий энзим — нейроминидазу. Наконец, микоплазмы могут вызывать деструктивные изменения в различных культурах клеток и гибель куриных эмбрионов так же, как и при инфицировании вирусами.

В связи с изложенным при диагностике вирусных инфекций животных и птиц необходимо считаться с возможностью диагностических ошибок из-за присутствия в исследуемых патологических материалах микоплазм, полученных из генитальных путей, носовой полости, гортани, легкого крупного рогатого скота, различных секретов и инкретов. Микоплазмы могут выделятся из первично-трипсинизированных клеточных культур, перевиваемых и диплоидных клеток, а также из сточных вод, почвы и навозной жижи.

На основании представленных данных можно выделить несколько групп микоплазм в зависимости от локализации патологических процессов:

1) микоплазмы — возбудители респираторных болезней животных и птиц;
2) микоплазмы, связанные с болезнями мочеполовых путей;
3) микоплазмы, изучаемые в связи с ревматоидными болезнями животных (артриты, миопатии);
4) микоплазмы, ассоциирующиеся с различными воспалительными процессами в органах и тканях (маститы, метриты, вагиниты и т. д.);
5) микоплазмы, обнаруживаемые при лейкозах и других неопластических процессах.

Кроме этих групп, микоплазмы являются возбудителями латентных инфекций куриных эмбрионов, клеточных культур и лабораторных животных, широко применяемых для диагностики вирусных инфекций. Использование контаминированных моделей в вирусологических работах приводит к загрязнению выделяемых вирусных культур и может быть не только причиной экспериментальных и диагностических ошибок, но и различных осложнений при применении лечебных и профилактических биопрепаратов.

По номенклатуре, предложенной Edward и Freundt (1956), все микоплазмы отнесены к порядку Mycoplasmatales, семейству Mycoplasmataceae и роду Mycoplasma. В группу микоплазм включены разнообразные виды патогенных, условнопатогенных и сапрофитирующих микроорганизмов, объединенных едиными морфологическими и физиологическими признаками.

Микоплазмы отличаются от бактерий, риккетсий и вирусов тем, что наряду с крупными элементами содержат фильтрующиеся формы, растут на бесклеточных средах, не имеют выраженной оболочки в связи с отсутствием мукопептидного комплекса и характеризуются резко выраженным полиморфизмом.

В качестве примера, иллюстрирующего диагностические и экспериментальные ошибки во многих странах мира по выявлению вирусной этиологии инфекционных болезней, может служить изучение вирусной пневмонии свиней, которая, по последним данным, является легочным микоплазмозом свиней.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Энзоотическая пневмония свиней [инфекционная пневмония, вирусная пневмония свиней, энзоотическая (вирусная) пневмония, легочный микоплазмоз свиней] — контагиозная хроническая болезнь поросят-сосунов и отъемышей, характеризующаяся симптомами ринита, бронхита, слабостью и последующим развитием лобарной пневмонии. Рост и развитие поросят задерживается. У молодняка откормочных групп болезнь протекает остро и хронически; ее возникновение, развитие и течение в различные сезоны года зависит от микроклимата помещений, в которых содержат животных.

Болезнь широко распространена во многих странах Европы, Азии и Северной Америки с высокоразвитым промышленным свиноводством. Установлена она и в СССР. По мнению специалистов, ущерб, наносимый свиноводству энзоотической пневмонией свиней, превышает убытки от всех других инфекционных болезней животных этого вида и обусловлен потерей племенных качеств животных, снижением продуктивности, падежом и необходимостью проведения длительных оздоровительных ветеринарно-санитарных мероприятий.

Энзоотическая пневмония свиней поражает поросят в первые недели после рождения. У животных появляются сухой кашель, вялость, ремитирующий незначительный подъем температуры (до 40,2—40,5°). Кашель особенно заметен после кратковременной прогонки животных. В последующем больные поросята отстают в росте и развитии и превращаются в «заморышей». Некоторые поросята выглядят нормально, но отстают в росте от здоровых животных. В естественных условиях инкубационный период продолжается от 2 до 4 недель, при экспериментальном заражении — от 10 до 23 дней.

Патологоанатомические изменения характеризуются поражением легких, бронхиальных и медиастинальных лимфоузлов. В легких обнаруживаются резко отграниченные участки сливово-красного цвета, характеризующиеся как серозно-катаральная интерстициальная пневмония. Наиболее часто поражаются верхушечные, сердечная доли и передний край диафрагмальных долей легких. Одним из типичных признаков служит гиперплазия медиастинальных лимфатических узлов, в результате которой они, как правило, бывают увеличены и сочны на разрезе. При хроническом течении болезни в результате воздействия секундарной микрофлоры возможны перикардит и плеврит. В других органах каких-либо специфических поражений не находят.

Изучение этиологии энзоотической пневмонии свиней представляет большой исторический интерес, так как показывает эволюцию взгляда исследователей, которые вначале исходили из вирусной природы возбудителя, а в последующем отнесли его к заболеваниям микоплазмозной этиологии. Впервые описанная в Германии Кебе и Вальдманом (1933—1935), эта болезнь была подтверждена в Англии (Беттс и Беверидж, 1950), Швеции (Весслен, Ланнек, 1954; Диттер, 1957), Болгарии (Бончев, 1958, 1962) и других странах.

Используя в качестве лабораторной модели для выделения возбудителя куриные эмбрионы, авторам удавалось культивировать инфекционный агент в желточном мешке куриного эмбриона. При окраске мазков-отпечатков желточ-

ного мешка по Макиавелло некоторые авторы обнаруживали элементарные тельца, по размеру напоминающие крупночастичный вирус в 250—350 ммк. При фильтрации через градоколовые мембраны агент проходил через поры диаметром 940 ммк и не фильтровался через поры диаметром 560 ммк. Румынские исследователи (Сородок, 1964; Сурдан с сотр., 1965) на основании морфологических, культуральных (размножение на куриных эмбрионах) и серологических исследований высказали предположение о том, что возбудитель энзоотической пневмонии сходен с агентами группы ОЛТ (орнитоз-лимфогранулема-трахома). В последующем публикации о роли вирусов в этиологии энзоотической пневмонии резко сократились.

Взгляды многих исследователей на природу возбудителя изменились после применения в опытах по выделению инфекционных агентов сред для культивирования микоплазм. Оказалось, что возбудитель, выделенный из пораженных легких и вызывающий гибель куриных эмбрионов, является микоплазмой. Так, Мор и Швитцер (1965), используя бесклеточную среду, культивировали кокковидные и палочковидные организмы из легких поросят и такими культурами воспроизводили типичную пневмонию у свиней. Высев жидкой среды с культурой на плотные среды приводил к образованию мельчайших колоний микоплазм, которые были названы Mycoplasma hyopneumoniae. Возбудитель проходил через поры фильтра диаметром 300 ммк и задерживался фильтрами, имеющими размер пор 220 ммк.

По мнению Швитцера (1967), прогресс в изучении роли микоплазм, как возбудителя энзоотической пневмонии свиней, может быть связан с подбором соответствующих питательных сред для их культивирования.

В работах Д. Ф. Осидзе и В. В. Зуева (1967—1970), посвященных изучению роли микоплазм в этиологии энзоотической пневмонии, было показано, что при комплексном исследовании пораженных легких и медиастинальных лимфатических узлов удается выделить микоплазмы при отрицательных результатах исследования на наличие вирусов. Авторы сравнительно легко выделяли микоплазмы, используя метод заражения куриных эмбрионов в желточный мешок или метод серийного пассирования в бесклеточных средах.

При последовательном пассировании инокулятов, приготовленных из легочных суспензий больных животных, гибель куриных эмбрионов, как правило, наступала во 2—4-м пассажах. При экспериментальном интраназальном заражении поросят микоплазмосодержащими суспензиями из легких или желточных мешков куриных эмбрионов первые клинические признаки болезни появлялись через 2—3 недели после введения материалов: отмечался сухой кашель, подъем температуры до 40,2—40,5° и обнаруживались изменения в верхушечных и сердечных долях легких.

Устойчивость микоплазм к физико-химическим воздействиям. Микоплазмы легко разрушаются ультразвуком. Замораживание и оттаивание в дистиллированной воде также разрушает их. Нагревание свыше 45° в течение 1—2 суток действует на них губительно. При температуре рефрижератора микоплазмы выживают в течение нескольких недель на искусственных питательных средах и несколько месяцев — в экстраэмбриональных жидкостях куриного эмбриона.

По данным Д. Ф. Осидзе и Т. М. Трапезниковой (1969), микоплазмы, выделенные от свиней, оказались чувствительными к спирамицину, тилану, тетрациклину, окситетрациклину и олеандомицину. Пенициллин, стрептомицин, полимиксин, мономицин и неомицин не оказывали влияния на рост микоплазм даже в высоких концентрациях (свыше 1000 ЕД/мл). Эфир и хлороформ инактивируют микоплазмы в течение короткого периода времени при 37°. В нативной аллантоисной жидкости микоплазмы сохраняются жизнеспособными при 20—22° в течение трех месяцев, в лиофилизованном виде — до одного года (срок наблюдения). При 2—4° и минус 20° нативный материал активен шесть месяцев, а лиофилизованный — свыше года. Добавление в качестве стабилизаторов молока (50%), пептона (3%) с глюкозой (1%) позволяет длительно сохранять активность микоплазм без снижения титра (Д. Ф. Осидзе, В. В. Зуев, 1968).

Локализация в организме, антигенная вариабельность, антигенная активность. Патогенез энзоотической пневмонии

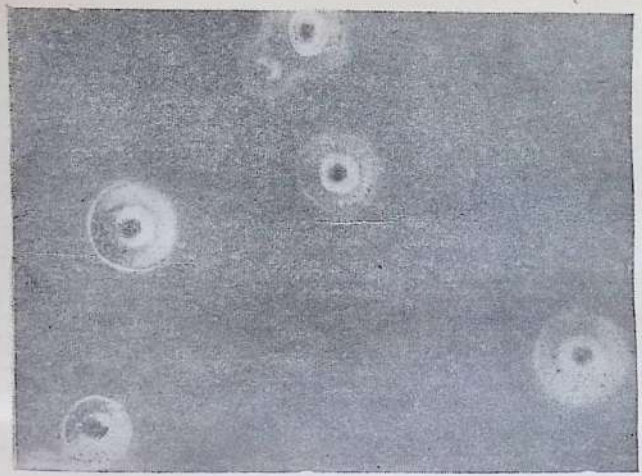


Рис. 1. Колонии микоплазм, выделенные при энзоотической пневмонии свиней (штамм Ч-66) на полутвердом агаре. Фазовоконтрастная микроскопия × 100.

свиней изучен недостаточно. Положительные результаты выделения микоплазм, как правило, были связаны с исследованием материалов, взятых из специфичных мест локализации патологического процесса: легкие, медиастинальные лимфатические узлы, носовые истечения. Однако в исследованиях Мартина, Шиммеля и др. (1968) микоплазмы выделяли из синовиальной жидкости после интраназального заражения поросят.

Микоплазмы обладают антигенной активностью, выявляемой в серологических реакциях агглютинации, преципитации, нейтрализации и связывания комплемента. Несмотря на то, что выделяемые штаммы различаются по патогенности или другим биологическим свойствам, в ряде работ установлено их антигенное сходство. Так, по данным Д. Ф. Осидзе и В. В. Зуева (1968), реакцией нейтрализации на куриных эмбрионах и реакцией агглютинации выявили общие антигенные свойства нескольких штаммов микоплазм, выделенных в различных зонах страны. В связи с тем, что микоплазмы, выделенные от свиней, обладают слабой антигенной активностью, для получения высокоактивных сывороток предложены различные методы составления антигенов и иммунизации. Чаще всего применяют депонирование антигенов (адъювант Фрейнда, добавление масел и т. д.).

Микоплазмы, выделенные от свиней, обладают выраженной гемолитической активностью и не агглютинируют эритроциты.

Спектр патогенности. В естественных условиях заболевают только свиньи. Установлена возрастная устойчивость к заражению. В экспериментальных условиях удается вызвать заболевание только у поросят до месячного возраста при интраназальной аппликации микоплазмозной культуры. Животные старшего возраста не реагируют на заражение, однако, возможно, остаются носителями микоплазм.

Лабораторные животные к заражению микоплазмами, выделенными от свиней, не восприимчивы (Д. Ф. Осидзе, В. В. Зуев, 1969). Единственными ла-

бораторными моделями являются куриные эмбрионы 5—6-дневного возраста и среды, изготовленные на основе триптического перевара сердечной мышцы или других органов с добавлением сывороток крови различных животных.

Культивирование в лабораторных условиях. Выделить микоплазмы довольно трудно, так как при обработке исследуемых материалов нужно применять антибиотики и химические вещества, подавляющие рост сопутствующей микрофлоры. Чаще всего применяют пенициллин из расчета 100 ЕД/мл (для подавления роста грамположительных бактерий) и ацетат таллия в конечном разведении 1 : 2000—1 : 4000 (для подавления роста грамотрицательной микрофлоры).

Микоплазмы успешно культивируют в курином эмбрионе при заражении в желточный мешок. После адаптации штаммов микоплазмы накапливаются также в аллантоисной жидкости и теле куриного эмбриона. В связи с этим для дальнейших пассажей можно использовать аллантоисную жидкость. Максимальное накопление микоплазм отмечено в теле куриного эмбриона (10^{-7}—10^{-8} ЭЛД$_{50}$); в аллантоисной жидкости и желточном мешке — $10^{-5,5}$—10^{-6} ЭЛД$_{50}$/мл.

При культивировании на бесклеточных средах чаще используют полужидкий (0,3%), полутвердый (1,3%) агары и бульон, приготовленные на триптическом перевare сердца крупного рогатого скота с добавлением 10—20% сыворотки лошади и 10% дрожжевого экстракта. К среде добавляют 100 ЕД/мл пенициллина, иногда 100 ЕД/мл стрептомицина. Рост микоплазм в бульоне характеризуется слабой опалесценцией; в полужидком агаре образуются округлые колонии, окруженные легкой вуалью. На полутвердом агаре микоплазмы обычно образуют нежные мелкие колонии, напоминающие под малым увеличением микроскопа яичницу-глазунью (рис. 1).

Это особенно четко выражено при наблюдении в фазово-контрастном микроскопе. При культивировании в бульоне и полужидком агаре микоплазмы накапливаются в титре 10^{-6}—10^{-7} КОЕ* (Д. Ф. Осидзе, В. В. Зуев, 1969).

Кроме того, в последнее время установлено, что для культивирования микоплазм, выделенных от свиней, с успехом используют первичные культуры клеток [illegible] поросят. При серийном пассировании на 5—7-е сут[illegible]ические изменения, характеризующиеся круглоклеточной [illegible]ованием окон в монослое (рис. 2, *а*, *б*) (Д. Ф. Осидзе,

[illegible] ДИАГНОСТИКА

[illegible] основана на выделении и идентификации возбуди[illegible]огических исследованиях.

Д[illegible]ления возбудителя чаще применяют куриные эмбрионы и бесклеточные среды. Для этого используют пораженные участки легких, из которых готовят 10%-ную суспензию на фосфатно-буферном физиологическом растворе, pH 7,2, с добавлением 250—500 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина. После контакта при 4° в течение 12—18 часов делают высевы на обычные бактериологические среды и заражают куриные эмбрионы в желточный мешок (0,2 мл) или вносят в пробирки с полужидким агаром (0,5—1 мл). Овоскопию куриных эмбрионов ведут в течение 7 суток. Если эмбрионы не погибают, делают еще 3—4 слепых серийных пассажа.

Пересевы в полужидком агаре также ведут через семь суток. В случае образования мелких взвешенных колоний делают высев на полутвердый агар. Через 4—7 суток на агаре вырастают характерные мелкие колонии, описанные выше. При заражении культур

* Колоний образующих единиц.

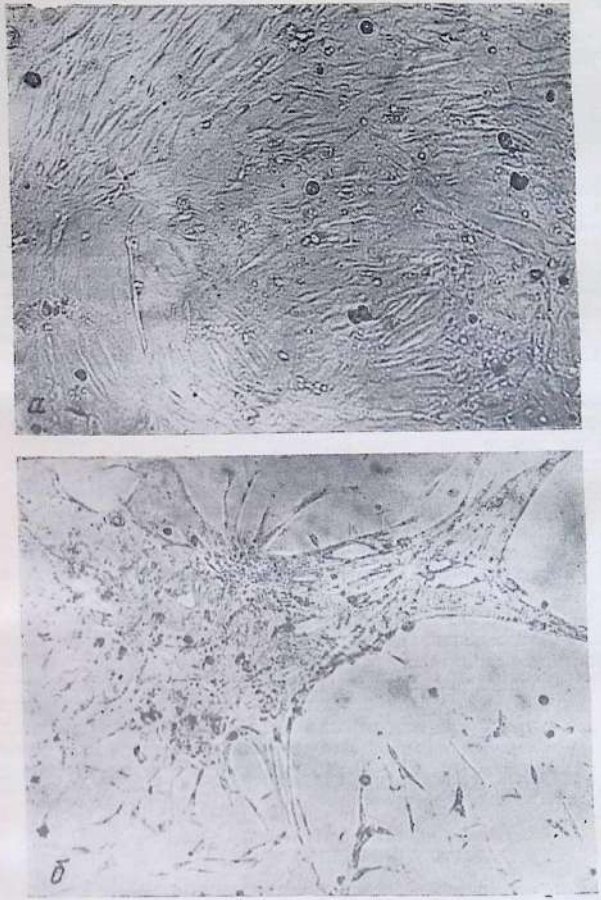


Рис. 2. Цитопатогенное действие микоплазмы (штамм Ч-6е), выделенной при энзоотической пневмонии свиней в культуре клеток куриных эмбрионов:

а — нормальная культура; *б* — инфицированная культура на 5-й день после заражения. ×100.

клеток куриных эмбрионов и почек поросят серийные пассажи проводят через 6—7 суток, отмечая появление цитопатических изменений.

Для исключения возбудителей гриппа, аденовирусов и представителей группы орнитоза-лимфогранулемы-трахомы используют методы выделения этих возбудителей (заражение куриных эмбрионов в аллантоисную полость, белых мышей интраназально и интрацеребрально, культивирование в клетках Нер-2 и т. д.).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ

Для идентификации микоплазм проводят морфологические, биохимические и серологические исследования. Имея характерную морфологию колоний на полутвердом агаре, микоплазмы, выделенные от свиней, не обладают ферментативной активностью в отношении сахарозы, мальтозы, глюкозы и лактозы при добавлении в качестве индикатора бромтимолблау.

Используя реакцию нейтрализации на куриных эмбрионах с эталонной сывороткой при индексе нейтрализации 1 : 100 и выше, а также реакцию агглютинации от 1 : 8, можно идентифицировать выделенные микоплазмы.

Для исключения возбудителей, относящихся к группе ОЛТ, исследуют мазки-отпечатки после окраски по Романовскому—Гимза или Маккиавелло, а также используя метод люминесцентной микроскопии при окраске акридин-оранжем клеточных культур, зараженных исследуемым инокулятом. При обнаружении характерных включений красного, золотисто-зеленого и зеленого цвета в цитоплазме клеток проводят исследования на наличие этого возбудителя (постановка прямой и непрямой РСК, реакции нейтрализации, заражение чувствительных лабораторных моделей).

Для ретроспективной диагностики исследуют сыворотки переболевших животных в реакциях агглютинации и нейтрализации. Установлено, что у животных после экспериментального заражения в крови появляются антитела, агглютинирующие корпускулярный антиген микоплазм. Наиболее четко реакция выражена у тех животных, у которых имеются поражения в легких. Титр антител в РА 1 : 8—1 : 16 можно считать диагностическим. Антитела обычно обнаруживают через 3—4 недели после заражения.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Чтобы исключить болезни, клинически сходные с болезнями респираторных путей, нужно исследовать материалы на наличие вирусов гриппа, аденовирусов, возбудителей из группы ОЛТ, вируса болезни Ауески.

Вирус гриппа свиней может агглютинировать эритроциты крови кур, морских свинок, мышей, человека и т. д. Используя эталонные сыворотки, он может быть идентифицирован при помощи

реакции торможения гемагглютинации. Вирус гриппа вызывает характерные изменения в легких белых мышей при интраназальном инфицировании. При окраске срезов легких, мазков-отпечатков по Пигаревскому или Павловскому в цитоплазме клеток устанавливают специфические включения.

Аденовирусы активно размножаются в культуре клеток Нер-2, и при цитологическом исследовании можно установить внутриядерные включения. Используя эталонные сыворотки, применяя РСК, проводят их идентификацию.

Возбудителей из группы ОЛТ исключают микроскопией материалов, интрацеребральным заражением белых мышей, куриных эмбрионов в желточный мешок и последующей микроскопией мазков-отпечатков из этого материала, а также в РСК и НРСК с орнитозной антисывороткой.

Вирус болезни Ауески идентифицируют заражением кроликов и в реакции нейтрализации в культуре клеток куриных эмбрионов с гамма-глобулином.

КАТАРАЛЬНАЯ ЛИХОРАДКА ОВЕЦ
(MALARIAL CATARRHAL FEVER OF SHEEP)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Катаральная лихорадка овец (блютанг — синий язык) — вирусная болезнь, передающаяся насекомыми. Протекает остро и подостро у овец и реже наблюдается у крупного рогатого скота.

Заболевание распространено в Африке, особенно в Восточной, Юго-Западной и Центральной. Несколько позже оно появилось на Кипре, в Палестине, Сирии, Израиле, Турции, Испании, Португалии, в Пакистане. В 1962—1969 гг. в Индии, Перу, Чили, Японии зарегистрирована вспышка блютангоподобного заболевания среди крупного рогатого скота. Выделенный агент обладал биологическими свойствами вируса блютанга, но в антигенном отношении оказался отличным от стандартного американского штамма. В США болезнь впервые зарегистрирована в 1948 г. в южных и западных штатах, а в 1952 г. был выделен и идентифицирован вирус. Распространению болезни способствуют мокрецы из рода Culicoides variipennis, у которых вирус накапливается в высоких титрах. Заражение контактным путем не зарегистрировано ни в естественных, ни в экспериментальных условиях.

Клинические признаки болезни у овец характеризуются повышением температуры тела (40,5—42,2°), лейкопенией, повышенной соливацией (влажный рот), гиперемией и воспалением слизистых оболочек, опуханием и отеком морды, губ, языка, глотки, заглоточного пространства, области шеи. После гиперемии и отека слизистых очень часто выпотевает серозно-кровянистый экссудат. В некоторых случаях на слизистых оболочках ротовой и носовой полостей появляются изъязвления разной формы и величины. Интенсивный отек и опухание глотки служат причиной аспирации кормовых масс, что вызывает аспирационную пневмонию, обусловливающую гибель животных. В некоторых случаях возникают энтериты, сопровождающиеся диареей. У беременных животных возможны аборты. Воспаление венчика и чувствительных тканей копыт вызывает у животных хромоту, а после выздоровления на копыте остается характерная полоска, свидетельствующая о перенесенной болезни. Как правило, наблюдаются дегенеративные изменения скелетной мускулатуры, сопровождающиеся крайним истощением, медленным выздоровлением и потерей продуктивности.

Симптомы болезни различны по интенсивности и зависят от вовлечения в болезненный процесс тканей и органов.

У крупного рогатого скота в эпизоотических зонах болезнь протекает, как правило, бессимптомно. Однако нередко наблюдали тяжело протекающее воспаление венчика копыт, опухание и изъязвление языка и губ, воспаление морды и истечения из носовой полости серозно-гнойного экссудата.

При вскрытии павших животных обнаруживают поражения, соответствующие симптомам болезни (гиперемия, цианоз, отек и множественные геморрагии на слизистой рта, слущивание поверхностного эпителия, эрозии и некрозы слизистых оболочек, иногда гангрена языка). Под кожей в области шеи, лопаток и спины встречаются красноватые желатинозные участки, многочисленные геморрагии в тонком отделе кишечника, миокарде, эпикарде, иногда бывают гидроперикардит, гиперемия и отек легких. Степень выраженности патологоанатомических изменений мало связана со степенью температурной реакции.

ВИРУС

Возбудитель катаральной лихорадки овец — неклассифицированный РНК-содержащий вирус, структура которого в настоящее время недостаточно изучена. По данным Овент и Мунц (1966), вирусная частица представляет икосаэдр, содержащий 92 капсомера с диаметром капсиды 60 ммк и наличием суперкапсидной оболочки. Диаметр «упакованных» в оболочку частиц — 100 ммк. Студдерт и сотрудники (1966) установили, что вирус не имеет оболочки, и высказали предположение, что он относится к группе реовирусов. По их данным диаметр вирионов данного возбудителя 53,8±1,6 ммк; они имеют один слой, состоящий из 32 капсомеров, расположенных в симметрии 5 : 3 : 2. Геном этого вируса представлен двунитчатой РНК.

Устойчивость к физико-химическим факторам. Вирус устойчив к ацетону, эфиру, хлороформу, дезоксихолату натрия, солям желчной кислоты, но чувствителен к трипсину. В крови вирус выдерживает высушивание на воздухе и не инактивируется в гниющем материале; сравнительно быстро обезвреживается 3%-ным NaOH и 70%-ным этиловым спиртом. Вирус инактивируется нагреванием при 60° в течение 30 минут. Быстрое глубокое замораживание вируссодержащей культуральной жидкости, а также хранение ее без стабилизаторов при минус 20° приводит к утрате ее инфекционности. В инфицированном мясе вирус разрушается при изменении среды pH 5,6—6,3.

На основании ряда признаков — содержания РНК, чувствительности белых мышей к интрацеребральному заражению и биологической трансмиссивности — данный вирус отнесен к группе арбовирусов. Однако ни с одним из представителей этой группы возбудитель катаральной лихорадки овец не имеет антигенного родства и по ряду признаков существенно отличается от них. Некоторые исследователи считают, что этот вирус, подобно вирусу африканской чумы лошадей, по морфологическим и другим свойствам близок к реовирусам.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Вируссодержащий материал лучше консервировать жидкостью Эдингтона*. В цитрированной крови при 4° он сохраняет инфекционность в течение ряда лет. Вирус более устойчив в щелочной среде, чем в кислой. При pH ниже 6,0 и температуре 37° он инактивируется в течение 1 минуты. Оптимальный pH при хранении этого вируса — 7,2—7,4. Вируссодержащую культуральную жидкость и суспензию тканей лучше хранить при минус 70°, а лиофилизированный со стабилизаторами вирус хранят при минус 20°.

Локализация в организме. У инфицированных овец, крупного рогатого скота, коз вирус катаральной лихорадки обнаруживают в крови, сыворотке, плазме, селезенке, лимфатических узлах, печени. Инфекционность сыворотки почти такая же, как и цельной крови; по-видимому, вирус циркулирует в крови, не адсорбируясь на эритроцитах. У беременных овец и крупного рогатого скота вирус выделяют из крови плода.

Антигенная вариабельность. В опытах перекрестного заражения на овцах, а в последующем in vitro в реакции нейтрализации установлена антигенная множественность вируса. В настоящее время идентифицировано 18 иммунологически различных типов вируса. Однако все типы вируса катаральной лихорадки овец обладают общим комплементсвязывающим антигеном.

Спектр патогенности. К вирусу катаральной лихорадки чувствительны овцы, особенно европейских пород. Наиболее чувствительны молодые животные. В естественных условиях восприимчивы крупный рогатый скот, козы, антилопы, олени (молодые олени в экспериментальных условиях заболевают с летальным исходом), снежные бараны.

Из лабораторных животных чувствительны мышата-сосунки и новорожденные хомячки при интрацеребральном заражении, куриные эмбрионы, первичные культуры клеток почки ягненка, почки овцы, почки эмбриона крупного рогатого скота, телят, некоторые перевиваемые линии клеток ВНК-21, перевиваемые клетки эмбриона человека и др.

* Состав жидкости Эдингтона: 500 мл глицерина, 5 г щавелевой кислоты, 5 г карболовой кислоты и 500 мл дистиллированной воды.

Культивирование вируса в лабораторных условиях удается сравнительно легко на новорожденных мышах и хомяках-сосунках (при интрацеребральном заражении), куриных эмбрионах (при заражении в желток на хорионаллантоисную оболочку и внутривенно) и в культуре клеток почки овцы, ягненка, эмбриона крупного рогатого скота и перевиваемых клетках ВНК.

Предварительное пассирование вируса на куриных эмбрионах облегчает адаптацию его к культурам клеток, к организму мышей и хомячков.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Основными методами лабораторной диагностики катаральной лихорадки овец являются: выделение вируса, идентификация его, исследование сыворотки переболевших животных в РСК и РН. Для быстрой ориентировочной диагностики используют метод флуоресцирующих антител. В сомнительных случаях, когда выделить вирус или обнаружить антитела не удается, исследуемым материалом заражают овец. Если концентрация вируса в исследуемом материале низкая, необходимо проведение 2—3 последовательных пассажей на овцах.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материала. Источником вируса служит кровь, взятая в гепарин, цитрат или жидкость Эдингтона. Кровь берут от животных в первые 10 дней после заражения, лучше на высоте лихорадки — на 6—8-й день. Кровь, полученную после 10-го дня, исследуют в РСК на наличие антител. Кроме того, вирус можно выделить из селезенки и лимфатических узлов животного, павшего или убитого во время лихорадки.

Кровь, помещенную в раствор гепарина, можно использовать в неразведенном состоянии; кровь цитрированную или в смеси с жидкостью Эдингтона разводят в соотношении 1 : 5—1 : 10 фосфатным буфером или средой для культивирования клеток (pH 7,2—7,4). Ткани селезенки и лимфатических узлов гомогенизируют или обрабатывают ультразвуком, разводят 0,5%-ным гидролизатом лактальбумина на растворе Хенкса или фосфатным буфером в соотношении 1 : 10 — 1 : 20, центрифугируют при 2000 об/мин 15 минут и для заражения культуры ткани и куриных эмбрионов используют надосадочную жидкость.

Заражение животных, куриных эмбрионов, культуры ткани. Как правило, вирус не выделяется в первом пассаже на культуре клеток или куриных эмбрионах, зараженных в желточный мешок. Нужно сделать 2—4 слепых пассажа, зараженных в желточный мешок, прежде чем вирус начнет вызывать цитопатические изменения в культуре клеток или 100%-ную гибель куриных эмбрионов. Температура инкубации зараженных куриных эмбрионов оказывает большое влияние на размножение вируса. Оптимальной температурой для накопления вируса в эмбрионе является 33,5°. Эмбрионы 6—8-дневного возраста заражают в желточный мешок в дозе 0,2—0,3 мл вирус-

содержащей суспензии. Эмбрионы, погибшие в течение первых трех дней после заражения, не учитывают и из опыта исключают. Специфическая гибель их от вируса обычно происходит между 4 и 8-м днем после заражения. Погибшие зародыши обычно вишнево-красного цвета, имеют множественные кровоизлияния.

Вирус удается выделить также путем интравенозного заражения эмбрионов 11—13-дневного возраста. При этом методе заражения большинство эмбрионов погибает на 3—4-й день. Этот метод наиболее чувствителен, он позволяет выделить вирус уже в первом пассаже *.

В первом пассаже материал от всех проб одновременно инокулируют эмбрионом в желточный мешок (по 0,2 мл) и внутривенно (по 0,1 мл). Инфицированные эмбрионы просматривают ежедневно в течение 7 дней. Эмбрионы, погибшие в первые 24 часа, из опыта исключают, а погибшие в период 2—7 дней,— собирают, измельчают в блендоре, центрифугируют при 1600 об/мин 15 минут; надосадочную жидкость используют для следующего пассажа и реакции нейтрализации.

Для второго пассажа при заражении в желточный мешок эмбриональную суспензию разводят 1 : 5 и инокулируют в объеме 0,2 мл. При интравенозном заражении эмбриональную суспензию разводят 1 : 1000.

Имеется сообщение, что не адаптированный к куриным эмбрионам или культуре клеток вирус катаральной лихорадки овец можно выделить в культуре клеток ВНК при использовании среды культивирования, содержащей лошадиную сыворотку. Некоторые серии сыворотки телят оказывают тормозящее действие на развитие вируса в культуре клеток ВНК и почки ягненка. Культуру клеток заражают после сформирования монослоя. Поддерживающей средой служит 0,5%-ный гидролизат лактальбумина на растворе Хэнкса pH 7,2—7,4. В процессе титрования или постановки реакции нейтрализации нужно подщелачивать закисляющуюся среду или менять ее. Адсорбция вируса при 37° происходит быстро (в течение 15 минут). Первые цитопатические изменения можно наблюдать уже через 24 часа. Через 72—96 часов клетки разрушаются полностью.

Если вирус не удается выделить заражением куриных эмбрионов или культуры клеток, то испытуемым материалом заражают

* В параллельных опытах Фастера и Лудке (1968) по выделению вируса блютанга на куриных эмбрионах, зараженных в желточный мешок и внутривенно, авторы показали превосходство второго метода заражения. Наивысший титр вируса при интравенозном заражении составлял $10^{5,0}$ ELD_{50}/0,1 мл, а при заражении в желточный мешок не превышал $10^{1,7}$ ELD_{50}/0,1 мл.

При сравнительном титровании на эмбрионах вируса первого эмбрионального пассажа титр его при внутривенной инокуляции эмбрионов был выше на 3 lg титра, который определялся при заражении в желток.

При внутривенной инокуляции вируса уже в первом пассаже наблюдается 100%-ная гибель эмбрионов. При этом методе заражения для выделения и титрования вируса требуется 10 дней, тогда как при инокуляции в желточный мешок — не менее 7—8 недель.

овец как наиболее чувствительную модель. Иногда требуется про
вести 2—3 серийных пассажа на овцах, прежде чем будет воспро
изведена типичная клиническая картина болезни.

Экспериментальная инфекция у животных. К вирусу катаральной лихорадки овец чувствительны мыши-со
сунки в возрасте до 10—12 дней только при интрацеребральном
заражении. Наиболее чувствительны мышата 1—4-дневного воз
раста. В их мозгу вирус накапливается в высоких титрах — до
8,0—9,0 lg. У взрослых мышей развивается инаппарантная инфек
ция при низких титрах вируса в мозговой ткани. Серийное пасси
рование вируса при интрацеребральном заражении взрослых
мышей не ведет к усилению его для этих животных. Вирус вызы
вает 100%-ную гибель мышей-сосунков через 3—5 серийных пас
сажей; адаптация вируса к ним проходит быстрее после предвари
тельного культивирования вируса в куриных эмбрионах. Симптомы
болезни обычно проявляются уже через 36 часов после заражения:
мышата прекращают принимать корм, покидают помет, рассеи
ваясь по клетке. Вначале они становятся малоподвижными, одна
ко, при воздействии на них каких-либо раздражителей у них на
ступает бурное скоропроходящее возбуждение. За 6—12 часов до
гибели они лежат в коматозном состоянии.

Овец заражают внутривенно, подкожно, интрадермально, а
также при кормлении на них инфицированных насекомых. Мате
риалом для заражения служат вируссодержащая кровь, суспен
зии селезенки, лимфатических узлов (мезентериальных) и крово
сосущих насекомых. Симптомы болезни при экспериментальном
заражении овец варьируют. У одних животных наблюдают легко
протекающую лихорадку, слабую гиперемию и незначительное
опухание слизистых оболочек; у других болезнь протекает тяжело
и оканчивается гибелью животных.

Вирус, введенный интравенозно, подкожно, интраназально, на
скарифицированную слизистую оболочку ротовой полости, не вы
зывает у крупного рогатого скота клинических проявлений болезни.
Только в некоторых случаях удавалось вызвать кратковременное
повышение температуры тела, потерю аппетита, лейкопению.
В экспериментальных условиях вызвать клиническую картину бо
лезни у крупного рогатого скота, подобную естественным случаям,
не удается.

Адаптированные к мозгу мышей или куриным эмбрионам
штаммы вируса вызывают гибель новорожденных хомячков при
интрацеребральном заражении.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Цитологические исследования. В цитоплазме инфицированных
леток культуры (первичная культура клеток почки ягненка, пере
иваемая культура синовиальных клеток) через 25—28 часов по
ле заражения обнаруживают тельца-включения, которые окраши-

ваются в красный цвет акридиновым оранжевым. Указанные включения окрашиваются по Браше и флуоресцируют при окраске специфическим к вирусу конъюгатом сыворотки.

Серологическая идентификация выделенного вируса осуществляется при помощи РСК и РН. На 21-й день после заражения у животных исследуют сыворотку на присутствие комплементсвязывающих или вируснейтрализующих антител. Идентификацию вируса, выделенного на куриных эмбрионах или культуре ткани, проводят при помощи РН.

Реакция нейтрализации. Данную реакцию проводят в культуре клеток и куриных эмбрионах. Сыворотки инактивируют при 56° в течение 30 минут. Реакцию ставят общепринятым методом. Контакт испытуемого вируса (в десятикратных разведениях) с цельной иммунной сывороткой проводят при 37° в течение $1^1/_2$—2 часов *.

Реакция связывания комплемента — это группоспецифическая реакция, служит для диагностики катаральной лихорадки овец, дифференциации вируса от других возбудителей и обнаружения антител при ретроспективной диагностике. При катаральной лихорадке овец РСК — это групповая специфическая реакция с антигеном, приготовленным из одного штамма вируса. Отдельные серотипы этого вируса при помощи данной реакции не дифференцируются, так как все штаммы его обладают общим комплементсвязывающим антигеном.

Для постановки данной реакции требуется шесть компонентов: *сыворотка овец* — испытуемая, заведомо отрицательная и стандартная положительная. Сыворотки разводят физиологическим раствором в соотношении 1 : 4 и инактивируют в водяной бане при 60° 30 минут; *стандартные антигены (мозговые)* — специфический (содержащий инфекционный вирус) и нормальный;

комплемент — биофабричного производства;

гемолизин — биофабричного производства;

эритроциты барана — 2%-ная взвесь (от осадка) на физиологическом растворе;

0,85%-ный раствор NaCl.

Специфический антиген готовят из мозговой ткани мышей-сосунков, зараженных одним из адаптированных штаммов. Инфицированных интрацеребрально мышат при появлении симптомов болезни отсаживают и содержат отдельно от самок до гибели (в течение 6—12 часов). Павших животных и находящихся в агональном состоянии помещают в холодильник при 2—4°. Антиген

* Для постановки реакции нейтрализации на куриных эмбрионах смешивают в равных объемах десятикратные разведения вируса с неразведенной иммунной сывороткой овцы-реконвалесцента. В качестве контроля используют нормальную сыворотку овцы. После выдерживания смесей в течение 1 часа при комнатной температуре и 1 час при 4° их инокулируют внутривенно 6—8 эмбрионам каждого разведения вируса. Реакцию нейтрализации ставят с суспензией вируса, приготовленной из эмбрионов первого внутривенного пассажа, собранных на третий день после инокуляции их полевым материалом.

готовят на холоде. Для этого ацетон и эфир перед употреблением охлаждают до минус 15—20°, к гомогенату мозга добавляют охлажденный ацетон из расчета 20 объемов его на 1 г мозга и помещают на 5 минут на холод. Затем гомогенат центрифугируют 5 минут при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость сливают и к осадку добавляют свежий ацетон в количестве, равном первоначальному. Осадок суспендируют энергичным встряхиванием и помещают на 20 минут на холод, периодически встряхивая. Затем вновь центрифугируют и экстракцию повторяют 3 раза по 20 минут каждую: первую — смесью равных частей ацетона и эфира и две последующие — одним эфиром. После третьей экстракции надосадочный эфир сливают, а остатки его удаляют высушиванием под вакуумом. Высушенный материал представляет собой розовато-белую порошкообразную массу. Для получения антигена указанную массу экстрагируют физиологическим раствором, добавляя его из расчета 2 мл на 1 г сырого мозга, взятого в опыт ацетоно-эфирной экстракции. Смесь сухого материала с физраствором встряхивают и помещают на холод на 18—20 часов. Затем суспензию центрифугируют при 10 000 об/мин в течение 1 часа. Надосадочная жидкость представляет антиген, который разливают по ампулам, лиофильно высушивают и хранят при 2—4°. Такой препарат сохраняет стабильность не менее двух лет. Перед использованием сухой антиген разводят физиологическим раствором до объема, указанного на этикетке, и оставляют в холодильнике (2—4°) на 18—24 часа. Перед употреблением его центрифугируют 15—20 минут при 3000 об/мин.

Аналогичным образом готовят и нормальный антиген из мозга здоровых мышей (для использования его в качестве контроля в РСК).

Титрование гемолизина проводят по общепринятой методике. Для реакции берут гемолизин в рабочем (четырехкратном) титре, смешивают его с равным объемом 2%-ной взвеси эритроцитов и используют в реакции.

Для титрования комплемента готовят ряд разведений его с коэффициентом 1,2.

Титром комплемента считается наименьшее его количество, дающее полный гемолиз.

В главный опыт берут две единицы комплемента (согласно схеме Смородинцева), т. е. разведение, соответствующее четвертой пробирке влево от последней пробирки с полным гемолизом.

Полученный вышеуказанным методом антиген проверяют на активность и специфичность со стандартной позитивной сывороткой к вирусу катаральной лихорадки овец и с нормальной сывороткой. Перед постановкой реакции антиген в ампуле разводят физиологическим раствором до объема, указанного на этикетке, и оставляют на 18—24 часа при 2—4°.

Титром антигена считают наименьшее его количество, дающее с позитивной сывороткой полную задержку гемолиза.

Титрование стандартной положительной сыворотки на активность и специфичность проводят со специфическим и нормальным стандартными антигенами.

Титром сыворотки считают то наивысшее разведение ее, которое со специфическим антигеном дает полную задержку гемолиза (++). Сыворотка, пригодная для работы, должна быть специфичной, т. е. не давать реакции с нормальным антигеном, обладать титром не ниже чем в разведении 1 : 64 и не обладать самозадерживающими свойствами в контролях.

Определение антител у животных-реконвалесцентов в реакции связывания комплемента. Реакцию ставят в объеме 0,5 мл. Каждую исследуемую и контрольную сыворотки разливают в пробирки трех рядов по 0,1 мл. В пробирки первого ряда добавляют по 0,1 мл специфического антигена, в пробирку второго ряда — 0,1 мл нормального антигена и в пробирки третьего ряда — по 0,1 мл физиологического раствора, после чего во все пробирки добавляют по 0,1 мл рабочего разведения комплемента. Для контроля, кроме сыворотки здорового животного, в главный опыт вводят стандартную иммунную сыворотку, содержащую специфические комплементфиксирующие антитела. После того как перечисленные ингредиенты разлиты, пробирки встряхивают и помещают на холод при 2—4° на 18—20 часов. Затем в каждую пробирку добавляют по 0,2 мл гемолитической системы, которую готовят смешиванием равных объемов гемолитической сыворотки в учетверенном титре и 2%-ной взвеси эритроцитов барана. Эту смесь перед добавлением в реакцию выдерживают при 37° 15—20 минут. После добавления гемолитической системы пробирки помещают в водяную баню при 37° и выдерживают до наступления полного гемолиза в контрольных пробирках обычно 30—45 минут. После этого учитывают результаты.

Диагностическим титром исследуемых сывороток считается разведение их начиная с 1 : 8.

Реакция диффузионной преципитации. Данную реакцию используют или для обнаружения специфических антител у реконвалесцентов (с заведомо известным антигеном), или, наоборот, для идентификации вируса с известной преципитирующей сывороткой. В крови реконвалесцентов почти одновременно с вируснейтрализующими появляются и преципитирующие антитела. В качестве антигена в РДП используют вирус, размноженный на куриных эмбрионах, культуре клеток, мозгу мышей-сосунков. Концентрация агара Дифко 1,25% в 0,9%-ном растворе NaCl, pH 7,2—7,4, инкубирование во влажной камере при 37° С. Стандартная методика РДП при катаральной лихорадке овец не разработана.

Метод флуоресцирующих антител позволяет обнаружить групповой антиген данного вируса в зараженной исследуемым материалом культуре клеток. В клетках БЭП специфический антиген обнаруживают даже при отсутствии видимых цитопатических изменений.

Полученные специфических гамма-глобулинов из сыворотки овцы производят высаливанием сульфатом аммония общепринятым методом. Сыворотку для этой цели используют с титром комплементсвязывающих антител не ниже чем 1 : 160. Ее получают от овец через 30—45 дней после подкожного или внутривенного заражения вирулентным штаммом вируса. Метод иммунофлуоресценции позволяет ускорить диагноз, если культуру клеток заражают испытуемой кровью, взятой от больных овец в период лихорадки. Часто в таких культурах специфический антиген обнаруживают уже в первом пассаже, когда цитопатические изменения, как правило, не развиваются.

Непрямой метод иммунофлуоресценции применяют для выявления антител к вирусу катаральной лихорадки овец с 6—11-го дня после заражения.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Дифференциальная диагностика основана на учете клинических симптомов, эпизоотологических данных (сезон года, наличие переносчиков, ввод новых животных), патологоанатомических изменений и наличия у переболевших животных характерных валиков на стенке копыт, свидетельствующих о перенесенном пододерматите.

При дифференциальной диагностике необходимо учитывать гидроперикардит, клещевой энцефалит, ящур, контагиозную эктиму, везикулярный стоматит, грибковые стоматиты, инфекционный ринотрахеит и чуму крупного рогатого скота. Окончательный диагноз основывается на результатах выделения вируса, идентификации его в серологических реакциях, заражении чувствительных овец и исследовании сывороток у реконвалесцентов в РСК и РН.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ретроспективная диагностика проводится при помощи РСК, РН, РДП и непрямого метода иммунофлуоресценции. Преимуществом среди этих методов пользуется РСК, так как антиген, соответствующий одному типу вируса, может с успехом использоваться с сыворотками реконвалесцентов, инфицированных различными серотипами. Комплементсвязывающие антитела обнаруживают на 12—15-й день после заражения в титрах 1 : 4—1 : 16. К 30-му дню титр антител достигает пика — обычно 1 : 160—1 : 256. О сроках сохранения комплементсвязывающих антител в сыворотках переболевших овец сведений мало. Эти антитела обнаруживали на 189-й день (1 : 160) и 322-й день (1 : 10—1 : 20) после заражения.

Применение РН с этой целью ограничено, поскольку она происходит только с гомологичным штаммом. Исследователь должен иметь в своем распоряжении все антигенные серотипы штаммов, адаптированных к одной из указанных систем. У реконвалесцентов титр вируснейтрализующих антител может быть невысоким (1 : 16—1 : 64), но такие сыворотки в неразведенном состоянии нейтрализуют $10^{5,5}$—$10^{6,0}$ $ТЦД_{50}$/мл гомологичного вируса. Нейтрализующие антитела появляются на 9-й день после заражения; к 30-му дню титр их достигает максимума и держится на уровне до 12 месяцев после переболевания

животных. В экспериментальных условиях индекс нейтрализующих антител у овец на 16-й день после заражения составляет 1,5—2,5 lg, достигает максимума к 30-му дню — 3,5 lg и держится на этом уровне в течение 10 месяцев, постепенно снижаясь к концу года до 1—1,5 lg (Пини, 1968).

Непрямой метод флуоресценции используют для выявления специфических антител к вирусу катаральной лихорадки овец. Для реакции нейтрализации и флуоресцирующих антител сыворотки первый раз можно получать на 6—9-й день после заражения (Пини, 1968), затем на 21—30-й день (Хоувелл, 1963). Сыворотки сохраняют в замороженном или лиофилизированном состоянии при минус 20°. Титр их удерживается без изменения 2—3 года (Казалс, 1950).

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

В Южно-Африканской Республике в неблагополучных зонах применяют четырехвалентную вакцину (Людке и Яхим, 1968). Кроме того, в той же стране готовят поливалентную вакцину, содержащую 14 иммунологически различных типов вируса (Нейтц, 1966). При изготовлении поливалентных вакцин необходимо учитывать интерференцию между отдельными типами вируса, цикл роста каждого из них, дозу, используемую для заражения куриных эмбрионов, и другие условия (Хоувелл, 1963).

В США готовят два типа коммерческих вакцин: живую эмбриональную вирусвакцину и живую культуральную (из вируса, вначале аттенуированного пассажами на куриных эмбрионах и размноженного в культуре клеток почки эмбриона крупного рогатого скота или почки ягненка) (Кемени, 1961). Обе вакцины содержат два иммунологически идентичных штамма — ВГ-8 и ВГ-11 (Кемени, 1961; Боун и Лудке, 1967).

Поствакцинальный иммунитет к гомологичному типу вируса сохраняется до одного года (Нейтц, 1966). Установлено, что у вакцинированных овец наблюдается виремия, и насекомые Culicoides variipennis, питавшиеся на этих животных, могут передавать тяжелую инфекцию неиммунным животным (Фостер, Джонс и Лудке, 1968). Множественность иммунологических типов вируса, наряду с тем фактом, что вакцинированные животные могут инфицировать насекомых-переносчиков, которые затем заражают чувствительных овец, является серьезным препятствием к использованию живых вакцин в благополучных зонах (Боун, Лудке и Яхим, 1967; Александер, Хоувелл, 1966).

Если у реконвалесцентов создается продолжительный и напряженный иммунитет к гомологичному типу вируса и это проявляется прямой корреляцией между титром антител и устойчивостью к заражению (Хоувелл, 1966), то у вакцинированных животных такой зависимости не установлено. Индекс нейтрализации у овец, привитых эмбриональной вирусвакциной, колеблется от 0 до 4,5 lg (средний показатель 3,6 lg); у овец, вакцинированных культуральной вакциной,— от 0 до 3,1 lg (среднее 2,0 lg) (Лудке, Яхим, 1968). Поэтому серологическое подтверждение иммунного статуса вакцинированных животных получить трудно из-за низкого титра или отсутствия антител.

Меры борьбы. При организации мероприятий по предупреждению заноса в благополучную страну катаральной лихорадки овец необходимо учитывать носительство вируса в неблагополучных странах овцами, козами, крупным рогатым скотом, зебу, буйволами и другими жвачными и способность мокрецов из семейства Culicoides передавать вирус при кровососании, особенно если насекомые попадают в самолеты и транспортируются в другую страну. Исходя из этого экспортировать домашних и диких жвачных из эпизоотических районов нужно под строгим ветеринарным контролем: у животных необходимо исследовать вируснейтрализующие и комплементсвязывающие антитела, проводить выделение вируса из крови путем заражения чувствительных овец (2—3 пассажа на овцах в случае невысокого содержания вируса в крови исследуемых животных). В портах назначения животных необходимо содержать в помещениях, свободных от насекомых.

Продукты животных, такие, как мясо, кожа, шкуры, мех, шерсть, волосы, копыта, кости не служат источником распространения вируса.

ЛИХОРАДКА ДОЛИНЫ РИФТ
(RIFT VALLEY FEVER)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Лихорадка долины Рифт (эпизоотический гепатит) — преимущественно остро протекающая инфекционная болезнь мелкого и крупного рогатого скота, характеризующаяся коротким инкубационным периодом, высокой лихорадкой, развитием негнойного некротического гепатита, геморрагического диатеза и гастроэнтерита, а также абортами; среди ягнят и телят отмечается высокая смертность.

Это зоонозная трансмиссивная инфекция, передается главным образом через комаров, хотя, вероятно, возможно также контактное заражение.

В естественных условиях болезнь зарегистрирована в государствах Восточной, Южной и Экваториальной Африки (Кения, ЮАР, Судан, Уганда, Родезия). К лихорадке долины Рифт восприимчив широкий круг хозяев, включая человека и обезьян. Болезнь легко передается грызунам некоторых видов. Люди могут заражаться во время эпизоотии среди домашних животных, а также работая с инфекционным материалом. Особенно опасен вирус лихорадки долины Рифт для человека при аэрогенном заражении.

При остром течении болезни характерно внезапное повышение температуры тела, а также появление слизисто-гнойных истечений из носа, рвоты, кровавых поносов; беременные животные часто абортируют. Смерть наступает через 24—48 часов после появления первых признаков болезни.

Трупы павших животных быстро разлагаются. Самый характерный признак болезни — некроз печени. Она обычно увеличена, на разрезе серого или серо-красного цвета и содержит многочисленные очаги некроза в виде маленьких белых точек около 1 мм в диаметре. Под капсулой печени обнаруживают кровоизлияния. Желудочно-кишечный тракт поражен на всем протяжении. В период острого течения болезни отмечают сильный геморрагический гастроэнтерит. При гистологическом исследовании в печеночных клетках могут быть видны внутриядерные ацидофильные включения, обнаружение которых имеет диагностическое значение (рис. 1, 2).

ВИРУС

Возбудителем лихорадки долины Рифт является мелкий РНК-содержащий вирус, относящийся к группе арбовирусов. Диаметр вириона около 50 ммк. Вирионы легко проходят через фильтры Беркефельда N, V и W, Шамберлана L_2—L_{12}, а также через коллодийные мембранные фильтры с диаметром пор 150 ммк.

Устойчивость. Вирус чувствителен к эфиру, быстро разрушается как в кислой (pH 6,6), так и в щелочной (pH 8,0) среде, относительно термостабилен — при 56° инактивируется в течение 40 минут, чувствителен к фотодинамическому действию метиленовой сини, инактивирующей его на свету за 40 минут, легко инактивируется ультрафиолетовыми лучами, но устойчив к 0,5%-ному фенолу и глицерину.

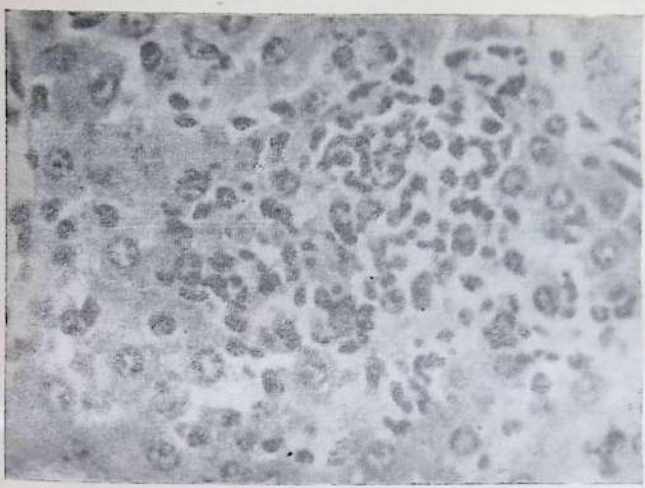


Рис. 1. Первичный очаг парацентрального некроза с многочисленными сильнобазофильными осколками клеточного ядра в печени больного ягненка. (Окраска гематоксилин-эозином × 260) (по Витману).

Рис. 2. Эозинофильные тельца включения в клетках печени (обозначены стрелками) больного ягненка. (Окраска гематоксилин-эозином) × 1300.

Хранение и консервирование вирусодержащих материалов. Вирус хорошо сохраняется в замороженном и лиофилизированном состоянии. В 50%-ном забуференном глицерине он сохраняет активность в течение длительного времени.

Локализация в организме. У больных животных вирус содержится в высоких концентрациях в крови, паренхиматозных органах (особенно в печени) и на слизистых оболочках носовой полости. В ядрах, а иногда в протоплазме пораженных клеток печени вирус вызывает появление гомогенных гиалиноподобных ацидофильных телец-включений, которые могут быть обнаружены при гистологическом исследовании. В крови в наиболее высоких титрах (10^5—10^6 мышиных интраперитонеальных LD_{50}/мл) вирус содержится в период максимального подъема температуры, хотя в более низких титрах может быть обнаружен на протяжении всего периода виремии (от 1—2 до 6—8 дней). Длительность и сроки появления виремии зависят от пути проникновения вируса.

Антигенные свойства. Вирус лихорадки долины Рифт обладает выраженной антигенной активностью и отличается от других арбовирусов во всех иммунологических реакциях. В крови переболевших животных появляются вируснейтрализующие и комплементсвязывающие антитела. Вируснейтрализующие антитела появляются на четвертый день после начала заболевания и сохраняются пожизненно; комплементсвязывающие антитела обнаруживают к 14-му дню после заражения. Они сохраняются до 6 месяцев, а возможно, и дольше. У переболевших животных развивается длительный иммунитет.

Гемагглютинирующие свойства. Вирус лихорадки долины Рифт агглютинирует эритроциты цыплят 1-дневного возраста, мышей, морских свинок, а также эритроциты крови группы А человека.

Спектр патогенности. В естественных условиях вирус патогенен для овец, коз, крупного рогатого скота, а также для человека, обезьян, мышей, крыс, хомяков и хорьков. Лошади, свиньи и птицы (куры, утки, голуби) невосприимчивы. В экспериментальных условиях вирус патогенен для ягнят, козлят, телят, которые заболевают при введении вирусного материала интраперитонеально, интраназально, подкожно, внутрикожно, интрацеребрально, интратестикулярно, а также при аэрозольном заражении и при заражении через конъюнктиву, при втирании материала в слизистую оболочку ротовой полости; эффективным методом заражения является подсадка инфицированных комаров и клещей. Способ заражения оказывает существенное влияние на течение инфекции. Особенно легко заражаются новорожденные животные.

Из лабораторных животных к вирусу чувствительны белые мыши (особенно мышата), крысы, хомячки. Кролики и морские свинки невосприимчивы. Наиболее подходящей моделью для выделения и изучения возбудителя лихорадки долины Рифт являются белые мыши и мышата 21—28-дневного возраста (весом 10—14 г), которые заболевают при различных способах заражения. Наилучший способ заражения — интраперитонеально, при этом методе вирус патогенен в очень малых дозах (10^{-7}/мл и менее), вызывая гибель в течение 2—5 дней после инокуляции. При подкожном и внутримышечном введении взрослые мыши менее чувствительны, чем мышата. Мышата обычно погибают через 36—96 часов после заражения. В наибольших количествах вирус у них обнаруживают в крови, откуда его можно легко выделить. Вирус можно также выделить и из паренхиматозных органов.

Культивирование вируса в лабораторных условиях. Для культивирования и пассирования вируса в лабораторных условиях обычно используют мышат 21—28-дневного возраста или взрослых белых мышей (внутрибрюшинное заражение).

Вирус размножается на куриных эмбрионах 2—3-дневного возраста при заражении их в желточный мешок. Максимальное накопление вируса отмечают на 2—3-й день после заражения. В 7-дневных куриных эмбрионах вирус практически не размножается.

Возбудитель лихорадки долины Рифт размножается в первичных культурах фибробластов куриного эмбриона, клеток почки ягненка и хомячка, а также в перевиваемых культурах клеток Чанга печени человека. Размножение вируса в тканевых культурах сопровождается появлением цитопатических изменений.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ранняя лабораторная диагностика болезни основана на выделении и идентификации вируса из патологического материала от больных и павших животных и его идентификации; на обнаружении при гистологическом исследовании печени от павших ягнят, козлят, телят и овец характерных ацидофильных телец-включений.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материалов. Для выделения возбудителя лихорадки долины Рифт используют кровь, смывы со слизистых оболочек носовой полости, иногда молоко, кусочки печени. Наибольшую ценность представляет материал, полученный в течение первых 3—5 дней заболевания. Чаще и в наиболее высоких концентрациях (до 10^5—10^7 мышиных LD_{50}/мл и выше) вирус удается выделить из крови, а также из печени.

Пробы крови обычно берут от больных животных с ярко выраженными симптомами болезни в период подъема температуры. Если для исследования на присутствие вируса предполагают использовать сыворотку, пробы помещают на 2—3 часа в теплую воду (30—37°, не выше) в затемненном месте, после чего обводят для отделения сгустка и ставят в прохладное место или в холодильник при 4°. Если для выделения вируса используют цельную кровь, пробы сразу после взятия помещают в холодильник или в термос со льдом.

Трупы животных, павших от лихорадки долины Рифт, быстро разлагаются, в связи с чем материал для вирусологического исследования надо брать как можно быстрее после гибели животных. Для этого лучше использовать животных, убитых с диагностической целью в агональной стадии болезни. Материалами для выделения вируса от павших или убитых животных служат кровь и паренхиматозные органы.

Кусочки паренхиматóзных органов сразу после взятия погружают в стерильный 50%-ный забуференный глицерин (pH 7,2—7,4) или фосфатный буферный раствор с антибиотиками (pH 7,2—7,4). Банки с материалом помещают в холодильник при 4°. Материалы транспортируют в лабораторию в термосе со льдом.

После доставки в лабораторию материалы, предназначенные для вирусологического исследования, замораживают и хранят до использования при температуре минус 20—70°.

Кусочки печеночной ткани с характерными патологоанатомическими изменениями можно использовать для гистологического исследования с целью выявления характерных патоморфологических изменений и наличия ацидофильных вирусных телец-включений.

Пробы крови 2—3-кратно замораживают и оттаивают, после чего гомогенизируют, центрифугируют 30 минут при 2500—3000 об/мин. Надосадочную жидкость исследуют на наличие вируса. Сывороткой заражают животных, тканевые культуры или куриные эмбрионы, не подвергая их предварительной обработке.

Кусочки органов и тканей гомогенизируют с буферным раствором или средой для тканевых культур (pH — 7,2—7,4) в соотношении 1 : 10, после чего суспензию выдерживают в течение 2 часов при 4°, затем центрифугируют в течение 15 минут при 2500—3000 об/мин. К надосадочной жидкости добавляют антибиотики и после контроля на стерильность используют ее для заражения. До окончания исследования остатки материалов хранят в замороженном состоянии при минус 20—70°.

Заражение животных. Мышат 21—28-дневного возраста заражают интраперитонеально, вводя по 0,1—0,2 мл мате-

риала. Каждым образцом испытуемого материала заражают 5—8 животных и наблюдают за ними в течение 5 дней. Большинство зараженных мышат погибает через 2—4 дня после инокуляции. При вскрытии в печени находят типичные для лихорадки долины Рифт некротические изменения. При гистологическом исследовании в клетках печени часто обнаруживают внутриядерные ацидофильные тельца-включения, что является подтверждением присутствия в исследуемом материале вируса лихорадки долины Рифт.

Для выделения вируса на *куриных эмбрионах* исследуемый материал инокулируют в желточный мешок 2—3-дневных эмбрионов, которые инкубируют затем в течение 2—3 дней при 37°. Погибшие эмбрионы вскрывают, полученный из них материал после дополнительной проверки на стерильность используют для проведения 2—3 дополнительных пассажей.

Культуры клеток (фибробласты куриного эмбриона, клетки почки ягненка или хомячка) также могут быть использованы для выделения и культивирования вируса, но пока еще не находят широкого применения. Имеется сообщение (Бойл, 1965), что при культивировании в клетках почки хомячка в присутствии сыворотки вирус размножается до высоких титров, но не вызывает появления ЦПД, тогда как при использовании поддерживающей среды без сыворотки вирус вызывает быстрое разрушение клеток культуры, причем титрование вируса в этой системе оказывается более чувствительным, чем титрование на мышатах. Для выявления ЦПД культуры просматривают на протяжении 10 дней, однако конечная точка титрования обычно определяется на 5-й день. Развитие ЦПД может быть предотвращено специфической иммунной сывороткой. При культивировании вируса лихорадки долины Рифт в культуре клеток почки хомячка вирус не обнаруживают в экстрацеллюлярной жидкости даже при наличии сильного разрушения клеток, что может быть обусловлено термолабильностью вируса и его быстрой инактивацией при низких значениях pH.

Биопробу для выявления вируса в исследуемом материале или его идентификации обычно проводят на молодых ягнятах, козлятах или телятах. Наиболее восприимчивы ягнята моложе 7-дневного возраста. Испытуемый материал вводят им подкожно или интраперитонеально. Иногда используют и другие методы заражения (интраназальный, внутрикожный). Ягнята погибают в течение 24—36 часов после заражения при недостаточно четких симптомах болезни. Смертность среди них может достигать 90—100%. У более взрослых ягнят болезнь развивается в течение 1—3 суток и проявляется характерной клинической картиной. После внутрибрюшинного заражения виремия обычно появляется через 16—24 часа; максимальные титры вируса в крови (до 10^8—10^9 мышиных интраперитонеальных LD_{50}/мл) отмечают через 48—72 часа после заражения. После интраназального заражения температурная реакция отмечается на 4-й день, а виремия — с 5-го по 8-й

день. При вскрытии павших животных обнаруживают характерные поражения печени — размытые некрозы. При гистологическом исследовании в печеночных клетках часто видны ацидофильные внутриядерные тельца-включения.

У козлят виремия обычно наступает через 48—72 часа после заражения, но титры вируса в крови значительно ниже (до $10^{2,6}$—$10^{5,5}$ мышиных интраперитонеальных LD_{50}/мл), чем у ягнят. Время начала и длительность виремии значительно варьируют. У телят виремию отмечают с 1-го до 6-го дня после заражения. Максимальные титры вируса в крови ($10^{5,8}$—$10^{7,2}$ мышиных интраперитонеальных LD_{50}/мл) обычно обнаруживают на 2—3-й день после заражения, причем они совпадают с максимальным подъемом температуры и наиболее выраженной лейкопенией. При внутрикожном заражении телят виремия начинается с 2—3-го дня и длится до 6—7-го дня; максимальные титры вируса в крови отмечают на 3—5-й день.

Для подтверждения диагноза от выживших после биопробы животных на 7—14-й день берут сыворотки, которые исследуют в реакции нейтрализации на мышатах.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Для идентификации вируса используют РН, РСК, РТГА и РДП в агаровом геле, а также данные гистологических исследований в печени по выявлению в ней характерных ацидофильных внутриядерных телец-включений. Чаще пользуются РН и РСК.

Исследование на наличие телец-включений. Гистологические исследования по обнаружению в клетках печени павших и забитых больных животных характерных внутриядерных ацидофильных телец-включений входят в общий комплекс диагностических исследований. Гистологически исследуют печень ягнят или мышей, зараженных исследуемым патологическим материалом и погибших в период выраженной клиники и характерных патологоанатомических изменений (некрозы печени).

Для проведения исследований из печени или ее кусочков, имеющих очаги некроза, готовят срезы на замораживающем микротоме, фиксируют абсолютным метиловым спиртом или жидкостью Боуэна и окрашивают гематоксилин-эозином. При микроскопии в положительных случаях обнаруживают обширные гнойные некротические очаги, в которых отмечают наличие дегенерированных многоядерных лейкоцитов и гиалиновое перерождение протоплазмы. В печеночных клетках часто видны характерные внутриядерные ацидофильные тельца-включения, присутствие которых совпадает с распадом хроматина и разрывом ядерной мембраны. Обнаружение таких телец-включений имеет важное диагностическое значение.

Серологическая идентификация

Реакцию нейтрализации ставят на мышатах, используя вирус, предварительно адаптированный к этим животным. В большинстве случаев реакцию ставят с сыворотками крови от переболевших животных, используя постоянную дозу сыворотки и варьирующие дозы вируса. Сыворотки предварительно прогревают в течение 30 минут при 56°. Смесь сыворотки с равными объемами соответ-

ствующих разведений вируса инкубируют 15 минут при 37° (инкубирование в течение 30 или 60 минут не увеличивает нейтрализующей способности сыворотки) (Истердей с сотр., 1962), после чего вводят по 0,2 мл в брюшную полость мышатам, используя по 4—6 мышат на каждое разведение вируса. Контрольным животным вводят обработанную аналогичным образом смесь вируса с нормальной сывороткой. При наличии в исследуемых сыворотках специфических вируснейтрализующих антител подопытные мышата не заболевают, а контрольные гибнут в течение 2—3 дней.

Сыворотки крови от выживших овец или ягнят на 14—21-й день после заражения обычно имеют высокий индекс нейтрализации, достигающий 10^8.

Для идентификации в реакции нейтрализации вирусспецифического антигена реакцию ставят аналогичным образом, используя в качестве специфической антисыворотки сыворотку крови от ягнят, выживших после экспериментального заражения вирусом лихорадки долины Рифт.

Реакцию связывания комплемента применяют для идентификации вируса и для проведения серологических исследований с целью выяснения эпизоотической ситуации при установлении первых случаев лихорадки долины Рифт. Методика постановки РСК, а также приготовления ее компонентов такая же, какая обычно используется для всех арбовирусов. В качестве антигена для РСК берут экстракт свежевзятой печени мышей или крыс, зараженных вирусом лихорадки долины Рифт или исследуемым вирусным материалом. Сразу же после гибели животных их вскрывают и из печени готовят экстракт, который обрабатывают по обычной методике.

Реакция гемагглютинации. РГА и РТГА обычно ставят для идентификации вируса. При постановке РГА используют нативную разведенную физиологическим раствором вируссодержащую сыворотку крови погибших мышей или сыворотку, предварительно экстрагированную ацетоном и эфиром. В качестве контроля используют необработанную нативную вируссодержащую сыворотку, которую предварительно выдерживают на холоде (трое суток при минус 24°) с целью освобождения ее от неспецифических ингибиторов гемагглютинации, содержащихся в нормальной мышиной сыворотке. Реакцию ставят обычно с эритроцитами крови однодневных цыплят. Оптимальные условия для реакции: pH 6,5, температура 25°. Нативная сыворотка более эффективна, чем гемагглютинин, экстрагированный ацетоном и эфиром. Эфир-ацетоновый экстракт сыворотки вызывает гемагглютинацию эритроцитов однодневного цыпленка при 25 или 37° в диапазоне pH от 5,3 до 6,3. Нативная вируссодержащая сыворотка мышей вызывает гемагглютинацию в более широком диапазоне pH и температуры, причем титр ее в 4 раза выше, чем титр в реакции с эфир-ацетоновым экстрактом; к тому же она агглютинирует также эритроциты крови петуха, мыши, морской свинки и человека.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

При постановке окончательного диагноза на лихорадку долины Рифт необходимо исключить некоторые сходные болезни вирусной этиологии — катаральную лихорадку (синий язык) овец, болезнь Найроби, а также некротический гепатит бактериальной природы, вызываемый клостридиями.

Болезнь Найроби исключают результаты РСК, прямой и перекрестной нейтрализации, а также данные о чувствительности к вирусу лабораторных животных, куриных эмбрионов и тканевых культур.

Синий язык исключают по результатам РСК, прямой и перекрестной нейтрализации.

Некротический гепатит, вызываемый клостридиями, исключают на основании результатов бактериологических исследований.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Переболевшие животные приобретают напряженный и длительный иммунитет, сопровождающийся сохранением в крови вируснейтрализующих и комплементсвязывающих антител. Диагноз на прошедшую инфекцию ставят при помощи РН и РСК. При проведении этих исследований следует учитывать, что вируснейтрализующие антитела появляются раньше (на 4-й день после начала заболевания) и у овец могут сохраняться пожизненно; комплементсвязывающие антитела появляются к 14-му дню после заражения и сохраняются до шести месяцев (возможно, и дольше). При использовании РСК для ретроспективной диагностики следует иметь в виду, что комплементсвязывающие антитела могут выявляться и у животных, не проявивших клинических признаков болезни, но подвергавшихся повторному инфицированию. Наличие субклинической инфекции придает ретроспективной диагностике болезни особое значение.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИММУНИТЕТА

Естественное переболевание лихорадкой долины Рифт создает стойкий и длительный иммунитет (у овец — пожизненный). Наличие иммунитета связывают с быстрым появлением и длительным сохранением в крови переболевших животных специфических вируснейтрализующих антител. Ягнята, родившиеся от переболевших овец, в подсосном периоде иммунны. Сыворотка реконвалесцентов обладает выраженным профилактическим действием. Для пассивной иммунизации новорожденных ягнят чаще всего используют гипериммунную сыворотку крупного рогатого скота.

Вопросы активной иммунизации против лихорадки долины Рифт находятся в стадии разработки. Наиболее перспективна живая вирусвакцина из нейротропного адаптированного к мышам штамма вируса, который обладает антигенными и иммуногенными свойствами и вызывает у вакцинированных ягнят появление вируснейтрализующих антител, которые удается обнаруживать через 140—150 дней после вакцинации. Вопросы динамики появления и исчезновения антител после переболевания и вакцинации, а также связи между титрами антител и иммунитетом изучены недостаточно. Методы серологической оценки поствакцинального иммунитета не разработаны.

БОЛЕЗНЬ НАЙРОБИ

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Болезнь Найроби — остро протекающая трансмиссивная болезнь овец и коз, характеризующаяся высокой рецидивирующей лихорадкой и тяжелым геморрагическим энтеритом. Болезнь протекает в виде энзоотий и периодических эпизоотических вспышек и наблюдается преимущественно в Кении, Уганде и некоторых других районах Восточной Африки.

В естественных условиях восприимчивы овцы. Погибает от 30 до 70% заболевших. Контактного заражения овец, по-видимому, не происходит. Козы менее восприимчивы, и у них иногда отмечают субклиническую инфекцию. Крупный рогатый скот к болезни почти невосприимчив, но может быть кратковременным (до 24 часов) вирусоносителем. В естественных условиях инфекцию переносят клещи, главным образом Rhipicephalus appendiculatus, у которых наблюдается трансовариальная передача вируса. Кроме того, переносчиками вируса могут быть Rhipicephalus bursa, Rhipicephalus pubchellus, Rhipicephalus simus, Amblyomma gemma и Amblyomma variegatum, но у них передача возбудителя происходит не во всех стадиях развития. В энзоотически неблагополучных очагах вполне возможно существование природного резервуара вируса среди диких животных.

ВИРУС

Возбудитель — мелкий РНК-содержащий вирус, относящийся к группе арбовирусов. Он легко проходит через фильтры Беркефельда N и Шамберлана, а также Зейтца СФ.

Устойчивость. Вирус относительно стабилен. Он не погибает при нагревании до 50° в течение 60 минут, но разрушается за 5 минут при 60°. Вирус устойчив к глицерину.

Хранение и консервирование вирусодержащего материала. Вирус хорошо сохраняется в лиофилизированном или замороженном состоянии, а также в глицерине. Инфицированная кровь или сыворотка в холодильнике при 4° остается активной в течение длительного времени. В 50%-ном глицерине вирус остается активным в течение 93 дней. В запаянных ампулах лиофильно высушенный вирус сохраняет жизнеспособность 143 дня.

Чрезвычайно длительное время вирус может сохраняться в непитавшихся взрослых клещах, нимфах и личинках. У половозрелых клещей Rhipicephalus appendiculatus жизнеспособность вируса болезни Найроби удавалось установить в течение 871 дня; в их нимфах — 350 дней; в личинках, полученных от зараженных самок клеща,— 245 дней (Льюис, 1946).

Локализация в организме. У больных животных вирус обычно находится в крови и в паренхиматозных органах, а также в моче и фекалиях. В наиболее высоких титрах он содержится в селезенке и печени. Максимальной вирулентностью вирус обладает в период подъема температуры при первом приступе лихорадки. В плазме и клетках крови его удается выявлять в течение 24 часов после снижения температуры. Через сутки после снижения температуры до нормы, а также в период вторичного приступа лихорадки вирус менее ак-

тивен, и выделение его удается не всегда. Кровь в период второго подъема температуры неинфекционна.

Антигенные свойства. Вирус болезни Найроби отличается от других арбовирусов по антигенным свойствам.

Спектр патогенности. В естественных условиях к возбудителю болезни Найроби наиболее восприимчивы овцы (особенно ягнята), а также козы (значительно слабее). Крупный рогатый скот не чувствителен.

Буйволы, лошади, ослы, мулы, поросята, а также лабораторные животные (кролики, морские свинки, крысы, мыши) к нему не чувствительны. Однако вирус может быть адаптирован к взрослым белым мышам, вызывая у них энцефалит при интрацеребральном введении. Мышат-сосунков можно инфицировать интрацеребрально или интраперитонеально.

Культивирование вируса в лабораторных условиях. О размножении и культивировании вируса болезни Найроби на куриных эмбрионах достоверно не известно. Нет сведений и о попытках культивирования этого вируса в культурах тканей. В экспериментальных условиях адаптированные штаммы вируса культивируют на взрослых мышах (интрацеребральное заражение) или на мышатах-сосунах (интрацеребральное или внутрибрюшинное заражение).

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Основными методами лабораторной диагностики болезни Найроби являются выделение вируса и биопроба на ягнятах.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материалов. Для выделения возбудителя болезни Найроби используют кровь, взятую с соблюдением стерильности от больных животных в период первого подъема температуры. Для этого можно также использовать кусочки паренхиматозных органов (в особенности селезенки и печени) и пораженные лимфатические узлы от больных животных, специально убитых для взятия материала в период первого подъема температуры, ибо в последующие периоды течения заболевания выделить вирус от больных животных почти не удается. Сразу после взятия образцов (кусочки паренхиматозных органов, лимфатические узлы) их погружают в стерильный 50%-ный глицерин или помещают в термос со льдом. На наличие вируса целесообразно также исследовать живых клещей, которых собирают с больных овец во время первого приступа лихорадки.

Для выделения вируса из крови используют гепаринизированную или дефибринированную кровь, а также сыворотку, плазму или растертый в солевом растворе сгусток, которые обрабатывают по обычной методике с соблюдением стерильности и после соответствующего бактериологического контроля используют для биопробы. Кусочки паренхиматозных органов отмывают от глицерина, готовят 10%-ную суспензию на фосфатном буферном растворе с антибиотиками, центрифугируют и полученную надосадочную жидкость используют для биопробы.

Собранных клещей сортируют по видам и объединяют по 10—50 особей, растирают в ступке и готовят взвесь на физиологическом или фосфатном буферном растворе. Если материалы не исследуют сразу, их замораживают и хранят при минус 70°.

Биопроба. Наличие вируса в патологическом материале определяют при помощи биопробы на ягнятах, которые не имели соприкосновения с инфицированными клещами — переносчиками возбудителя болезни Найроби. Ягнятам вводят внутривенно, внутрибрюшинно или подкожно вируссодержащую кровь или сыворотку от больных животных в дозе 0,001—1 мл.

Обычно в положительных случаях в первые 48 часов после инокуляции испытуемого материала у зараженных животных резко повышается температура тела (до 41,1—41,6°). При внутривенном или внутрибрюшинном заражении температура повышается раньше, чем при подкожной инокуляции.

Симптомы болезни появляются только после снижения температуры. Они характеризуются слизисто-гнойными истечениями из носовой полости, часто с примесью крови, водянистой диареей с частой самопроизвольной дефекацией и выделением темно-зеленых фекалий. Зараженные животные погибают через два дня после снижения температуры (между 4-м и 8-м днем после заражения). При вскрытии обнаруживают изменения, наблюдаемые при естественном течении болезни.

Для выделения вируса от зараженных ягнят берут кровь в период первоначального подъема температуры, а также паренхиматозные органы и лимфатические узлы от убитых животных.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Методы идентификации возбудителя болезни Найроби от других арбовирусов не разработаны.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

При постановке окончательного диагноза на болезнь Найроби в сомнительных случаях следует исключить лихорадку долины Рифт и гидроперикардит жвачных. Лихорадку долины Рифт можно отличить от болезни Найроби по характерным некротическим очагам в печени, а также по чувствительности к возбудителю лабораторных животных. К вирусу болезни Найроби они нечувствительны, от вируса же лихорадки долины Рифт быстро погибают.

При гидроперикардите жвачных возбудитель болезни (риккетсия Cowdra ruminantium) можно легко обнаружить при микроскопии мазков, приготовленных (обязательно) из свежего материала. В сомнительных случаях ставят биологическую пробу.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Вопросы серологической ретроспективной диагностики и специфической профилактики болезни Найроби не разработаны.

КОНТАГИОЗНАЯ ЭКТИМА ОВЕЦ И КОЗ
(CONTAGIOSUS PUSTULAR DERMATITIS OF SHEEP)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Контагиозная эктима, контагиозный пустулезный дерматит, контагиозный пустулезный стоматит, болезнь Орф, инфекционный некротизирующий дерматит, контагиозный везикуло-пустулезный дерматит, инфекционный лабильный дерматит, изъязвленный рот, покрытый струпьями рот и др.) — инфекционная болезнь овец и коз, характеризующаяся образованием везикул, пустул, корок и струпьев на губах или бесшерстных (либо с низкой, редкой шерстью) участках кожного покрова; поражается также слистая оболочка ротовой полости, особенно у молодняка, а также у животных всех возрастных групп в случаях первичного заноса инфекции. Отличается высокой контагиозностью и быстрым распространением среди восприимчивого поголовья.

Болезнь значительно распространена почти во всех странах мира, где развито овцеводство. В СССР ее диагностируют на Северном Кавказе, в Закавказье, республиках Средней Азии и ряде областей РСФСР.

Инкубационный период продолжается 2—4 дня, редко — до 7 дней. Болеют овцы и козы всех возрастов, особенно тяжело переболевает молодняк. В стационарно неблагополучных хозяйствах взрослые животные болеют редко; у кормящих овцематок могут встречаться поражения на сосках и вымени. Эпизоотии в таких хозяйствах, как правило, наблюдаются в период окота и после отделения молодняка от маток.

В зависимости от локализации поражений различают стоматит, губную, генитальную и копытную формы болезни.

У ягнят, которые заражаются в первые дни жизни, чаще поражается слизистая оболочка ротовой полости. Болезнь у них протекает тяжело. У взрослых овец в пораженных участках ротовой полости появляются красные пятна диаметром от 2 до 15 мм, в центре их вскоре образуются пузырьки с прозрачным или мутным содержимым. Увеличиваясь в размере, пузырьки вскоре прорываются, оставляя эрозии. Через 2—3 дня эрозии покрываются фибринозным налетом, под которым разрастается грануляционная ткань, заполняющая впоследствии весь дефект ткани. В отдельных случаях, когда грануляционная ткань слишком бурно разрастается, на месте дефекта возникают гроздевидные или малиновидные образования величиной до размера ореха и более (рис. 1, 2, 3, 4).

В осложненных случаях на месте эрозий (на деснах, щеках, языке) могут возникать некротические очаги или глубокие, плохо заживающие язвы. Патологический процесс может распространяться на область глотки и гортани, пищевод и трахею.

При благоприятном течении болезни, что обычно наблюдается у взрослых овец и реже у ягнят, поражения на слизистых оболочках заживают в течение 1—2 недель. Эпителизация происходит без образования рубца. При осложнениях заживление происходит медленно, а в тяжелых случаях (при наличии некротических очагов и изъязвлений) больные ягнята нередко погибают. Параллельно с развитием патологического процесса на слизистой ротовой полости возникает и поражение губ, носового зеркальца, крыльев носа и других участков головы. Вначале на коже появляются красные пятна, затем — узелки, везикулы и пустулы. Последние увеличиваются и нередко сливаются в обширные очаги. При подсыхании на их месте образуются корки. Нередко пустулы прорывают-

Рис. 1. Диффузное поражение губ.

Рис. 2. Диффузное поражение губ.

ся, истечения из них засыхают. При осложнениях микрофлорой образуются долго не заживающие язвы с толстыми корковыми наслоениями; из трещин в корках выделяется гноевидная жидкость с ихорозным запахом. Губы в таких случаях утолщены, нижняя губа отвисает. У ягнят нередко наблюдают пенистые, либо слизистые истечения из ротовой полости. Истечения содержат частицы омертвевших тканей и имеют неприятный запах.

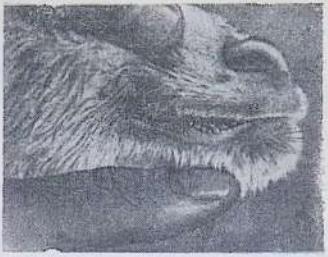


Рис. 3. Очаговое поражение губ.

Больные ягнята с трудом сосут маток или отказываются вообще, отстают в росте и развитии, худеют и нередко погибают. Температура тела у больных может повышаться на 1—2°.

Копытная форма болезни чаще встречается у овец, обитающих в местах, где почвенно-климатические и хозяйственные условия способствуют мацерации и травматизации нижних частей конечностей. Поражается одна, реже несколько конечностей. В межкопытной щели, в области венчика и на бабках развивается везикуло-пустулезный процесс, заканчивающийся образованием корок, их постепенным подсыханием и отпадением. Как правило, процесс осложняется вторичной инфекцией, возникают гнойнонекротические явления. Больные животные хромают, чаще лежат, истощаются. У кормящих овцематок поражения в виде розеол, папул, везикул, пустул и корок можно обнаружить на сосках и вымени. В осложненных случаях могут развиваться тяжелые формы мастита. Иногда поражения появляются на срамных губах, препуции, вокруг анального отверстия.

Большинство больных животных выздоравливают. Ягнята погибают либо от истощения, либо в результате осложнения вторичной инфекцией. Поэтому при

Рис. 4. Поражение сосков.

вскрытии павших животных патологоанатомические изменения во внутренних органах обычно обусловлены осложняющими факторами.

Характерными являются патологические изменения на губах и других пораженных участках кожи, эрозии, некротические очаги и изъязвления на слизистых оболочках ротовой полости, языке. Иногда обнаруживают пролиферативные поражения в области гортани, на слизистых пищевода, рубца, сетки, кишки и сычуга. Изменения в органах пищеварения, в печени, легких чаще всего обусловливаются возбудителем некробактериоза.

При гистологических исследованиях в эпидермисе участков поражения находят ретикулярную дегенерацию и внутриклеточные включения. Отмечается также акантоз, паракератоз, лейкоцитарная инфильтрация, полнокровие сосудов, скопление гистиоцитов, лимфоцитов и полибластов.

ВИРУС

Возбудитель — эпителиотропный вирус группы оспенных вирусов. Средний размер вирусных частиц 158×252 ммк; они имеют закругленные концы и плотные субполярные участки. Вирус не проходит через фильтры Беркефельда W и N, мембранный № 2 и проходит через фильтры Беркефельда V и мембранный № 3. В мазках (из свежих поражений), окрашенных по Морозову или по Пашену, он обнаруживается в виде круглых или слегка вытянутых элементарных телец размером 0,2—0,3 мк.

Морфологически вирус сходен с оспенными вирусами, от которых отличается размерами, отношением осей, внутренней и внешней структурой. Наружная оболочка вируса имеет трубчатый нитевидный компонент, который обвивает спиралью тельце вириона. Спираль имеет левый ход витка в виде восьмерки. Нити витков нигде взаимно не пересекаются, однако при негативном контрастировании благодаря наложению на одну плоскость рисунка нити нижней и верхней поверхности вириона создается картина взаимопересекающейся сетевидной поверхностной структуры. Угол наклона каждого витка трубчатой спирали составляет примерно 30—40° по отношению к продольной оси вириона.

Толщина наружной зоны вириона составляет приблизительно 25 ммк, под ней находится сплюснутое внутреннее сдвоенное тельце, которое по своим абсолютным и относительным размерам меньше, чем у оспенных вирусов.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. В высушенных (в эксикаторе над серной кислотой) корочках и струпьях он сохраняет инфекционность много лет (до 23, по данным Харт и др., 1949) при температуре 2—4° и до 15 лет при комнатной температуре.

Хранение и консервирование вирусосодержащего материала. Для хранения корки и струпья высушивают в эксикаторе над серной кислотой (или любым другим методом, например в сушильно-вакуумной установке, без использования подогрева), измельчают в ступке до получения тонкого порошка, повторно высушивают в тех же условиях 36—48 часов и расфасовывают в ампулы или флаконы. В таком виде материал может длительно сохраняться при 2—4 и 18—20°.

Культуральный вирусный материал для длительного хранения лиофилизируют в сушильно-вакуумных установках. Температура предварительного замораживания минус 40—50°, вакуум 70—100 мк, температуру подогрева постепенно доводят (5—10° в час) до 26—30°, общая продолжительность высушивания 32—36 часов. При таком режиме получается сухой препарат без снижения активности и с остаточной влажностью до 3%. В качестве защитной среды (стабилизатора) в культуральный материал необходимо предварительно добавлять 3% пептона или 3% сухого обезжиренного молока. Лиофилизированный культуральный вирус сохраняется при 2—4° и 18—20° до 2 лет (срок наблюдения) без существенного снижения титра.

Локализация в организме. Вирус содержится в везикулах, папулах, корках и струпьях больного животного. В крови и выделениях вирус обнаружить не удается. При поражениях слизистой оболочки ротовой полости вирус можно выделить также из пораженных участков и из истечений.

Антигенная вариабельность. Антигенных вариантов и типов у вируса контагиозной эктимы не выявлено, однако высказываются предположения о возможности их существования. Сравнительное изучение 11 штаммов, выделенных в различных странах (Англия, ГДР, Египет, СССР), проведенное Г. К. Ковалевым и др. (1967), показало их идентичность в антигенном и иммуногенном отношениях.

Антигенная активность. По литературным данным, вирус контагиозной эктимы индуцирует образование вируснейтрализующих, комплементсвязывающих, агглютинирующих и преципитирующих антител. Титр агглютининов у выздоровевших овец, кроликов и людей высокий. Другие антитела накапливаются в сыворотках больных и переболевших животных в низком титре, поэтому для серологических исследований обычно используют сыворотки от гипериммунизированных животных. Вируснейтрализующая активность таких сывороток не высока: неразведенная сыворотка способна нейтрализовать 10—1000 доз вируса, т. е. в 2—3 последних его разведениях.

Спектр патогенности. В естественных условиях вирус вызывает заболевание у овец, коз, серн, туров и других парнокопытных полорогих жвачных. К вирусу восприимчив человек. Заболевают люди, обслуживающие больных животных, и лица, занятые переработкой продуктов убоя этих животных.

Культивирование вируса в лабораторных условиях. Помимо пассирования на неиммунных к эктиме ягнятах, вирус удается культивировать в монослойных культурах клеток кожи, мышцы овечьего эмбриона, почки телят, ягнят, тестикул ягнят и в некоторых перевиваемых культурах клеток.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Первичный диагноз может быть поставлен по симптомам болезни и данным эпизоотологии. Для подтверждения диагноза необходимо проведение лабораторных исследований (микроскопирование, серологические исследования, биопроба).

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материала. От больных животных в обследуемом хозяйстве берут вируссодержащие корки и струпья, растирают их в ступке, добавляют физиологический раствор (1:20), содержащий антибиотики (пенициллин и стрептомицин по 1—3 тыс. ЕД/мл и нистатин 50 ЕД/мл). Суспендируют, оставляют на 24 часа в холодильнике при 2—4°, фильтруют через двойной слой марли, а затем через бумажный фильтр и полученные суспензии используют для экспериментального заражения животного.

Для более полного (и надежного) освобождения исследуемого материала от секундарной микрофлоры можно проводить: центрифугирование при 8—10 тыс. об/мин (время, необходимое для разгонки и остановки центрифуги) и фильтрование через стерилизующие пластины (мембранный фильтр № 3) или фильтр Беркефельда.

Заражение животных. Ягнят 6—8-месячного возраста заражают нанесением подготовленного исследуемого материала на предва-

рительно очищенную и скарифицированную кожу. Материал лучше наносить одновременно в несколько участков кожного покрова — в кожу губ, паха, внутренней поверхности бедра. Царапины делают скарификатором или острыми браншами ножниц либо инъекционной иглой. Они должны быть неглубокими, чтобы избежать кровотечения, которое может препятствовать внедрению вируса.

Течение экспериментальной инфекции. Через 2—4 дня на месте инфицирования возникает мелкая эритема, затем по ходу царапин кожа становится гиперемированной и припухает. Далее появляются мелкие узелки, на месте которых образуются вначале везикулы, а затем пустулы с серовато-белым гнойным содержимым. Пустулы, как правило, имеют по периферии красный ободок. Развитие инфекционного процесса сопровождается усилением отечности и гиперемии пораженных тканей. Пустулы увеличиваются в размере, соседние сливаются, образуя обширные очаги.

Температура тела может повышаться на 1—2°, особенно если патологический материал нанесен на обширные участки кожи (50 см² и более), а также при осложнении секундарной микрофлорой.

С 8—12-го дня после заражения обычно начинается процесс заживления. В центре пустулы появляется темноватое пятно, которое увеличивается, приобретает коричневатый оттенок. Постепенно пустулы подсыхают, и на их местах образуются корки или струпья. Под ними разрастается новый слой эпидермиса, корки постепенно самопроизвольно отторгаются.

Заживление обычно заканчивается к 18—22-му дню после инфицирования, у отдельных животных несколько позже. После заживления рубцов или пятен, как правило, не остается.

Для дальнейших лабораторных исследований вирусный материал от экспериментально зараженного животного лучше брать с поражений в области паха или бедра, так как материал, взятый в этих участках, обычно в значительно меньшей степени загрязнен секундарной микрофлорой, чем, например, материал, взятый с губ.

Помимо ягнят, Н. Е. Гришаев и Н. И. Щепетова (1970) рекомендуют ставить биопробу на кошках. Предварительно у них тщательно выбривают шерсть на боках. Через сутки на этих участках острой препаровальной иглой скарифицируют кожу, делая несколько взаимоперпендикулярных линий, в которые втирают испытуемый материал. Через 2—3 дня на линиях скарификации появляются желтоватые корочки из подсохшего экссудата без признаков воспаления. Через 4—5 суток кожа вдоль линий скарификации краснеет, припухает, у отдельных животных приподнимается в виде валиков от ярко-красного до вишнево-багрового цвета, состоящих из слившихся друг с другом папул, которые четко повторяют рисунок скарификации. У некоторых кошек могут раз-

виться одиночные папулы, беспорядочно разбросанные по всему участку скарифицированной кожи (рис. 5, 6, 7).

Кроме биопробы, диагноз может быть уточнен по результатам вирусоскопии, реакции агглютинации, реакции преципитации, реакции нейтрализации и реакции связывания комплемента.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Вирусоскопия. С целью выявления элементарных телец по Морозову, необходимо брать материал из свежих поражений. Для этого у больного животного берут везикулярную жидкость, или пустулу, или струп (срезая ножницами или острым скальпелем). Из везикулярной жидкости готовят 2—3 тонких мазка (на очищенных обезжиренных стеклах), высушивают на воздухе в течение 1 часа и красят.

Пустулу или струп, снятые асептически, помещают на 10—15 минут в 0,2—0,3 мл нанесенной на предметное стекло дистиллированной воды и осторожно при помощи пинцета отмывают элементарные тельца. Удаляют пустулу (или струп), а помутневшую жидкость высушивают в термостате. Высушенный препарат отмывают физраствором (pH 7,0) и высушивают.

Готовые препараты окрашивают методом серебрения по Морозову и исследуют под микроскопом с использованием иммерсионной системы (увеличение 90×10).

У. Г. Кадыров (1971) рекомендует следующую методику исследования патологического материала на присутствие элементарных телец.

Рис. 5. Слившиеся папулы на коже котенка через 8 дней после заражения.

Рис. 6. Рассеянные папулы на коже кошки через 12 дней после заражения.

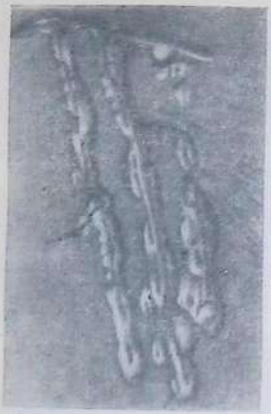


Рис. 7. Пустулы на коже овцы через 10 дней после заражения.

У исследуемого больного животного чистым пинцетом захватывают папулу и острой бритвой срезают эпидермис центрально возвышающегося участка. При этом на верхушке папулы появляется мутновато-серая жидкость. По этой скарифицированной поверхности проводят чистым обезжиренным предметным стеклом. Мазки-отпечатки окрашивают по Морозову или Романовскому—Гимза. Элементарные тельца вируса контагиозной эктимы овец и коз располагаются группами, попарно, небольшими цепочками или в виде рассеянных одиночных шариков размером 0,2—0,3 мк.

Элементарные тельца вируса контагиозной эктимы овец хорошо выявляются в гистологических срезах, окрашенных по Романовскому—Гимза. При экспериментальной инфекции они обнаруживаются в эпидермисе с 3-го по 12-й день после заражения. Эозинофильные тельца-включения, располагающиеся в цитоплазме эпителиальных клеток, выявляются на ранних стадиях заболевания.

Обнаружение элементарных телец и цитоплазматических включений может служить достаточным основанием для лабораторной диагностики контагиозной эктимы.

Серологическая идентификация

Для серологической идентификации вируса контагиозной эктимы можно ставить реакцию связывания комплемента, агглютинации элементарных телец и нейтрализации. Методы серологической идентификации вируса могут быть использованы в условиях оборудованной лаборатории.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Контагиозная эктима во многих случаях осложняется некробактериозом. По данным А. А. Волковой (1967), в начальной стадии болезни, а также в случаях легкой формы переболевания эктимой возбудителя некробактериоза выделить не удается или удается очень редко (2—3,9% случаев). Напротив, при среднем и тяжелом течении болезни B. necrophorum обнаруживается от 9,5 до 60,6% случаев. Следовательно, при диагностике контагиозной эктимы и ее дифференциации от других болезней необходимо не

только исключать некробактериоз, но и учитывать возможность одновременного течения двух инфекций.

При преимущественном поражении слизистых оболочек ротовой полости, что наиболее часто наблюдают у ягнят раннего возраста, а также у животных других возрастных групп, особенно при первичном заносе инфекции в хозяйство, кроме характерных для эктимы поражений, нередко отмечают обильное слюнотечение, напоминающее таковое при ящуре. Некоторое сходство клинических признаков приводит иногда к постановке ошибочного диагноза.

Характер поражений кожи при контагиозной эктиме (развитие папул, везикул, пустул) имеет сходство с поражениями, наблюдаемыми на коже при оспе овец.

Таким образом, при постановке диагноза нужно в первую очередь исключить перечисленные выше болезни (некробактериоз, оспу овец и ящур). Кроме этих инфекционных заболеваний, контагиозная эктима по своим проявлениям имеет сходство с микотическим и язвенным дерматитом.

Микотический дерматит у овец обычно сопровождается сильным отеком губ, диффузной гиперемией и образованием папул. Последние покрыты тонкими беловатыми корочками, которые постепенно могут утолщаться и достигать 5 мм. После отпадения корок в местах поражений остаются сильнопигментированные пятна (чего не бывает при эктиме). В мазках, окрашенных по Романовскому—Гимза, обнаруживают актиномицеты.

Язвенный дерматит вызывается крупночастичным вирусом. Возбудитель в иммунологическом отношении отличается от вируса контагиозной эктимы, хотя по клиническому проявлению болезни и устойчивости к физико-химическим факторам имеется некоторое сходство с последним. Отличие заключается в том, что при язвенном дерматите отмечают деструкцию тканей кожи и подкожной клетчатки с влажными гранулирующими язвами. Язвенный дерматит обычно наблюдают зимой у взрослых овец, в том числе и у ранее переболевших или вакцинированных против контагиозной эктимы. Язвенный дерматит — относительно редкое заболевание. В Советском Союзе оно до настоящего времени не регистрировалось.

Ретроспективная диагностика при контагиозной эктиме не разработана и считается малоперспективной.

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА

Для этой цели рядом исследователей использовался неослабленный натуральный вирус, полученный от больных животных. Высушенный вируссодержащий струп или корки измельчают в порошок и суспендируют в 50%-ном водном растворе глицерина в соотношении 1 : 100. Такую вакцину прививают методом аппликации в скарифицированный участок кожи внутренней поверхности бедра. Вакцинация считается успешной, если на месте прививки развивается местный воспалительный процесс, сопровождающийся образованием папул, везикул, пустул и струпа. Иммунитет появляется через 2—3 недели после вакцинации.

В Советском Союзе аналогичную вакцину приготовил и использовал в широких производственных опытах К. Н. Бучнев с сотрудниками (1965—1968 гг.). Для подавления секундарной микрофлоры, всегда в изобилии имеющейся в струпе от больных (или экспериментально зараженных) животных, в такую вакцину добавляются антибиотики (пенициллин и стрептомицин). В результате широких производственных опытов установлено, что при двукратной вакцинации с интервалом 7—10 дней эффективность значительно выше, чем при однократном применении глицеринизированной вакцины из неослабленного нативного вируса.

Недостатками жидкой глицеринизированной вакцины из нативного (корочного) вирусного материала являются: несовершенство технологии приготовления, нестерильность исходного вирусного материала, нестандартность препарата и, наконец, небольшой срок годности. Местная и общая реакция на прививку глицеринизированной вакцины такая же, как и на заражение суспензией вирусного материала от больного животного.

Некоторым исследователям удавалось культивировать вирус контагиозной эктимы в различных первичных и перевиваемых культурах клеток. Г. К. Ковалев, В. Н. Сюрин, З. И. Зуева, П. П. Самойлов и др. (1967, 1968), Ц. Ц. Хандуев и сотр. (1967) провели исследования по созданию сухой культуральной вакцины против контагиозной эктимы и разработке мер борьбы с этим заболеванием.

Установлено, что лиофильновысушенный культуральный вирус по иммуногенности не уступает исходному нативному (корочному) вирусу. Сухие культуральные вакцины не имеют недостатков, присущих жидким глицеринизированным вакцинам из корочного вируса. Наиболее эффективным является метод вакцинации путем введения вакцины под слизистую губы. При этом методе у привитых животных создается более напряженный и более продолжительный иммунитет по сравнению с общепринятым методом иммунизации аппликацией на скарифицированную кожу. Введение вакцин под слизистую губ обеспечивает приобретение наибольшей резистентности тех тканей, которые в естественных условиях чаще всего подвергаются инфицированию. Это особенно важно при данном заболевании, поскольку иммунитет при контагиозной эктиме носит тканевый характер, а его напряженность и продолжительность в различных участках покровов животного неодинакова.

Серологическая оценка поствакцинального иммунитета не нашла применения и практически нецелесообразна, так как уровень накопления специфических антител у иммунизированных животных низок.

ВИРУСНЫЙ АБОРТ ОВЕЦ
(ENZOOTIC ABORTION IN EWAS)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Вирусный аборт овец (энзоотический аборт овец, вирусный плацентит овец) — контагиозная энзоотическая болезнь, проявляющаяся преимущественно абортами в последние дни суягности или преждевременным окотом. Возбудитель — вирус группы орнитоза-лимфогранулемы-трахомы (ОЛТ). Принадлежность его к группе ОЛТ определил в 1950 г. Стемп с сотр. (Шотландия). Несколько позже идентичная природа энзоотического аборта овец была установлена и в других странах.

Можно предположить, что эта инфекция распространена на всех континентах, но отсутствие сведений по некоторым странам объясняется, по-видимому, недостаточным вниманием исследователей к этой проблеме.

Вирусный аборт протекает в виде энзоотий. В период окота число заболевших овец увеличивается. В неблагополучных отарах абортируют от 5 до 30, а иногда до 70% суягных овец. Значительное количество ягнят рождаются нежизнеспособными.

В естественных условиях инкубационный период продолжается от нескольких месяцев до года, в эксперименте — 5—7 недель. Длительность его обусловлена периодом суягности овец, вирулентностью, дозой и методом введения вируса. Вирусный аборт протекает в скрытой и типичной формах. Животных со скрытым течением болезни выявляют в РСК. Такие животные могут нормально окотиться, однако в плодовых оболочках и выделениях из половых органов можно обнаружить вирус. Эти животные могут длительное время являться разносчиками возбудителя. Типичное течение болезни характеризуется абортами и преждевременным окотом, появлением слабых, нежизнеспособных и плохо развивающихся ягнят. Главным признаком неблагополучия овцефермы в отношении вирусного аборта можно считать присутствие в хозяйстве слабых и плохо развивающихся ягнят при нормальных условиях содержания и кормления животных. Аборты у суягных овцематок наблюдаются обычно за 2—3 недели до окончания нормального срока суягности.

За несколько дней до аборта у больных овец повышается температура тела, появляются слизистые, а затем слизисто-гнойные выделения из половых органов. Овцематки, абортировавшие мертвые плоды, часто находятся в тяжелом состоянии и гибнут.

У абортированных плодов находят кровянистые отеки и кровоизлияния в подкожной клетчатке и мышцах, а также кровянисто-серозные трансудаты в грудной и брюшной полостях, фибринозные налеты, особенно на печени. Плодные оболочки отечны, с геморрагическим инфильтратом, в некоторых местах с белыми наслоениями, некротическими очагами. Нередко абортированный плод мумифицирован. Поверхность хориона бугриста, котиледоны темно-красного или коричневого цвета, вокруг них скопления кровянистого экссудата. Некоторые котиледоны некротизированы. После выкидыша у овцематок наблюдается задержка плаценты, развитие хронических метритов. Выздоравливают больные животные медленно, а у некоторых процесс принимает хроническое течение.

ВИРУС

Возбудитель вирусного аборта овец относится к группе орнитоза-лимфогранулемы-трахомы (ОЛТ); таксономическое положение этой группы окончательно не определено. Известно более 30 представителей этой группы, объединенных общим названием крупные (атипичные) вирусы, которые И. И. Терских (1966) относит к классу крупных вирусов семейства хламидии.

Вирус имеет сложный, многофазный цикл развития с образованием коккоидных элементарных телец (вирионы) размером от 0,2 до 0,5 мк. Вирионы находятся внутри или вне клеток и располагаются одиночно или группами.

Внутриклеточный цикл развития возбудителя имеет разные стадии: от крупных гомогенных блябек до мелких (250—300 ммк в диаметре) элементарных телец, так называемых зрелых, или инфекционных, частиц. Промежуточными формами, или незрелыми, являются крупные частицы размером от 0,5—1 мк, которые не имеют нуклеоида и не обладают инфекционностью.

Элементарные тельца окрашиваются по Романовскому—Гимза в сине-фиолетовый цвет, а ранние, или крупные, формы — в красновато-фиолетовый; по Маккиавелло в ярко-красный цвет окрашиваются элементарные тельца, а ранние формы — в голубой и сине-зеленый цвет.

Цикл развития вируса начинается после его адсорбции, проникновения в клетку и последующей дезинтеграции частицы.

Устойчивость. Вирус разрушается при нагревании в течение 30 минут при 50°, за 1 минуту — при 70°; сохраняет активность после воздействия на него эфиром в течение 1 часа. В условиях комнатной температуры в темноте он сохраняет активность 96 часов; при 37° — 48—72 часа; при 4—6° — до 1—2 месяцев; при минус 20° — в течение года (при отсутствии посторонней микрофлоры).

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. При хранении в обычном рефрижераторе вируссодержащие ткани необходимо помещать в фосфатный буфер (pH 7,4—7,6) или в бульон. При хранении в физиологическом растворе или 50%-ном глицерине вирус разрушается значительно быстрее. Вирус чувствителен к тетрациклину, биомицину, ауреомицину, хлорамфениколу. Стрептомицин и пенициллин оказались неэффективными в отношении этого возбудителя (1000—2000 ЕД/0,3 мл). Пенициллин лишь временно подавляет развитие возбудителя в курином эмбрионе. Сульфамидный препарат кинекс также не оказывает вирулицидного действия (Д. Б. Оболодзе, 1969).

Д. Огняновым (1967) установлено, что вирус под влиянием пенициллина (100 ЕД/мл) при культивировании в куриных эмбрионах изменяется: элементарные тельца с 8—9-го пассажей приобретают палочковидную форму. Вариантный штамм утрачивает комплементфиксирующую активность и становится непригодным при получении антигена для РСК.

Локализация в организме. Вирус локализуется главным образом в плодовых оболочках и плоде. Его можно обнаружить в легких, печени, селезенке.

Антигенные свойства и антигенная структура. Вирус обладает токсическими свойствами. Он имеет два антигена, реагирующие в реакции связывания комплемента (РСК): термостабильный, групповой, специфически реагирующий со всеми возбудителями этой группы, и термолабильный — видоспецифический, реагирующий только с сыворотками в отношении гомологичного возбудителя. В РСК с групповым антигеном установлено антигенное родство этого вируса с возбудителями орнитоза, энзоотической вирусной пневмонии свиней, пневмонии коз и др. Видоспецифический антиген не стоек и обнаруживается труднее, чем у других представителей этой группы. Его удается экстрагировать из инфицированного желточного мешка куриного эмбриона или из плодовых оболочек абортированного плода. Титр антигена зависит от титра вируса в желточном мешке.

Иммунобиологические свойства. Инфицированные овцы, как правило, абортируют только раз. В дальнейшем их суягность проходит нормально, и обычно они свободны от инфекции. Это свидетельствует о том, что вслед-

ствие инфекции овцы приобретают стойкий иммунитет. Ягнята не приобретают стойкого иммунитета. Вирус у них может находиться в органах в латентном состоянии и нередко вызывает аборт при первой суягности. Такие животные служат причиной длительного сохранения инфекции в отарах.

Гемагглютинирующие свойства. В аллантоисной полости или взвеси желточных мешков инфицированных куриных эмбрионов установлен свободный гемагглютинин, который в условиях лаборатории используют в реакции задержки гемагглютинации. Д. Огняновым (1968) разработана методика гемагглютинации этого вируса с 1%-ной суспензией эритроцитов крови мышей при pH 6,4—7,2 и температуре 37°, а также с эритроцитами крови крыс, зайца, морской свинки, овцы. Реакция проявляется в первые 2 часа, наивысший титр ее — 1 : 640. Чувствительность РГА с данным вирусом зависит от температуры и pH среды.

Спектр патогенности. В естественных условиях вирус патогенен для овец. При экспериментальном заражении суягных маток у них развивается характерный для данной инфекции патологический процесс, и через 5—7 недель происходят аборты.

При экспериментальном заражении (внутривенно, в вымя) к вирусу аборта овец восприимчивы коровы. В естественных условиях неизвестны случаи заражения коров от овец и наоборот. Относительно патогенности вируса аборта овец для лабораторных животных мнения противоречивы. Белые мыши весьма чувствительны к данному вирусу при разных способах заражения. При введении в мозг 10%-ной вируссодержащей суспензии желточного мешка мыши заболевают через 48—72 часа и в 30—40% случаев погибают через 8—11 суток. При вскрытии в мозгу их находят множественные кровоизлияния и расширение сосудов. При интраназальном, внутримышечном и внутрибрюшинном способах заражения 60—80% мышей погибают на 6—8-е сутки. При вскрытии их находят увеличение печени, селезенки, геморрагии в легких. Беременные морские свинки, как правило, абортируют. При вскрытии животных, павших после внутрибрюшинного заражения, в брюшной полости отмечают значительное скопление экссудата, окрашенного в темно-коричневый цвет; печень увеличенная.

В мазках-отпечатках паренхиматозных органов и мозга регулярно обнаруживают скопления элементарных телец. Приготовленная из органов павших животных 10%-ная взвесь вызывает гибель куриных эмбрионов на 5—6-й день при заражении в желточный мешок.

При интраназальном заражении морские свинки выживают, однако все самки, бывшие после этого в случке, абортируют. В сыворотке как плода, так и матери обнаруживают специфические антитела, а из органов абортированного плода при первичном заражении куриных эмбрионов удается изолировать возбудитель. Беременные крысы также чувствительны к данному вирусу при заражении интравенозно, внутрибрюшинно, а также в полость матки.

Некоторые штаммы вируса аборта овец обладают токсическими свойствами, которые устанавливаются внутривенным заражением белых мышей. Токсические свойства этого вируса определяют непосредственно после вскрытия эмбрионов во взвеси желточных мешков, приготовленной на мартеновском бульоне, и разводят ее в отношении 1 : 10, 1 : 20. Взвесь вводят белым мышам весом 10—12 г внутривенно по 0,5 мл и наблюдают за ними 24 часа, отмечая время гибели каждой мыши.

Культивирование вируса в лабораторных условиях. Вирус можно культивировать в организме белых мышей, вводя материал в носовую полость, в развивающихся куриных эмбрионах при заражении в желточный мешок, в первичной культуре куриных фибробластов и перевиваемой культуре почки овцы (ПО — 2) без проявления цитопатогенного действия.

При культивировании возбудителя энзоотического аборта овец добавление пенициллина к заражающему материалу ведет к появлению морфологически измененных вирионов (элементарных телец). Последние вместо овальных становятся палочковидными. Вируссодержащий материал с подобными формами элементарных телец непригоден для изготовления комплементфиксирующего антигена (Д. Огнянов, 1969), хотя он и сохраняет патогенность для куриных эмбрионов.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Лабораторную диагностику вирусного аборта овец проводят на основании: результатов вирусологического обследования (выделение вируса из органов абортировавшей овцы и абортированного плода на куриных эмбрионах, животных и в культуре клеток с последующей идентификацией выделенного возбудителя по основным свойствам, характерным для возбудителей группы ОЛТ);

морфологической идентификации (микроскопия мазков-отпечатков и гистологических срезов из органов абортировавшей овцы и абортированного плода, особенно из плодных оболочек);

серологического обследования (РСК со специфическим и групповым антигенами, РТГА, реакция нейтрализации вируса и непрямой метод иммунофлуоресценции).

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материала. В качестве исходного материала для выделения вируса используют плацентарную ткань абортировавшей овцы, вагинальный секрет, паренхиматозные органы плода. Взятый материал заливают фосфатным буфером или бульоном и пересылают в лабораторию в термосе со льдом.

Патологический материал гомогенизируют в мартеновском бульоне (pH 7,4) в отношении 1 : 10, добавляют стрептомицин (500 ЕД/мл) и после 2-часового отстоя надосадочную жидкость используют для заражения куриных эмбрионов или белых мышей.

Выделение вируса на куриных эмбрионах. Исследуемую взвесь инокулируют в желточный мешок 5—6-дневных или в аллантоисную полость 9-дневных куриных эмбрионов. В желточный мешок вводят 0,3 мл испытуемого материала (10%-ную взвесь плаценты абортировавшей овцы и органов). Можно использовать также и заражение в аллантоисную полость. Этот способ позволяет получить значительное количество элементарных телец в прозрачной среде, почти лишенной клеточных элементов.

Зараженные эмбрионы инкубируют при 36,5—37° в течение 8—9 дней. Если в инокуляте был вирус, зараженные эмбрионы на 4—6-е сутки становятся слабоподвижными и через 5—7 дней погибают в 50—70% случаев.

При выделении вируса вначале необходимо проводить «слепые» пассажи, вскрывая зараженные эмбрионы на 6—7-е сутки. Перед вскрытием их в течение 1—2 часов охлаждают (при 4—5°) и, вскрывая, собирают желточные мешки. В случае инфицирования у эмбрионов отмечаются подкожные геморрагические поражения, главным образом в области головы, шеи и верхней части туловища. Оболочка желточного мешка гиперемирована. Обычно

бывает достаточно 5—6 серийных пассажей для возрастания титра вируса до 10^6—10^7 LD_{50}/мл.

При нанесении вируса непосредственно на хориоаллантоисную оболочку 10—12-дневных куриных эмбрионов через 2—5 дней на месте инокуляции образуются оспиноподобные изменения с преимущественным поражением эктодермального слоя, тогда как мезодермальный слой почти не изменяется. В мазках-отпечатках из зараженной оболочки обнаруживаются элементарные тельца уже через 34 часа после заражения.

В аллантоисной полости и на хориоаллантоисной оболочке 9-дневных куриных эмбрионов накопление вируса происходит медленнее, гибель их наступает на 9—12-й день после заражения; иногда часть из них выживает до вылупления цыплят.

Выделение вируса в культуре клеток. Чаще всего для этого используют культуру клеток куриных фибробластов, хотя лучшей является перевиваемая культура почки овцы. Монослой заражают 10%-ной взвесью вируссодержащего желточного мешка. Вирус адсорбируют при 37° в течение 2—3 часов, затем тщательно смывают вируссодержащий материал с клеток и наливают одну из употребляемых питательных сред (среду 199 с добавлением 10% бычьей сыворотки или среду с гидролизатом лактальбумина на растворе Хенкса).

Для изучения морфологии вируса можно брать куриные фибробласты, почки свиней, почки обезьяны, почки овец, СОЦ и L-клетки. Накопление вируса в культуре выявляют как микроскопией окрашенных препаратов с подсчетом количества инфицированных клеток, так и титрованием на 6-дневных куриных эмбрионах при заражении в желточный мешок. Титр культурального вируса в этом случае часто достигает —10^7—10^8 $ЕЛД_{50}$/0,3 мл.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Если в результате повторных пассажей куриные эмбрионы при заражении в желточный мешок гибнут на 4—6-й день, а белые мыши при внутрибрюшинном заражении — на 7—9-й день, то можно считать, что вирус адаптирован. Необходимо провести еще раз полный бактериологический контроль взвеси желточных мешков или соответствующих органов животного, а затем идентификацию вируса. Для этого определяют спектр патогенности вируса для белых мышей и других лабораторных животных при разных путях заражения.

Для выявления токсических свойств вируса свежеприготовленную 20%-ную взвесь желточной культуры в дозе 0,5 мл вводят внутривенно 10 белым мышам весом 12 г. В результате токсического действия вируса мыши погибают в течение первых 16—24 часов. Более поздняя гибель животных обусловлена развивающейся инфекцией. Используя антитоксическую сыворотку, можно идентифицировать вирус в реакции нейтрализации токсичности.

Вирусоскопическое исследование проводят с целью морфологической идентификации по обнаружению элементарных телец в мазках-отпечатках из желточного мешка (при культивировании в курином эмбрионе), или же в органах инфицированных животных, или в культуре клеток.

Культуру клеток для этого выращивают на покровных стеклах, заражают и исследуют в различные сроки после заражения, фиксируя кислым спиртом (19 частей абсолютного этилового спирта и 1 часть ледяной уксусной кислоты). После фиксации покровные стекла промывают в трех сменах буфера Мак Илвейна (pH 3,8) по 1 минуте и окрашивают в течение 5 минут в растворе акридина оранжевого (1 : 30 000). Затем их снова отмывают в трех сменах свежего буфера Мак Илвейна и после легкого подсушивания покровное стекло с монослоем помещают на предметное стекло и заклеивают края расплавленной смесью воска и парафина. Приготовленные препараты просматривают в люминесцентном микроскопе (МЛ-2). Обычно в цитоплазме пораженных клеток включения вируса обнаруживаются в виде округлых образований ярко-красного или желто-зеленого свечения, в зависимости от синтеза ДНК, т. е. зрелости возбудителя.

После созревания возбудителя пораженная клетка разрушается, а элементарные тельца выходят в межклеточное пространство, где они и могут быть некоторое время видны. Цикл развития вируса в культуре клеток занимает около 48—96 часов, в зависимости от типа клеток (И. И. Терских, Д. Б. Оболадзе, 1968).

Элементарные тельца обнаруживают как в цитоплазме клеток, так и внеклеточно, но в ядрах вирус не находят. В цитоплазме элементарные тельца могут быть одиночными или сгруппированы.

Серологическая идентификация

Серологическую идентификацию вируса аборта овец проводят обычно в РСК, РН вируса, используя известную иммунную сыворотку и антигены, а также сыворотку к выделенному вирусу в РТГА, реакции микроагглютинации и реакции иммунофлуоресценции. Серологические реакции при аборте овец ведут в соответствии с существующей инструкцией по серологическим исследованиям при орнитозе.

Для этого животных иммунизируют 10%-ной взвесью вируссодержащих желточных мешков. Морским свинкам и кроликам взвесь вводят внутрибрюшинно в дозе 2 мл через каждые три дня, примерно в течение месяца. Петухов иммунизируют тремя циклами с интервалом в четыре дня. Каждый цикл состоит из трех ежедневных инъекций. Первую неделю петухов иммунизируют внутримышечно (по 1 мл), вторую неделю — внутрибрюшинно (по 2 мл) и третью неделю — внутримышечно (по 2,5 мл).

Через 2—4 недели после окончания иммунизации берут кровь из сердца и исследуют сыворотку в РСК и в других реакциях с ан-

тигеном вируса аборта овец. При наличии в иммунной сыворотке антител, реагирующих с известным гомологичным антигеном или с антигеном орнитоза, можно считать данный вирус антигенно-принадлежащим к группе ОЛТ.

Реакция нейтрализации. Корреляция между титрами антител в РСК и РН наблюдается редко, между тем РН можно с успехом использовать для диагностики вирусного аборта овец в очаге инфекции. Она специфична с антигеном аборта овец, поскольку lg индекса нейтрализации равен 1,85—2,65 и нулевое значение имеет с возбудителями орнитоза и трахомы (Д. Б. Оболадзе, 1969). При помощи данной реакции идентифицируют выделенный вирус или определяют титр вируснейтрализующих антител в сыворотках переболевших животных (ретроспективная диагностика). Для этого используют заведомо известный антиген, содержащий вирус аборта овец (например, 10%-ная взвесь желточного мешка). Реакцию ставят общепринятым методом на куриных эмбрионах или лабораторных животных в зависимости от патогенности штамма.

Испытуемые сыворотки берут в постоянном разведении, а вирус аборта овец разводят от 10^{-1} до 10^{-9}. Для каждого опыта нейтрализации готовят свежую вируссодержащую желточную взвесь с титром, равным 10^6—10^7 $ЕЛД_{50}$/0,3 мл. Для удаления ингибиторов все сыворотки (испытуемые, иммунные и нормальные) прогревают 30 минут при температуре 56—58°. Вирус разводят физиологическим раствором, к каждому разведению в объеме 0,6 мл добавляют 0,6 мл иммунной сыворотки петуха, а также испытуемые сыворотки переболевших овец, которые в РСК и РТГА дают положительные результаты (с титром 1 : 32—1 : 80). Контролем служат смеси вируса с нормальной сывороткой петуха и овцы. Контакт вируса с сывороткой — 2 часа при 37°, после чего каждым разведением вируса заражают по четыре куриных эмбриона в желточный мешок (по 0,3 мл). Одновременно аналогичным методом титруют исходную вируссодержащую взвесь. Результаты реакции нейтрализации учитывают на 14-й день, определяют индекс нейтрализации с каждой сывороткой по методу Рида и Менча. Логарифм индекса нейтрализации, равный 2 единицам, является достоверным показателем специфической нейтрализации, и такая сыворотка считается положительной.

При наличии в лаборатории известной антитоксической сыворотки ее можно использовать в реакции нейтрализации токсичности для идентификации выделенного вируса.

Реакция связывания комплемента — один из основных методов диагностики болезни, относящийся к группе ОЛТ. Данную реакцию ставят с целью ретроспективной диагностики вирусного аборта овец по методике, используемой для представителей группы орнитоз-лимфогранулема-трахома.

Постановка реакции. *Титрование комплемента:* комплемент последовательно разводят в пробирках: 1 : 10, 1 : 15, 1 : 20,

1 : 25, 1 : 30, 1 : 35, 1 : 40, 1 : 50, 1 : 60, 1 : 70, 1 : 80, 1 : 90, 1 : 100, 1 : 120, 1 : 140, 1 : 160, 1 : 240.

В пробирки другого ряда вносят по 0,2 мл комплемента (с разведения 1 : 240 до разведения 1 : 10).

В реакции используют пробирки второго ряда. В каждую пробирку этого ряда добавляют по 0,4 мл физиологического раствора и 0,4 мл гемолитической системы. Штатив хорошо встряхивают и оставляют в водяной бане при 37° на 30 минут. Отсчитывают пробирку с полным гемолизом, которая соответствует титру комплемента (Per se). Если эта пробирка содержит разведение комплемента 1 : 100, то за титр его берут 1 : 80.

Титрование комплемента в присутствии антигена. Из исходного разведения комплемента 1 : 80 делают новое титрование комплемента. Готовят новый ряд из 10 пробирок, причем в каждую из них вносят соответствующее количество комплемента (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1

Компоненты	Номера пробирок									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Комплемент	0,024	0,032	0,040	0,048	0,056	0,064	0,072	0,08	0,088	0,096
Физиологический раствор	0,076	0,068	0,060	0,052	0,044	0,036	0,028	0,02	0,012	0,004
Антиген	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1

Пробирки помещают на 1 час в водяную баню (37°) и добавляют гемолитическую систему, по 0,2 мл в каждую пробирку, после чего их опять ставят на 30 минут в водяную баню (37°). Затем отсчитывают пробирку с полным гемолизом (что соответствует титру комплемента в присутствии антигена). Например, если произошел гемолиз в четвертой пробирке, следовательно, титр комплемента составляет 0,048.

После титрования комплемента в присутствии антигена определяют то разведение комплемента, при котором в объеме 0,1 мл содержатся 2 его единицы. Определение ведут по формуле: $0{,}048 \times 2 : 80 = 0{,}1 : x$, исходя из титра 0,048:

$$x = \frac{80 \cdot 0{,}1}{0{,}048 \cdot 2} = 83{,}33 .$$

Полученное число показывает то необходимое разведение комплемента (1 мл цельного комплемента + 83,33 мл физиологического раствора), при котором в 0,1 мл разведенного таким образом комплемента содержится 2 единицы комплемента.

При любом методе постановки РСК необходимо предварительно определить титр комплемента, пользуясь расчетной таблицей 2 (Стэмп, 1951; Д. Оганянов, 1964; И. И. Терских, 1957).

Гемолитическая система — это смесь равных количеств 3%-ной взвеси эритроцитов крови барана и гемолитической сыворотки,

взятой в трехкратном титре (разведения готовят на физиологическом растворе).

Постановка реакции. Сыворотки инактивируют 30 минут при 60° в водяной бане, после чего разводят их от 1 : 4 до 1 : 32 и выше. Из каждого разведения их берут по 0,1 мл на пробирку и добавляют к ним по 0,1 мл антигена (2 АЕ) и 0,1 мл (КЕ) комплемента. Штатив встряхивают, ставят на 1 час в водяную баню (37°), после чего в каждую пробирку вносят по 0,2 мл гемолитической системы; штатив ставят на 30 минут в водяную баню (37°) и затем учитывают результаты реакции. Второй раз результат реакции учитывают через 18—20 часов.

ТАБЛИЦА 2

Таблица расчета комплемента в зависимости от его титра

Титр комплемента	№ пробирок									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
20	41,67	31,25	25	20,83	17,86	15,62	13,89	12,43	11,36	10,42
25	52,08	39,06	31,25	26,03	22,32	19,52	17,36	15,53	14,20	13,02
30	62,50	46,87	37,50	31,25	26,78	23,44	20,83	18,75	17,05	15,62
35	72,91	54,68	43,75	36,46	31,25	27,32	24,30	21,87	19,88	18,23
40	83,33	62,50	50	41,67	35,71	31,25	27,78	25	22,72	20,83
45	93,75	70,31	56,75	40,88	40,18	35,15	31,25	28,13	25,56	23,43
50	104,16	78,13	62,50	52,08	44,64	39,06	34,72	31,08	28,41	26,04
60	125	93,75	75	62,5	53,57	46,88	41,66	37,50	34,09	31,25
70	145,83	109,97	87,5	72,91	62,50	54,64	48,61	43,75	39,77	39,46
80	166,66	125	100	83,33	71,43	62,50	55,55	50	45,45	41,66
90	187,50	140,62	112,50	93,75	80,36	70,31	62,50	56,25	51,13	46,87
100	208,33	156,25	125	104,16	89,28	78,12	69,44	62,15	56,82	52,08
120	250	187,50	140	125	107,14	93,76	83,32	75	68,18	62,50
140	291,66	218,74	175	143,82	125	109,28	97,22	87,50	79,54	72,92
160	233,32	250	200	166,66	142,86	125	111,10	100	99,90	83,32
180	275	281,24	225	187,50	160,72	140,67	125	112,50	102,56	93,74
200	416,66	312,50	250	208,32	178,56	156,24	138,88	124,3	113,64	104,16
220	248,33	343,75	265	229,16	126,42	171,88	152,76	137,15	125	114,58
240	500	375	280	250	214,28	187,52	166,64	150	136,36	62,50
260	541,66	406,25	325	260,82	232,13	203,12	180,54	187,50	147,73	135,41

Примечание. Для каждой реакции ставят контроли: с известной положительной сывороткой; с известной отрицательной сывороткой; контроль на антикомплементарные свойства каждой сыворотки; контроль антигена в присутствии и отсутствии комплемента.

Положительная сыворотка и контроль антигена без комплемента должны показать полную задержку гемолиза. Отрицательная сыворотка, контроль испытуемых сывороток и контроль антигена с комплементом должны дать полный гемолиз. Положительной реакцию считают только в том случае, если в разведении сыворотки не ниже чем 1 : 8 будет задержка гемолиза на ++ и выше.

Приготовление антигена для реакции связывания комплемента. Антиген готовят из вируссодержащих желточных мешков по методике, принятой при изготовлении ан-

тигена из возбудителя орнитоза. Растирают в ступке желточные мешки, превращая их в густую взвесь, и кипятят 30 минут. После охлаждения к суспензии добавляют эфир в соотношении 1 : 10 и помещают в холодильник на 24 часа. Прозрачный желтый слой (эфирная фракция) осторожно отсасывают и из него отгоняют эфир. Через 20—30 минут на дне колбы образуется жирный желтый осадок, к которому добавляют химически чистый теплый (55°) ацетон в соотношении 1 : 10 и смесь выдерживают при 57° в течение 1 часа. Затем ацетон осторожно отсасывают пипеткой, а остатки его удаляют при помощи вакуумного насоса. Осадок разводят буфером pH 7,2 в соотношении 1 : 5 и добавляют мертиолят (до конечной концентрации 1 : 10 000), после чего антиген готов к употреблению (В. И. Червонский, О. М. Попова, 1959).

Получение иммунной сыворотки описано выше.

Динамика комплементсвязывающих антител. В первые 10 дней после аборта титр комплементсвязывающих антител у овцематок колеблется в пределах от 1 : 8 до 1 : 256. В 1—2-й месяц после аборта он достигает максимального уровня 1 : 512 (1024); через 3—4 месяца постепенно снижается и к 6—7-му месяцу составляет 1 : 8—1 : 16. Высота титра зависит от срока заражения беременных животных. В течение 2—3 месяцев после аборта титры антител в РСК и РТГА коррелируют у одних и тех же животных. Через 6—7 месяцев после аборта более четкие результаты (до 60% исследованных проб сыворотки) дает реакция торможения гемагглютинации.

Непрямая реакция связывания комплемента. В крови животных многих видов при орнитозе и других инфекциях группы ОЛТ накапливаются «непрямые» антитела, которые не фиксируют комплемент при образовании специфического комплемента — антиген — антитело. Чтобы выявить этот комплекс (в случае положительной реакции), в реакцию вводят известную иммунную сыворотку, которая в этом случае не вступает в реакцию с антигеном, и тогда оставшийся свободным комплемент вызывает гемолиз эритроцитов. При непрямой РСК полный гемолиз эритроцитов соответствует положительной четырехкрестовой реакции, т. е. обратно тому, что наблюдается при обычной РСК.

Если в изучаемой сыворотке нет антител, то введенная позже иммунная сыворотка вступает в реакцию с антигеном, связывает комплемент, в результате чего происходит задержка гемолиза.

Исследуемые сыворотки обрабатывают, как и для РСК. Учет ведут также по четырехкрестовой системе, но в обратном порядке: при гемолизе реакция оценивается как положительная, а при полной задержке гемолиза она отрицательная.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). В качестве антигенов для РГА и РТГА можно использовать взвесь инфицированных желточных мешков после их соответствующей обработки, надосадочную жидкость (супернатант) взвеси инфицированных желточных мешков, стандартный антиген для РСК.

Из инфицированных желточных мешков готовят 20%-ную взвесь на буферном физиологическом растворе с pH 7,1 и 0,4% формалина. Взвесь инкубируют при 37° в течение 24 часов, после чего 1 объем ее разводят 4 объемами буферного физиологического раствора, содержащего 0,2% формалина. Взвесь осаждают добавлением 0,5%-ного раствора калиево-алюминиевых квасцов. Полученная таким путем надосадочная жидкость является гемагглютинирующим антигеном.

В качестве второго антигена используют слой надосадочной 10%-ной вирусной взвеси после центрифугирования при 6000 об/мин в течение 1 часа (Д. Огнянов) или 10 000 об/мин (И. И. Терских с соавт., 1969).

Антиген для РСК готовят по вышеописанной методике. В реакции используются эритроциты крови мышей или кур, которые готовят на фосфатнобуферном физиологическом растворе pH 6,4—7,2 или на растворе Мак Илвейна pH 7,0 (1 часть) с добавлением физиологического раствора (4 части).

Приготовление рабочих растворов. Гемагглютинирующие антигены вируса энзоотического аборта овец высокочувствительны к pH среды. При исследовании антигенов в РГА используют следующие растворы: физиологический раствор pH 7,0, фосфатный буфер и раствор Мак Илвейна равных pH (5,0—9,0). Растворы готовят из химически чистых солей.

Постановка реакции. Реакцию ГА ставят в объеме 0,8 мл. В ряд лунок плексигласовой панели разливают по 0,8 мл раствора Мак Илвейна pH 7,0 (см. табл. 3). Затем в первую лунку вносят 0,4 мл антигена и после перемешивания переносят градуированной пипеткой или шприц-пипеткой последовательно из одной лунки в другую по 0,4 мл. К двукратным разведениям антигена добавляют по 0,4 мл рабочей взвеси куриных эритроцитов. При постановке контроля на спонтанную агглютинацию к 0,4 мл раствора Мак Илвейна pH 7,0 добавляют 0,4 мл рабочей взвеси куриных эритроцитов. После тщательного встряхивания панели ставят на 40—60 минут в термостат при 37°. При выборе оптимальных условий постановки РГА и РТГА гемагглютинирующую активность антигенов проверяют в термостате (37°), при комнатной температуре (20—22°) и в рефрижераторе (4°).

Гемагглютинацию оценивают по форме осадка эритроцитов по четырехкрестовой системе. При положительной РГА можно видеть на дне пробирок осадок эритроцитов в форме открытого зонтика. Лучше РГА протекает при 37° с антигеном II (до 1 : 1280) (Д. Огнянов, 1963 *) и III (до 1 : 1280) (Березина, Оболадзе, Терских, 1970). Реакция длится 2—2½ часа и учитывается макро- и микроскопически.

* Данные Д. Огнянова относятся к РГА с мышиными эритроцитами в 1%-ной концентрации. Автор считает, что антиген I (взвесь инфицированных желточных мешков) реагирует со всеми эритроцитами, но с мышиными, кроличьими и овечьими — лучше.

ТАБЛИЦА 1

Схема постановки реакции гемагглютинации с вирусом аборта овец

Ингредиенты	Разведение антигена							
	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1280
Буферный раствор Мак Илвейна pH 7,0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Антиген	0,4, в каждую следующую лунку переносят по 0,4 мл, из последней 0,4 мл удаляют							
0,75%-ная взвесь куриных эритроцитов на растворе Мак Илвейна pH 7,0	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Результаты реакции	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	+++	++	++

При помощи реакции торможения гемагглютинации можно исследовать сыворотки естественно и искусственно инфицированных овец. Контролем могут служить гипериммунные сыворотки кроликов. Для постановки реакций используют стандартный специфический антиген для РСК, специфическую контрольную и нормальную сыворотки, раствор Мак Илвейна (pH 7,0), 0,75%-ную взвесь куриных эритроцитов (предварительно проверенных на отсутствие неспецифической гемагглютинации).

Получение сывороток (см. стр. 303).

Обработка сывороток. Сыворотки животных перед исследованием в РТГА обрабатывают куриными эритроцитами и каолином для удаления ингибиторов и устранения спонтанной агглютинации. Для этого к 0,2 мл цельной сыворотки добавляют 0,8 мл 10%-ной взвеси эритроцитов, приготовленных на растворе Мак Илвейна (pH 7,0). Смесь встряхивают 10—15 минут и центрифугируют 10 минут при 2000 об/мин. Затем к надосадочной жидкости добавляют 1 мл 25%-ной взвеси каолина, приготовленной на том же растворе. Смесь снова встряхивают в течение 10—15 минут и центрифугируют 15 минут при 2000 об/мин. Надосадочная жидкость (приблизительно 1,5 мл) представляет собой обработанную сыворотку в разведении 1 : 10.

Сыворотки овец предварительно обрабатывают 10%-ной взвесью куриных эритроцитов, а затем после двукратного разведения — раствором Мак Илвейна их прогревают в течение 30 минут при 56° в водяной бане.

Для РТГА берут рабочую дозу антигена, равную 4 АЕ (исходя из его титра), и ставят контроль рабочей дозы по схеме (табл. 4).

Постановка реакции торможения гемагглютинации. Для определения титра антигемагглютининов в испытуемых сыворотках готовят двукратные разведения их от 1 : 10 до 1 : 640 и выше общепринятым методом (табл. 5) и в каждую лунку добавляют по 0,2 мл рабочего разведения антигена, содержащего 4 АЕ. После встряхивания панель ставят для контакта на 2 часа при 37°. После этого в каждую лунку добавляют по 0,4 мл 0,75%-ной взвеси куриных эритроцитов и снова ставят в термостат при 37° на 1 час.

Титром испытуемой сыворотки считают ее наивысшее разведение, вызывающее полную или почти полную задержку гемагглю-

тинации с 4 АЕ. Положительными считают результаты, если исследуемые сыворотки показывают торможение гемагглютинации не ниже 1 : 40; слабоположительными считают разведение 1 : 20, а сомнительным — 1 : 10. Сыворотки животных, вызывающие подавление гемагглютинации в разведении начиная с 1 :20 при отрицательном результате в контроле (с нормальной сывороткой), считают специфическими.

ТАБЛИЦА 4

Схема контроля рабочей дозы антигена с титром 1 : 160

Ингредиенты	Дозы антигена			
	4 АЕ	2АЕ	1 АЕ	0,5 АЕ
Раствор Мак Илвейна	—	0,4	0,4	0,4
Разведенный антиген 4 АЕ (1 : 40)	0,4	0,4 →	0,4 →	0,4 →
		Начиная со второй лунки переносят 0,4 мл в третью и т. д., делая двукратные разведения		
Рабочее разведение эритроцитов	0,4	0,4	0,4	0,4
Результаты реакции	++ ++	++ ++	++ ++	0

Примечание. 0,4 мл антигена содержит 4 АЕ. РТГА ставят с точно оттитрованной рабочей дозой антигена. Постановку РГА, титрование рабочей дозы антигена, постановку РТГА проводят при одинаковых условиях (температура, раствор, эритроциты, посуда и т. д.).

ТАБЛИЦА 5

Схема постановки РТГА

Ингредиенты	Разведение сыворотки							
	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1280
Раствор Мак Илвейна (pH 7,0)	—	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Испытуемая сыворотка	0,2	0,2 →	→	→	→	→	→	→
Рабочая доза антигена	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
0,75%-ная взвесь куриных эритроцитов	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

Для исключения неспецифического торможения гемагглютинации ставят контроли:

Контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию (к 0,4 мл раствора Мак Илвейна pH 7,0 добавляют 0,4 мл 0,75%-ной взвеси куриных эритроцитов) в двух лунках.

Контроль на полноту удаления неспецифических ингибиторов (0,4 мл обработанной сыворотки прогревают при 100° в течение 3 минут для разрушения активности антител, затем охлаждают). К 0,2 мл прогретой сыворотки добавляют 0,2 мл антигена (4 АЕ) и ставят на контакт, как при РТГА, а затем добавляют

0,4 мл взвеси эритроцитов. После часового выдерживания при 37° регистрируют результаты гемагглютинации; если она не наблюдается, то сыворотки считаются плохо обработанными, и их необходимо обработать снова.

Контроль рабочей дозы антигена. Результаты постановки РТГА записывают в журнал по схеме (табл. 6).

ТАБЛИЦА 6

Схема записи результатов постановки РТГА

Сыворотки	Разведение сывороток							
	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1280
Исследуемая	0	0	0	+	+	+++	++ ++	++ ++
Иммунная	0	0	0	0	+++	++ ++	++ ++	++ ++
Нормальная	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++	++ ++

Реакция торможения ГА более чувствительна, чем РСК, и может служить диагностическим тестом. Сыворотки отрицательные в РТГА были отрицательными и в реакции нейтрализации вируса. Корреляция показателей РТГА с данными РСК и РН наблюдается только в тех случаях, когда титр антигемагглютининов в сыворотках не ниже 1 : 40.

Реакция микроагглютинации. В последнее время некоторые исследователи применяют реакцию микроагглютинации по жиру, которая обладает более высокой чувствительностью при исследовании сывороток животных, чем РСК. Для ее постановки требуется минимальное количество компонентов, а при положительных случаях она дает хороший визуальный контроль.

Исследуемые сыворотки разводят физиологическим раствором 1 : 10. После этого каплю разведенной сыворотки наносят на предметное стекло и добавляют каплю стандартного антигена. После смешивания антигена и сыворотки отсасывают одну каплю и переносят на предметное стекло, которое помещают во влажную камеру на 18 часов при комнатной температуре, а потом переносят в термостат на 1 час.

В качестве антигена используют приготовленный в Институте Пастера антиген для микроагглютинации из вируса аборта овец Ку-18. На предметном стекле остаются высохшие мазки, которые окрашивают фильтрованной краской Май-Грюнвальда в течение 2 минут, подслаивая ее под препарат. Затем к ней добавляют равное количество физиологического раствора на фосфатном буфере и оставляют препарат на 2 минуты в растворе краски.

После этого мазки высушивают на воздухе и окрашивают фильтрованной краской Гимза, которую готовят на фосфатно-буферном физиологическом растворе из расчета три капли краски на 1 мл раствора. Краску подслаивают под препарат на 50 минут. Стекло промывают дистиллированной водой, сушат и просматривают под иммерсией при увеличении 90×7, 90×10 (Д. Огнянов, 1965—1966).

Иммунофлуоресценция. Вирус аборта овец через 15 часов после внедрения в клетку формирует в цитоплазме оранжево-красные включения, специфичность которых подтверждается непрямым или прямым методами иммунофлуоресценции.

Иммунную сыворотку можно конъюгировать с флуоресцеинтиоционатом и использовать в прямом методе флуоресцирующих антител для ранней диагностики антигенов в органах животных. Однако чувствительность этого метода не превышает непрямого метода иммунофлуоресценции; последний более доступен для практики, так как не связан с получением меченой иммунной сыворотки.

Для раннего обнаружения антигена вируса аборта овец в зараженных клетках используют непрямой метод иммунофлуоресценции по Уиллерд и Кунсу. Для реакции берут иммунную сыворотку крови петухов после иммунизации желточной взвесью вируса вышеописанным способом. Сыворотка должна иметь титр в РСК не ниже 1 : 32 и индекс нейтрализации не менее чем 2,5.

Антиптичья сыворотка, изготовленная Институтом судебной медицины, может быть использована для конъюгации флуоресцеиниотоционатом. Титр антител в сыворотке до конъюгации должен быть не ниже 1 : 10 000, и после конъюгации титр их в реакции кольцепреципитации обычно составляет 1 : 1000.

Постановка реакции. Покровные стекла с зараженным монослоем клеток куриных фибробластов или предметные стекла с мазками-отпечатками из органов зараженных или павших животных фиксируют в кислом спирте или ацетоне 10—15 минут. Затем препараты промывают охлажденным физиологическим раствором на фосфатном буфере (pH 7,2—7,4) 10—20 минут, подсушивают и наносят каплю иммунной сыворотки (в разведении 1 : 3) на исследуемый препарат. После 30-минутного контакта во влажной камере при 37° препарат отмывают от сыворотки физраствором, приготовленным на фосфатном буфере, и наносят антиптичью (меченую) сыворотку, после чего препарат вновь оставляют во влажной камере при 37° в течение 30 минут. Затем его промывают свежей порцией физраствора на фосфатном буфере и заключают в 10%-ный глицерин. Края покровного стекла опечатывают расплавленной смесью парафина и воска, после чего препарат просматривают в люминесцентном микроскопе с фильтром БС-8-2; СЭС-7-2 и ФС 1-2.

Для контроля специфичности иммунофлуоресцентного свечения в тех же условиях исследуют незараженные клетки или мазки-отпечатки органов здоровых, незараженных животных и заменяют в последнем окрашивании иммунные птичьи сыворотки нормальными сыворотками. В положительных случаях в мазках, приготовленных через 10—12 часов после заражения культуры куриных фибробластов, или через 40—48 часов в мазках-отпечатках из органов зараженных животных обнаруживаются в клетках отдельные участки цитоплазмы с диффузным свечением.

Лучшие результаты получают при заражении культуры куриных фибробластов, где к 16—20 часам отмечается слабая флюоресценция отдельных зон околоядерной оболочки и, начиная с 20—24 часов, около ядра формируются ДНК-содержащие включения, специфическое свечение которых ярче, и в дальнейшем, когда образуются включения, яркость специфической флуоресценции бывает максимальной через 48—72 часа после заражения культуры клеток куриных фибробластов (Д. Б. Оболадзе, 1968).

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Вирусный аборт овец необходимо дифференцировать от бруцеллеза, вибриоза, сальмонеллеза, Ку-лихорадки и колибактериоза. По данным Д. Огнянова (1969), в некоторых отарах овец 30% абортов имели сальмонеллезную природу. О вирусном аборте овец, кроме клинических и эпидемиологических данных, свидетельствуют комплементфиксирующие и вируснейтрализующие антитела, а также выделение вируса из внутренних органов, околоплодных оболочек и плода абортировавших животных.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагностику проводят по наличию комплементфиксирующих, вируснейтрализующих и антигемагглютинирующих антител в сыворотках переболевших овец.

РТГА чувствительный и специфический тест для ретроспективного диагноза аборта овец. Установлена высокая корреляция показателей РТГА с результатами кожной пробы и в меньшей степени в РСК. Для эпизоотологического обследования овец в эпизоотических очагах неориккетсионного аборта рекомендуют проводить постановку РТГА и кожную пробу. Морфологически в период выздоровления можно в органах овцы изредка встретить очаги, содержащие вирусные элементарные тельца.

Больные овцы перед абортами и в первые 10 дней после абортов выделяют вирус с экскрементами и отделяемым влагалища, хотя сыворотки их часто реагируют в РСК отрицательно. Данных относительно динамики вируснейтрализующих антител у овец-реконвалесцентов нет. Д. Б. Оболадзе (1968) установил, что сыворотки абортировавших овец через два месяца содержат вируснейтрализующие антитела в титре около 2 lg индекса нейтрализации. Эти же сыворотки содержат антигемагглютинины в титре 1 : 40—1 : 80 и комплементфиксирующие антитела в титре 1 : 16—1 : 32.

Специфическая профилактика. В 1965 г. Б. Семерджиев и Д. Огнянов применяли для прививок овец металлизированную вакцину, в которой вирус был обработан ляписом, и формолосадочную вакцину, эмульгированную в минеральном масле. По данным авторов, эта вакцина хорошо переносилась животными и сообщала стойкий иммунитет. Процент абортов среди вакцинированных овец уменьшился в 3—4 раза по сравнению с невакцинированными. По мнению авторов, однократная прививка формолвакциной перед первой суягностью сообщает животным пожизненный иммунитет.

В настоящее время показано, что санация путем вакцинации возможна только тогда, когда в первый год вакцинируют всю отару, а затем весь молодняк, т. е. овец, которые должны быть покрыты впервые. Таким образом, вакцинацию проводят до полной санации отар. Отара только тогда может считаться здоровой, если сыворотки всех покрытых животных в течение 2—3 месяцев после окота отрицательно реагируют в РСК при отсутствии случаев вирусного аборта. При этом необходимо учитывать имевшую место вакцинацию, после которой в крови могут быть длительное время комплементфиксирующие антитела в определенном титре.

ОСПА ОВЕЦ И КОЗ
(SHEEP POX, VAR. CAPRIUM)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Оспа овец и коз — острая контагиозная болезнь, протекающая с характерными клиническими признаками папулезно-пустулезных поражений кожи. Вирус, вызывающий оспу овец, как правило, непатогенен для коз, и наоборот. Человек невосприимчив.

В настоящее время оспа регистрируется в различных странах, и особенно в странах Среднего и Ближнего Востока. В связи с усовершенствованием средств активной профилактики и проведения общих ветеринарно-санитарных мероприятий оспа овец и коз почти ликвидирована на территории СССР и давно не регистрируется в Швеции, Дании, Голландии, Бельгии, Норвегии и Австрии.

В естественных условиях животные чаще заражаются при контакте здоровых с больными. Вирус, выделяемый с носовой слизью и гнойным содержимым оспенных поражений, может вызвать заражение аэрогенным путем. Опасны больные и переболевшие животные, так как у них на коже и волосяном покрове вирус может сохраняться в течение нескольких недель.

Первые симптомы болезни характеризуются кратковременным повышением температуры тела на 1—2°, вялостью и снижением аппетита. Часто это сопровождается катаральным конъюнктивитом, ринитом и отеками подкожной клетчатки. Эта так называемая предвестниковая стадия болезни длится обычно 1—2 дня и часто просматривается. Затем опухают веки и появляются истечения из глаз и носа. Оспенная экзантема чаще и четко выступает на малошерстных участках головы, внутренних частях ног, хвоста и вымени, а у баранов на мошонке. Вначале появляются розеолы, которые переходят в темно-красные, быстро некротизирующиеся папулы. Эти так называемые пеликулированные папулы имеют вид серо-белых или желтоватых плотных припухлостей с красноватыми ободками. Некроз у них может быть поверхностным, и тогда покрывающий их тонкий слой эпидермиса легко снимается в виде пленки, обнажая влажную воспаленную поверхность собственно кожи. Иногда папулы сливаются и, подсыхая, образуют корочки, после отпадения которых видны белые или розоватые пятна. В тех случаях, когда некроз захватывает более глубокие слои кожи, образуются толстые струпья, которые отпадают через 5—6 дней или позже. Края рано некротизировавшихся папул обычно лишь слегка приподняты, а центр немного запавший. Их называют сплюснутыми папулами. Лишь иногда наблюдают везикулезные папулы. Это небольшие (4—6 мм) многокамерные пузырьки с натянутым серо-белым некротизированным эпидермисом и запавшей серединой.

При оспе у овец бывает иногда и не некротизирующиеся, а так называемые веррукоидные (бородавкоподобные) папулы. Это обычно плотные сухие цвета кожи образования. Иногда сверху они бывают покрыты чешуйками. Эпидермис кожи сильно утолщен и перерожден. На слизистой оболочке ротовой полости губ и языка они бывают в виде папиломатозных образований. Из не некротизирующихся папул бывают и так называемые уртикароидные папулы, при которых струпьев и, отпадая, не оставляют видимых следов. Из не некротизирующихся папул бывают и так называемые уртикароидные папулы, при которых отмечают лишь слабое серозно-клеточное воспаление кожи с незначительной

гиперплазией клеток эпидермиса. Такая сравнительно быстро исчезающая сыпь характерна чаще для абортивного течения оспы.

Тяжело протекает оспа при экзантеме, охватывающей большие участки, когда оспины, сливаясь между собой, образуют так называемую сливную форму оспы. Еще тяжелее протекает геморрагическая форма оспы. При этих формах оспы обычно повышается температура тела. На слизистой носа и гортани наиболее часто образуются плоские серовато-белые, преимущественно круглые оспенные очаги, представляющие собой клеточные инфильтраты и эрозии на разных стадиях развития и заживления. При развитии вируса в роговице образуется бельмо и теряется зрение. Часто поражаются легкие. Лимфоузлы увеличены. С пораженных участков кожи выпадает шерсть. При осложненных формах оспы поражаются суставы, желудочно-кишечный тракт, появляются поносы.

У овец оспа продолжается около 20—28 дней, у истощенных и слабых животных дольше. Среди заболевшего молодняка гибель достигает иногда 50%. Большинство животных погибает от сепсиса. Наиболее тяжело оспа протекает у овец тонкорунных пород. Очень восприимчивы к оспе грубошерстные овцы романовской породы, менее восприимчивы тушинские и некоторые другие породы овец.

У коз оспа протекает примерно так же, как и у овец. Оспенный процесс локализуется на вымени. У козлят-сосунов, заразившихся после рождения, оспа протекает атипично, оспенный процесс локализуется на слизистой рта, чаще в сычуге. Болезнь сопровождается кашлем, учащенным дыханием и гнойными истечениями из носа с образованием вокруг ноздрей и губ корок. Протекает оспа, как правило, остро в виде энзоотий. Погибает около 25% заболевших животных, особенно молодняк. В случае тяжелых осложнений процент гибели увеличивается до 80. У коз ангорской и придонской пород оспа протекает тяжело. Козы, заболевшие оспой незадолго до окота, часто абортируют.

ВИРУС

Возбудители — ДНК-содержащие вирус[illegible]ящиеся, согласно современной классификации, к семейству Borrel[illegible] Zoovariolla. Размер вирионов 200—250×150—200 ммк. Они б[illegible]й формы, чем у других вирусов оспы. При воздействии пепсин[illegible]дается выделить нуклеопротеид, дающий фельгенположительн[illegible]НК, и обнаружить топкую оболочку, устойчивую к перевар[illegible]

Устойчивость к физико[illegible]воздействиям. Вирус быстро погибает при воздействии[illegible]рой (55° за 20 минут), в гниющем вируссодержащем [illegible]сохраняется в сухих оспенных корочках и лиофи[illegible]де. Он остается жизнеспособным в кошарах [illegible]шерсти пребовавших овец — до 2 месяцев. В[illegible]кислоты возбудитель оспы погибает через несколько [illegible]чувствительны к эфиру и нечувствительны к антибиотикам.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Лиофилизированный материал, сохраняемый при температуре минус 15—20°, остается активным более 2 лет. Культуральный вирус следует сохранять при минус 40° (5—6 месяцев).

Локализация в организме. В период вирусемии, когда наблюдается лихорадка, возбудитель обнаруживается в крови, легких и почках. По окончании лихорадки и при появлении кожной сыпи возбудитель из крови и органов больного животного, как правило, не выделяется.

Антигенная вариабельность. Все штаммы вируса оспы овец в антигенном отношении идентичны между собой и не имеют иммунологического и антигенного родства с вирусом оспы коз. Но имеются сообщения о том, что штаммы вируса оспы овец из Восточной и Южной Африки более родственны вирусу оспы коз, чем вирусу оспы овец. Данных относительно антигенной вариабельности вируса оспы коз нет.

Антигенная активность. У переболевших и гипериммунных животных в сыворотке крови имеются вируснейтрализующие антитела, специфический титр которых можно определить в культуре ткани со штаммом, адаптированным к этой системе.

Гемагглютинирующие свойства вирусов оспы овец и коз не изучены.

Спектр патогенности. Вирусом оспы овец можно вызвать болезнь только у овец, а возбудителем оспы коз — у коз. Оба вируса строго монопатогенны. В литературе имеются сообщения о выделении некоторых эпизоотических штаммов вируса оспы овец, обладающих би- и трипатогенными свойствами при экспериментальном заражении коз, газелей и крупного рогатого скота.

Вирусы оспы овец и коз удается адаптировать к подкожной клетчатке соответствующих животных. При подкожном заражении такими штаммами в области живота у овец и коз развивается воспалительный отек, где обычно содержится вирус в высокой концентрации (метод Борреля).

Культивирование. Вирусы оспы овец и коз можно культивировать в организме естественно восприимчивых животных по методу Борреля, описанному в руководствах по ветеринарным биологическим препаратам.

Оба вируса не удается серийно пассировать на развивающихся куриных эмбрионах. Однако их без особого труда удается культивировать и серийно пассировать в первичной культуре клеток почки, легких и тестикул ягнят.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагностика оспы овец и коз основана на клинических, патологоанатомических, эпизоотологических данных, положительных результатах биопробы и вирусоскопии. При тщательном обследовании отары овец необходимо найти животных с характерными оспинами гнездно-сетчатого строения и с кратерообразными в них углублениями, чего при других экземах, как правило, не бывает.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие материала. Для исследования берут содержимое везикул или пустул, поверхность которых предварительно очищают ватным тампоном, смоченным эфиром или спиртом. Далее везикулу прокалывают у основания тонко оттянутым (на пламени горелки) капилляром пастеровской пипетки. Конец пипетки наклоняют вниз, что облегчает сбор везикулярной жидкости. Папулы соскабливают скальпелем, корки собирают пинцетом.

Кроме того, делают тонкие мазки везикулярной и пустулезной жидкости на обезжиренных предметных стеклах для вирусоскопического исследования. Мазки лучше готовить из свежих везикул или пустул. Для этого их осторожно (во избежание кровотечения) срезают лезвием безопасной бритвы, и внутренней поверхностью среза пустулы однократным движением проводят по предметному стеклу. Мазки высушивают на воздухе.

Вирусоскопия. Приготовленные мазки окрашивают по М. А. Морозову для обнаружения элементарных телец (вируса) оспы. Техника окрашивания заключается в следующем. Мазок покрывают

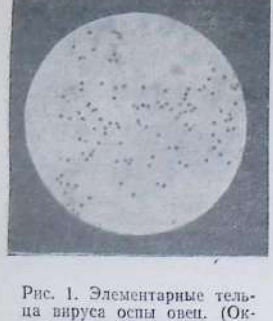


Рис. 1. Элементарные тельца вируса оспы овец. (Окраска по Морозову.)

жидкостью Руге (реактив № 1), через минуту жидкость сливают, препарат промывают дистиллированной водой и протравливают реактивом № 2 при подогревании до появления паров (1—2 минуты). После тщательного промывания водой мазок обрабатывают 1—2 минуты реактивом № 3 при легком подогревании, пока препарат не приобретет темно-коричневую окраску. Затем его вновь тщательно промывают дистиллированной водой и сушат на воздухе.

Приготовление реактивов для окраски серебрением по М. А. Морозову. *Реактив № 1* (жидкость Руге): 1 мл ледяной уксусной кислоты, 2 мл 40%-ного формальдегида и 100 мл дистиллированной воды. *Реактив № 2:* 5 г таннина *, 100 мл дистиллированной воды и 1 мл жидкой карболовой кислоты. *Реактив № 3* (раствор аммиачного серебра). Растворяют 5 г кристаллического азотнокислого серебра в 100 мл дистиллированной воды. Из смеси в отдельный сосуд отмеривают 20 мл. К 80 мл раствора серебра по каплям добавляют крепкий (25%-ный) раствор аммиака, пока образующийся желто-коричневый, а затем буро-коричневый осадок не растворяется и не останется лишь легкая опалесценция. Если добавление аммиака вовремя не прекращено, то берут раствор азотнокислого серебра из оставшихся 20 мл и приливают его по каплям до появления легкой опалесценции. Для окраски реактив разбавляют дистиллированной водой 1 : 10. Раствор очень стоек, но его необходимо защищать от пыли и хранить в склянке с притертой пробкой.

При обработке препарата реактивом № 3 последний не должен желтеть (выпадение осадка). Если реактив пожелтел, что может наблюдаться при недостаточной промывке после танина, то раствор серебра сливают, препарат вновь прополаскивают дистиллированной водой и снова серебрят. Чтобы при изготовлении реактивов для окраски серебрением, а также при промывке препаратов не образовывалось осадков, нужно применять только дистиллированную или бидистиллированную воду (С. С. Маренникова, 1965).

При рассмотрении под микроскопом при помощи иммерсионной системы элементарные тельца Борреля представляются в виде мелких (200—300 ммк) округлых образований темно-коричневого или черного цвета, расположенных поодиночке, парами, короткими цепочками в виде скоплений. Присутствие оспенного вируса считается подтвержденным только при обнаружении характерных телец в массовом количестве (рис. 1).

Достоинством метода вирусоскопии следует считать быстроту ответа ($^1/_2$—1 час после доставки материала в лабораторию), простоту и доступность. Однако этот метод имеет и некоторые не-

* Следует применять только хорошие сорта танина. Для испытания на чистоту препарата готовят раствор из 1 г танина и 5 мл воды. Раствор не должен становиться мутным в течение часа при прибавлении 10 мл 90° спирта (декстрин, камедь), а также при последующем добавлении 5 мл эфира (сахар, соль).

достатки. Наиболее четкие результаты при вирусоскопии можно получить при использовании в качестве материала для мазков срезов от свежих везикул (до нагноения) или везикулярной жидкости. При исследовании пустулезной жидкости и особенно корок возможность обнаружения элементарных телец и достоверность полученных результатов значительно снижаются.

Вирусоскопические исследования могут быть проведены также с использованием техники фазово-контрастной микроскопии.

Биопроба. Если испытуемый материал непригоден для вирусоскопии, нужно поставить с ним биопробу на неиммунной молодой овце. Испытуемую суспензию, приготовленную общепринятым методом, инокулируют внутрикожно в бесшерстную поверхность хвоста в дозе 0,1—0,15 мл. Наблюдение ведут в течение 10 дней. В положительных случаях на месте инъекции материала развивается местный оспенный процесс (розеола, папула, везикула, пустула, некроз), специфичность которого удается подтвердить методом вирусоскопии мазков, приготовленных из срезанного эпителия розеолы на присутствие элементарных телец.

При положительной биопробе и вирусоскопии необходимость в других методах лабораторной диагностики (иммунофлуоресценция, реакция диффузионной преципитации и т. п.) отпадает.

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Реакция диффузионной преципитации. Метод основан на образовании в агаровом геле зон преципитации при взаимодействии оспенного антигена со специфической сывороткой.

Для получения сыворотки, годной для использования в реакции диффузионной преципитации, иммунизируют кроликов овиной, делают 2—4 внутривенных инъекции (в объеме 2; 1; 0,5 и 0,25 мл) с интервалом в 5 дней. Через 7 дней после последней инъекции у кроликов берут кровь для получения сыворотки. Полученные кроличьи сыворотки необходимо истощить культурой фибробластов эмбриона овцы. Реакцию диффузионной преципитации ставят общепринятым методом.

Иммунофлуоресценция. Для исследования (прямой метод) антивирусный гамма-глобулин конъюгируют изотиоционатом флуоресцеина. Исследование проводят общепринятым методом.

При наличии вируса оспы овец в клетках инфицированной культуры с 6—8-го часа после заражения в отдельных участках цитоплазмы появляются светящиеся очаги. Позже начинают светиться более обширные участки.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Оспу овец и коз в стадии образования пустул и корок следует дифференцировать от парши, чесотки, пустулезной экземы и контагиозного пустулезного дерматита (эктимы) овец и коз. Экзема,

как незаразная болезнь, исключается на основании эпизоотологических данных, а при чесотке в корках (струпьях) всегда можно обнаружить клещей. Парша, являясь грибковым заболеванием, диагностируется методами микроскопического анализа. Контагиозная эктима может быть диагностирована перекрестной реакцией заражения переболевших ягнят вирусом оспы овец. Возбудитель этой болезни в отличие от оспы овец обычно поражает кожу в области губ и других частей лицевой части головы.

Ретроспективная диагностика при помощи серологических реакций не разработана. Постинфекционный иммунитет можно подтвердить заражением животных заведомо активным вирусом оспы овец. Заражать животных можно только в том случае, если есть надежные изоляторы, исключающие вынос инфекции.

ВАКЦИНАЦИЯ И ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

В СССР для специфической профилактики оспы овец и коз применяются гидроокисьалюминиевые формолвакцины (Н. В. Лихачев, Т. Я. Ванновский) — совершенно безопасные препараты, сообщающие привитым взрослым животным иммунитет продолжительностью не менее 8 месяцев.

Серологическая оценка поствакцинального иммунитета у овец и коз не разработана.

ИНФЕКЦИОННЫЙ ГЕПАТИТ СОБАК
(HEPATITIS INFECTIOSA CANUM)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Инфекционный гепатит собак (болезнь Рубарта, энцефалит лисиц) — остро протекающая контагиозная болезнь, вызываемая вирусом и протекающая при явлениях лихорадки, катара слизистых оболочек дыхательных путей и кишечника, поражения печени и нарушения функции центральной нервной системы. У лисиц болезнь протекает латентно. Инфекционным гепатитом болеют собаки в возрасте от нескольких недель до 13 лет, но главным образом в первые три месяца жизни. Заболеваемость не зависит от пола. Среди породистых собак чаще заболевают терьеры. Смертность достигает 10—20%.

В 1949 г. Карлсоном и Зинденпофом установлено, что возбудители инфекционного гепатита собак и энцефалита лисиц идентичны. Болезнь диагностирована в США, Англии, Бельгии, Голландии, Венгрии, СССР и других странах. Энцефалит лисиц описан в Дании и Норвегии. В естественных условиях к инфекционному гепатиту восприимчивы собаки всех возрастов и пород, лисицы, волки, шакалы, еноты, хорьки, песцы, кайоты. В экспериментальных условиях болезнь удается вызвать у африканских хорьков. Перезаражение происходит при контакте здоровых животных с больными.

У собак болезнь протекает молниеносно, остро, скрыто или латентно. Смертность может достигать 20% (Н. И. Митин, 1966). Клинически болезнь чаще проявляется у недавно отнятых щенят. Инкубационный период продолжается от 3 до 9 дней. У больных животных наблюдают лихорадку, вялость, отек, рвоту и диарею, кератит.

У лисиц болезнь протекает как острый энцефалит с конвульсиями, переходящими в паралич и кому. Смерть наступает в течение 24 часов. Возможны истечения из носа и глаз, а также диарея. У лисиц вирус инфекционного гепатита поражает в основном центральную нервную систему, и симптомы болезни обусловлены нарушением функции головного и спинного мозга. Гибнет до 50% молодняка и до 10% взрослых животных. У павших животных находят подкожные отеки, асциты, геморрагии в различных внутренних органах, набухшую бледную печень и геморрагический увеличенный желчный пузырь.

При микроскопическом исследовании пораженной печени находят многочисленные ядерные включения. Кроме печени, их постоянно обнаруживают в клетках эндотелия капилляров и сосудов различных органов.

ВИРУС

Возбудитель — ДНК-содержащий аденовирус. Он проходит через фильтры Зейтца ЕК, свечи Беркефельда и Шамберлана L_2 и L_3. Размеры его, установленные методом ультрафильтрации, составляют 80—120 ммк, а под электронным микроскопом — 55—96 ммк. Вирионы вируса имеют икосаэдральную симметрию; полный капсид содержит 252 капсомера. Расстояние между капсомерами около 90 Å. Описаны четыре типа вирионов: плотные гомогенные тельца с толстой оболочкой; менее плотные с тонкой оболочкой и гомогенным содержимым; с плотным центром и прозрачным центром. В ядрах печеночных клеток вирионы овальные или круглые, располагающиеся в местах формирования включ-

чений. Иногда вирионы в культуре клеток принимают форму кристаллов, что свойственно аденовирусам.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус термолабилен: при 50° он инактивируется в течение 2½ часов, при 60° — через 3—5 минут, при 100° — моментально. При 37° он сохраняется до 29 дней, в условиях комнатной температуры — до 10—13 недель, а при 4° — более 9 месяцев. Не все штаммы вируса инфекционного гепатита собак одинаково чувствительны к воздействию высоких температур. Встречаются штаммы, которые даже при температуре 60° инактивируются только через 1—1½ часа, а при кипячении — только через 5 минут. Вирус неустойчив к дезинфицирующим веществам. В 0,5%-ном растворе формалина он сохраняет жизнеспособность в течение 5—7 дней, однако 0,2%-ным раствором формалина инактивируется в течение 24 часов. Вирус неустойчив также к щелочи и лизолу, но устойчив к хлороформу, метанолу и антибиотикам.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Оптимальным pH для хранения этого вируса в условиях 20° является 6,0—8,5. Вируссодержащие выделения и кусочки органов больных животных при хранении в замороженном виде или консервированные в 50%-ном растворе глицерина при 2—4° сохраняют активность в течение 1—2 лет. Лиофилизированный вирус в условиях комнатной температуры сохраняет активность более 6 лет.

Локализация в организме. Внутриядерные включения, встречающиеся при инфекционном гепатите, являются микроколониями вируса (Рубарт, 1947; Ларин и Осбел, 1956; Б. К. Беспрозванный, 1965). Их можно обнаружить в ретикулярных клетках регионарных лимфоузлов и эндотелии сосудов, что по времени совпадает с фазой вирусемии. Через 1—2 суток включения образуются в клетках печени, причем сначала в купферовских, а затем в печеночных клетках. Иногда включения встречаются также в клетках панкреаса и менингеальных оболочках.

Антигенные свойства. Установлено антигенное сходство в РДП между аденовирусом 7 и вирусом гепатита. Кормичел и Барнес (1961), а также Прайер (1961) подтвердили принадлежность вируса гепатита к группе аденовирусов. Антигенная взаимосвязь между аденовирусами человека и гепатита собак односторонняя; аденовирусная сыворотка человека-реконвалесцента реагирует с антигеном вируса гепатита собак, но не наоборот.

Антигенная структура. Вирус гепатита собак содержит общие для всей группы аденовирусов (за исключением аденовируса птиц) комплементсвязывающий, гемагглютинирующий и преципитирующий антигены.

Комплементсвязывающий антиген обнаружен в солевых экстрактах инфицированной печени собаки; комплементсвязывающий антиген растворимого типа и почти не связан с инфекционностью вируса. При центрифугировании при 100 000 g он остается в надосадочной жидкости (S-антиген) и в небольшом количестве в осадке, где сосредоточена основная инфекционность (V-антиген). Комплементсвязывающий антиген в культуре клеток почки щенка обнаруживается через 30—32 часа после заражения. На 5—6-е сутки культивирования содержание его достигает максимума, тогда как максимальный инфекционный титр вируса наступает к 30—36-му часу, что указывает на непрочную связь комплементсвязывающего антигена с инфекционной частицей вируса. Комплементсвязывающий антиген термолабилен, быстро разрушается при температуре 60—70°, причем титр его в процессе прогревания снижается медленнее, чем инфекционность (Н. И. Митин, 1966).

Гемагглютинирующий антиген обнаружен у всех выделенных эпизоотических штаммов вируса. Он тесно связан с инфекционным компонентом вируса, так как удаление его методом адсорбции ведет к резкому снижению инфекционности вируса. Вирус агглютинирует эритроциты человека и морской свинки и не агглютинирует эритроциты овец, кроликов, лошадей, собак и кур. Специфичность агглютинации эритроцитов подтверждается в реакции ее торможения специфическими иммунными сыворотками. Химическая природа гемагглютинина не изучена. Он неустойчив к нагреванию: при 56° разрушается в течение 30 минут, при 70° — за 3—5 минут. Его также быстро разрушают и дезин-

фицирующие вещества — формалин, щелочь, фенол и лизол (Н. И. Митин, 1966).

Преципитирующий антиген вируса инфекционного гепатита состоит из двух компонентов: связанного с инфекционной вирусной частицей и свободнорастворимого, не связанного с инфекционностью вируса. Химическая природа преципитирующего антигена не изучена, но по адсорбции на целлюлозных колонках и по осаждению метанолом и сульфатом аммония можно предположить, что он имеет белковую природу. Преципитирующий антиген неустойчив к прогреванию: при температуре 56° он разрушается в течение 30 минут, при 70° — через 3—5 минут. Разделить компоненты преципитирующего антигена можно посредством дифференциального центрифугирования. Компонент, связанный с инфекционной частицей вируса, осаждается при центрифугировании при 100 000 g в течение 2 часов, а свободнорастворимый компонент остается в надосадочной жидкости. Возможно разделение этих компонентов посредством хроматографии на диализирующих целлюлозных колонках (Н. И. Митин, 1966).

Антигенная вариабельность. В антигенном и иммунологическом отношении вирус инфекционного гепатита собак однороден. Природные штаммы этого вируса различаются главным образом по вирулентности.

Антигенная активность. Специфические антитела появляются в сыворотке переболевших животных со 2—3-й недели и сохраняются в течение длительного времени. При экспериментальной инфекции специфические антитела обнаруживаются в крови выздоровевших животных через 3—10 недель после введения вируса и через 2—6 недель с момента клинического выздоровления (В. А. Ананьев, С. В. Нарский, 1968).

Спектр патогенности. Кроме собак, гепатитом заболевают песцы, волки, еноты, шакалы, кайоты. У лисиц болезнь протекает с симптомами энцефалита. Описан случай инфекционного гепатита у норок (Грассер, 1954).

В условиях эксперимента гепатитом заболели африканские хорьки, белые мыши, котята. По сообщению В. А. Ананьева, Б. К. Беспрозванного, С. В. Нарского (1963), у морских свинок после введения им вируса в большой дозе повысилась температура тела.

Культивирование вируса в лабораторных условиях. Культивирование вируса инфекционного гепатита удается на естественно восприимчивых животных-собаках и лисицах, а также в культурах растущих и перевиваемых тканей.

Культивирование вируса на щенятах проводят с целью получения необходимой массы вируссодержащего материала при изготовлении специфического антигена. Используют щенят 6—8-месячного возраста, не имеющих специфических антител. На 5—6-й день заболевших животных с типичной лихорадочной реакцией и клиническим синдромом убивают и берут печень, которая обычно содержит большое количество вируса (10^6 LD_{50} на 1 г ткани). Другие органы (мозг, селезенка, почки) заболевших животных менее пригодны, так как титр вируса в них значительно ниже, чем в печени (10^3—10^4 LD_{50} на 1 г ткани) (Н. И. Митин, 1966).

Выращивание вируса в культуре клеток почки и семенников собак, почки хорька, енота, в перевиваемой линии клеток почки свиньи. Цитопатические изменения, вызываемые этим вирусом, по характеру сходны с действием других аденовирусов. Они характеризуются появлением отдельных округливающихся, рефрактильных клеток, которые постепенно выделяются из монослоя и отторгаются от стекла. По мере развития инфекции число клеток, подвергшихся дегенерации, увеличивается, и в монослое образуются большие пустоты. Пораженные клетки концентрируются по краям сохранившихся островков, образуя большие конгломераты, напоминающие грозди винограда. Окончательно монослой разрушается к 30—36 часам культивирования. Титр вируса достигает 10^6—10^7 $ТЦД_{50}$ на 1 мл культуральной жидкости. При малой дозе вируса цитопатические изменения в культуре клеток развиваются несколько медленнее. Специфичность цитопатических изменений подтверждается в реакции нейтрализации. В культуре клеток, взятой от иммунных животных, вирус гепатита не развивается (Н. И. Митин, 1966).

В пораженных вирусом клетках через 20—24 часа после заражения образуются внутриядерные включения, которые хорошо обнаруживаются методом флуоресцирующих антител. Число их возрастает и через 36—40 часов достигает максимума, когда развиваются четко выраженные цитопатические изменения.

Инфекционный титр в культуре клеток почки щенка достигает максимума к моменту развития цитопатических изменений и накопления гемагглютинирующего и преципитирующего антигенов. В других культурах клеток этот вирус вызывает подобные изменения, но накопление его происходит в более низких титрах (Н. И. Митин, 1966).

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

С внедрением в лабораторную практику монослойной культуры клеток почки собак ее стали широко использовать для выделения и идентификации вируса.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

В качестве испытуемого материала у больных животных в период острого заболевания берут сыворотку крови, а у павших животных асцитическую жидкость или печень. Суспензию из печени готовят общепринятым методом и заражают чувствительных животных или культуру ткани. Экспериментально инфекционный гепатит можно воспроизвести у собак, лисиц, волков, хорьков, енотов, кроликов, морских свинок, мышей и куриных эмбрионов. Однако биопробу лучше ставить на молодых лисицах или щенках 6—8-месячного возраста, предварительно проверенных на отсутствие антител. Сыворотку их испытывают в реакции диффузионной преципитации со специфическим антигеном. Заболевание воспроизводится закономерно и в типичной форме при различных методах заражения и любой дозе вируса — подкожно, внутрибрюшинно, интрацеребрально и в переднюю камеру глаза. Наиболее чувствителен внутриглазной способ заражения. Инкубационный период продолжается 2—3 дня; период лихорадки с клиническими признаками болезни — 4—6 дней. У зараженных морских свинок развивается быстро проходящая лихорадка без каких-либо клинических признаков болезни. В куриных эмбрионах вирус гепатита размножается только после предварительной адаптации к организму хорька или тканевой культуре (Н. И. Митин, 1966).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Идентификацию вируса проводят при помощи РН, РСК, РТГА, а также реакции преципитации и цитологического исследования.

Цитологические исследования. При инфекционном гепатите в пораженных клетках печени Купфера, в ретикулярных клетках селезенки, почек, лимфоузлов и других органов и эндотелия сосудов и инфицированных клетках тканевых культур образуются внутриядерные включения. Материалом для исследо-

вания служат препараты с инфицированными тканевыми культурами, мазки-отпечатки, соскобы и кусочки вируссодержащих органов и тканей. Препараты фиксируют по общепринятым методам и окрашивают гематоксилин-эозином. При экспериментальной инфекции указанные включения в клетках печени регистрируются на 6—10-й день после заражения.

Серологическая идентификация

Реакция нейтрализации в культуре ткани используется для первичной идентификации вируса, определения титра вирусснейтрализующих антител (в полевых и гипериммунных сыворотках). Качественная реакция нейтрализации (когда следует идентифицировать специфичность выделенного цитопатогенного агента) заключается в том, что к зараженной испытуемым агентом культуре клеток добавляют питательную среду, содержащую 5% специфической иммунной сыворотки, сразу после периода контакта. В контрольные пробирки с зараженной культурой ткани добавляют среду с нормальной сывороткой. Нейтрализующий эффект определяют по феномену подавления цитопатогенного действия вируса (Н. И. Митин, 1966).

Количественную реакцию нейтрализации ставят также в монослое первичной культуры клеток почки собаки. Готовят двукратные разведения сыворотки и постоянную дозу вируса (100 $ТЦД_{50}$), имеющего активность в указанной культуре ткани не ниже $10^{4,0}$ $ТЦД_{50}$/0,2 мл. Смесь вируса и сыворотки инкубируют в течение часа в водяной бане (при 37°) и вносят в каждые четыре пробирки, соответствующие определенному разведению сыворотки. Учет нейтрализации производят тогда, когда вирус в контрольных пробирках, зараженных 100 $ТЦД_{50}$/0,2 мл, вызовет полную деструкцию монослоя.

Нейтрализующие антитела циркулируют в течение длительного времени и являются защитными антителами, поэтому титр их коррелирует с резистентностью животного.

Реакцию связывания комплемента используют как для обнаружения вирусного антигена в органах и тканях больных животных, зараженной культуре клеток, так и при ретроспективной диагностике по обнаружению комплементсвязывающих антител у переболевших животных. РСК ставят или методом разведения комплемента при постоянной дозе антигена и сыворотки, или методом разведения сыворотки. В Институте вирусологии им. Д. И. Ивановского РСК ставят в модификации А. А. Смородинцева с 3—4 дозами комплемента. Антиген, сыворотки и комплемент выдерживают 18—20 часов при температуре 40°, затем прибавляют гемолитическую систему (общий объем реакции 0,5 мл) и штативы с пробирками выдерживают при 37° 45 минут, после чего производят предварительный, а спустя еще час окончатель-

ный учет реакции. Штативы с пробирками в течение часа выдерживают при комнатной температуре.

Комплементсвязывающий антиген получают из инфицированной печени зараженных щенков методом экстракции метанолом* или методом пятикратного замораживания и оттаивания.

Для получения комплементсвязывающего антигена из инфицированной культуры ткани вируссодержащую культуральную жидкость, полученную на 6—7-й день, используют в качестве антигена без предварительной обработки. Нормальные антигены готовят так же. В печени щенка комплементсвязывающий антиген накапливается начиная со 2-го дня после заражения и достигает максимума на 6—8-е сутки. Активность антигена, приготовленного из печени, обусловлена наличием в ее клетках внутриядерных включений, которые обычно регистрируются на 6—8-й день после заражения.

Позитивную сыворотку для РСК готовят в условиях лаборатории. Для этого собак иммунизируют 10%-ной вируссодержащей суспензией печени на физиологическом растворе. Материал вводят внутривенно или подкожно в дозе от 1 до 11 мл в течение трех недель. Во второй период производят три инъекции по 5 мл с недельными интервалами. Позитивную сыворотку можно получить от лошади (см. ниже).

Реакцию преципитации широко используют для диагностики (ранней и ретроспективной) инфекционного гепатита собак, а также изучения антигенного родства различных штаммов вируса. Преципитирующий антиген обнаруживается в различных органах и тканях больных животных на 2—3-й день после экспериментального заражения. Большое количество его накапливается в печени и головном мозге.

При инфекционном гепатите реакцию преципитации в агаровом геле ставят общепринятым методом. В качестве испытуемого антигена используют 10%-ную суспензию печени больных животных. Вторым компонентом реакции служит гипериммунная сыво-

* Методика экстракции комплементсвязывающего антигена метанолом состоит в следующем: метанол, охлажденный до минус 30°, медленно приливают к вируссодержащей суспензии или к сыворотке, взятой в период острого течения болезни, или к асцитической жидкости до получения 10%-ной концентрации. Все это время суспензию держат в ванне со льдом. Полученную 10%-ную суспензию выдерживают при 0° в течение 2—3 часов и затем центрифугируют при 4000 об/мин. Осадок помещают в физиологический раствор (0,85%) с pH 6,8—7,0 и после размешивания оставляют на 24 часа при 0°. Затем один раз отмывают и чистый осадок используют как антиген. Для этого можно использовать этанол и бутанол, однако антиген будет менее активным.

Другой способ приготовления антигена: 10%-ную суспензию ткани печени на физиологическом растворе пятикратно замораживают при минус 70° и оттаивают в водяной бане при 37° с последующим центрифугированием при 2500 об/мин 30 минут. В качестве антигена используют надосадочную жидкость. Приготовленный антиген хранят при минус 20°. В результате использования этого метода титр тканевого комплементсвязывающего антигена достигает 1 : 16—1 : 32 и используется в РСК без дальнейшей концентрации (Н. И. Митин, 1966).

ротка, получаемая вышеуказанным методом. В качестве источника антител можно использовать иммунную сыворотку реконвалесцентов. Реакция проходит при температуре 37° в течение 48—72 часов. Сыворотку добавляют дробно, через каждые 12 часов. При положительной реакции наблюдается линия преципитации между испытуемым антигеном и специфической сывороткой при отсутствии ее в контроле (Н. И. Митин).

Реакцию гемагглютинации и задержки гемагглютинации ставят обычным способом. Компонентами РГА являются: антиген — 10%-ная суспензия печени больных животных, или культуральная жидкость и 0,5%-ная взвесь эритроцитов морской свинки, или эритроциты человека группы О в 1—1,5%-ной концентрации. Реакция проходит при температуре 18—25° в течение 40—60 минут; pH физиологического раствора для разведения вируса и приготовления суспензии эритроцитов — 7,0. Титр культурального вируса в реакции гемагглютинации при 4° составляет 1 : 160—1 : 320.

Реакцию торможения гемагглютинации проводят по принятой схеме с добавлением к вирусу двукратных разведений иммунной сыворотки. Когда исследуют сыворотку переболевших собак или лисиц на наличие специфических антигемагглютининов, для РТГА используют заведомо активный культуральный вирус.

Реакция агглютинации на древесном угле более проста по выполнению и не менее достоверна, чем РН и РСК. Она предложена в 1967 г. Файерчилдом, Зетц и Кохеном. Реакция чувствительна и специфична для определения постинфекционных и поствакцинальных антител при инфекционном гепатите собак. Быстрый первичный иммунологический ответ, который дает данная реакция, а также обнаружение антител в сравнительно высоком титре в течение 5 месяцев после вакцинации позволили считать реакцию агглютинации на древесном угле весьма ценной при ретроспективной диагностике данной болезни и серологической оценке поствакцинального иммунитета.

Приготовление антигена для реакции. Для антигена используют штамм Утрехт (Utrecht) вируса инфекционного гепатита собак, выращенный в первичной культуре клеток почки собаки на среде Игла с добавлением 2% инактивированной сыворотки цыпленка и антибиотиков (100 ЕД пенициллина, 100 ЕД стрептомицина на 1 мл среды). Вирус собирают на 3-й день после заражения культуры ткани, при наличии четко выраженных цитопатических изменений. Вируссодержащую клеточную фракцию дважды замораживают и оттаивают, затем центрифугируют 10 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость используют в качестве антигена.

Оптимальную концентрацию антигена определяют методом блочного титрования с серийными двукратными разведениями антигена на суспензии древесного угля.

Оптимальная концентрация антигена должна иметь такое разведение, которое соответствует наибольшему титру агглютинации с заведомо известной положительной сывороткой, и иметь отрицательную реакцию с нормальной сывороткой.

В качестве контроля готовится суспензия нормальной культуры почечных клеток на древесном угле методом, аналогичным испытуемому антигену.

Реакция агглютинации проста в выполнении, ставится с инактивированными сыворотками собак. Результаты ее учитывают через 8—10 минут.

Иммунофлуоресценция. При помощи этого метода удается обнаружить специфический вирусный антиген в препаратах из инфицированных органов и культур ткани почки больной собаки.

Препараты для люминесцентной микроскопии готовят по общепринятой методике. При положительной иммунофлуоресценции в зоне ядра видны светящиеся глыбки антигена в первые 24—48 часов. С развитием внутриядерных включений наблюдают флуоресцирующее свечение антигенных комплексов. Для приготовления флуоресцирующей сыворотки используют гипериммунную сыворотку или сыворотку собак-реконвалесцентов.

Наибольшее применение в лабораторно-диагностической работе нашел метод прямой иммунофлуоресценции. В печени животных при помощи метода флуоресцирующих антител вирусный антиген можно обнаружить через 24—48 часов с момента заражения.

Используют также метод неспецифической люминесценции. С этой целью на нативный препарат под покровное стекло наносят каплю акридина оранжевого. Препарат немедленно просматривают. Внутриядерные включения ярко-зеленого цвета на фоне зелено-желтых ядер и оранжево-красной протоплазмы.

Приготовление положительных сывороток для РСК, РН и РДП. В качестве надежного источника антител можно использовать гипериммунную сыворотку лошади, иммунизированную культуральным вирусом, с титром не ниже 10^4 $ТЦД_{50}$/мл. Для этого содержащую культуральную жидкость вместе со взвесью клеток проморáживают, отсасывают и центрифугируют в течение 10 минут при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость используют в качестве антигена для иммунизации лошади. Иммунизацию последней проводят в два цикла, в первом делают три инъекции с интервалом в 7 дней: 100 мл — подкожно в верхней части шеи, холки, спины, крупа; 120 мл — комбинированно: внутрикожно и подкожно; 150 мл — там же.

Через 10 дней берут кровь для проверки на наличие антител. Через 20 дней после третьей инъекции проводят второй цикл иммунизации. Вирус вводят внутривенно 3 раза через день по 10, 12 и 15 мл. Предварительно вируссодержащий материал слегка подогревают и вводят капельным методом. Кровь берут на 20-й день после последней инъекции. Полученная сыворотка имеет титр нейтрализующих антител — 1 : 128 и комплементсвязывающих антител 1 : 40.

В качестве источника антител можно также использовать асцитическую жидкость собаки, переболевшей с клиникой раннего цирроза печени.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Инфекционный гепатит собак следует отличать от чумы, лептоспироза, токсоплазмоза и бешенства. Инфекционный гепатит чаще протекает спорадически. При пальпации ощущается болезненность живота; при пункции часто можно взять асцитическую жидкость. При вскрытии наблюдают сильные поражения печени и желчного пузыря. В гистосрезах внутриядерные включения в печени и в эндотелии сосудов.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

У переболевших животных наступает продолжительный, практически пожизненный иммунитет независимо от тяжести перенесенного инфекционного процесса. Возможна передача пассивного иммунитета от матери потомству с молозивом. Наличие иммунитета устанавливают путем контрольного заражения, определени-

ем нейтрализующих, комплементсвязывающих антител и антигемагглютининов.

Однако, в отличие от серологической идентификации вновь выделенного испытуемого агента, при ретроспективной диагностике в распоряжении врача испытуемая сыворотка проверяется в указанных реакциях с заведомо положительными антигенами, получение которых описано выше.

Комплементсвязывающие антитела у экспериментально зараженных животных появляются на 6—7-й день и обнаруживаются в течение 7—8 месяцев. Данные о сроках появления и продолжительности обнаружения других видов антител противоречивы.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

В СССР ее не проводят. За рубежом для профилактики инфекционного гепатита собак используют как инактивированную формолвакцину из инфицированной ткани печени собак, так и живую вакцину из аттенуированного штамма Федетила и Эмери, полученного путем серийного пассирования вируса в культуре клеток почки собак и почки эмбриона свиньи. Вакцина из указанного штамма безопасна для животных любого возраста, вызывает слабую реакцию и создает напряженный и продолжительный иммунитет. Вакцину выпускают в лиофилизированном виде, моновалентную или бивалентную в комбинации с аттенуированным штаммом чумы собак (Н. И. Митин, 1966).

Положительная реакция агглютинации (в титре 1:16 и выше) на древесном угле с сыворотками вакцинированных собак проявляется обычно на 7-й, а у некоторых животных на 10-й день после прививки. Наивысший титр агглютинирующих антител отмечается к исходу 6-й недели после прививки и медленно снижается на протяжении следующих трех месяцев. Параллельное исследование сывороток вакцинированных собак в трех реакциях (реакция агглютинации на древесном угле, РН и РСК) показывает, во-первых, совпадаемость первых двух, и, во-вторых, РН и РСК выявляют антитела на несколько дней раньше, чем реакция агглютинации на древесном угле. Максимальный титр антител всех трех реакций у вакцинированных собак отмечался через 4—6 недель после прививки. К 5-месячному сроку после прививки титры антител в трех реакциях снижаются втрое по сравнению с уровнем максимального подъема.

БОЛЕЗНЬ НЬЮКАСЛА
(NEWCASTLE DISEASE)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Болезнь Ньюкасла (пневмоэнцефалит птиц, псевдочума, атипичная чума птиц, азиатская чума птиц, болезнь Раникхет, болезнь Филарет) — широко распространенная, остро протекающая, высококонтагиозная болезнь кур и индеек. Цесарки, куропатки, фазаны и павлины болеют редко.

Инкубационный период у естественно инфицированной птицы продолжается 4—6, реже 12—20 дней. Продолжительность его зависит от возраста, иммунобиологического состояния птицы и вирулентности вируса. За последние годы в некоторых странах зарегистрированы случаи атипичного и даже бессимптомного течения болезни Ньюкасла, сопровождающиеся незначительным отходом больной птицы и клинически проявляющиеся легкими расстройствами со стороны респираторного тракта. Подобное течение болезни вызывают слабопатогенные вирусы.

В типичных случаях ньюкаслская болезнь клинически проявляется слабостью больной птицы, которая становится малоподвижной, сонливой. Затем наступает коматозное состояние и смерть. У других птиц отмечают затрудненное дыхание, кашель, скопление слизи во рту. Стремясь освободиться от слизи, больная птица постоянно трясет головой, открывает рот, вытягивает шею. Часто наблюдается понос. Часто нарушается функция центральной нервной системы (круговые движения, шаткость походки, нервный тик, парезы и параличи ног, крыльев, шеи). Нередки случаи дрожания тела или отдельных мышечных групп и скручивания шеи.

Патологоанатомические изменения у павших зависят от продолжительности болезни, возраста птиц и вирулентности возбудителя. Наиболее характерные изменения находят в желудочно-кишечном тракте. Железистый желудок пустой, на слизистой оболочке его часто обнаруживают кровоизлияния различной величины, густую слизистую массу, точечные кровоизлияния на сосочках железистого желудка; они особо густо располагаются при переходе железистого желудка в мышечный, образуя геморрагическое кольцо. Изменения в железистом желудке находят у 60—70% взрослых кур, у цыплят — реже. Кроме того, наблюдают катаральное воспаление и кровоизлияния, а иногда фибринозные некротические поражения слизистой оболочки кишечника. Последние имеют вид мелких или крупных отрубевидных наложений грязно-серого либо серо-черного цвета. Иногда участки поражений слизистой кишечника напоминают бутоны или пуговицы, выступающие над поверхностью слизистой оболочки. Наложения плотно связаны со слизистой; при удалении их образуются язвы.

ВИРУС

Вирус ньюкаслской болезни относится к семейству Pneumotropiacea, группе миксовирусов. Размеры его достигают 140 ммк, форма сферическая, имеет внутреннюю сердцевину в виде спирально закрученной нити диаметром 17 ммк. Это — РНК-содержащий вирус; снаружи сердцевина его окружена оболочкой с радиально расположенными отростками, содержащими гемагглютинин. Вирус обладает гемагглютинирующими свойствами в отношении эритроцитов различных птиц и некоторых млекопитающих.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вируссодержащие экстраэмбриональные жидкости инактивируются при 56—62° в течение 15—30 минут. Под воздействием дневного света инфекционность их снижается в течение 4 часов на 3—5 lg. Гемагглютинирующие свойства сохраняются при более длительной инактивации, чем инфекционные. Вирус устойчив к низкой температуре, в замороженном состоянии активность его сохраняется более 2 лет. Растворы формалина (1—2%-ные), едкого натра (1—2%-ные), мыдистого крезола (1%-ный) и фенола (3—4%-ные) — эффективные дезинфицирующие средства. Вирус устойчив в кислой среде (pH 4—5), резистентен к действию антибиотиков, что позволяет широко использовать их при первичном выделении возбудителя из загрязненных банальной микрофлорой тканей.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Вируссодержащий материал (эмбрион, мозг, селезенка павших птиц) можно сохранять в замороженном состоянии при минус 70° в течение 3—4 лет, при минус 20° — 6—7 месяцев. Если создать такие условия невозможно, вируссодержащие ткани можно сохранять в 50%-ном растворе глицерина на фосфорном буфере pH 6,8—7,0 при 2—4° в течение 3—4 месяцев, после чего требуется освежение вируса на восприимчивой птице или куриных эмбрионах. Вируссодержащую аллантоисно-амниотическую жидкость в замороженном (при минус 20°) состоянии можно сохранять без существенной утраты патогенности в течение 4—5 месяцев. В лиофилизированном виде вируссодержащий материал (в условиях 4—6°) сохраняет активность до 1—1½ лет.

Локализация в организме. В организме больной птицы (в агональном состоянии) вирус обнаруживается в головном мозге, легких, селезенке, трахеальной слизи, содержимом тонкого и толстого отдела кишечника. В свежих трупах павшей птицы в высокой концентрации он обнаруживается в селезенке, головном мозге и в легких.

Антигенные и вирулентные свойства. У птиц, кроликов, крупного рогатого скота, лошадей и других животных вирус вызывает образование специфических антител, ингибирующих гемагглютинацию, нейтрализующих вирус и комплементфиксирующих. Как правило, все штаммы вируса перекрестно реагируют с антителами, образованными под влиянием гетерологичных штаммов.

В антигенном отношении вирус не имеет вариантов, однако различные полевые штаммы его сильно варьируют по вирулентности. Некоторые природно ослабленные штаммы (F, B_1, Za-Sota, KD, Beaudette и др.) широко используются в качестве живых вакцин.

Наблюдения последнего времени свидетельствуют о том, что, помимо пассивного иммунитета, у подрастающих цыплят замечено в некоторых странах значительное увеличение естественной сопротивляемости птицы к ньюкаслской болезни. Выделяемые полевые штаммы чрезвычайно вариабельны по своей вирулентности не только для птицы, но и для эмбрионов (слабовирулентный штамм H; авирулентные B_1, F, FR и Za-Sota; высоковирулентные — в США, Gb, в СССР — Т, У, в Японии — Сато, Миадера и т. п.).

Помимо различия в вирулентности природных штаммов, установлено их значительное различие в тропизме к нервной, легочной и висцеральным тканям.

Гемагглютинирующие и гемолитические свойства. Вирус обладает свойством агглютинировать эритроциты крови животных различных видов. В отличие от возбудителя классической чумы птиц, он не агглютинирует эритроциты шотландского пони, лошади, кошки, что можно использовать для идентификации двух вирусов. Помимо этого, данный вирус обладает гемолитической активностью, которая не связана с вирулентными свойствами.

Спектр патогенности. Экспериментальную инфекцию удается вызвать у перепелов, воробьев, тетеревов, голубей. При парентеральном заражении некоторые штаммы оказались патогенными для морских свинок, кошек, собак и других млекопитающих. Золотистые хомячки оказались восприимчивыми к интраназальному и интрацеребральному заражению.

К вирусу ньюкаслской болезни восприимчивы куры всех пород; цыплята более чувствительны в том случае, если они не имеют пассивного иммунитета, полученного через яйца от кур-несушек.

Культивирование в лабораторных условиях. Помимо восприимчивой птицы, вирус ньюкаслской болезни хорошо культивируется в развивающихся куриных эмбрионах при любом способе заражения, на изолированных хорионаллантоисных оболочках, в культуре фибробластов куриных эмбрионов, некоторых первичных и перевиваемых клетках. Некоторые штаммы при размножении на куриных эмбрионах накапливаются в одинаковой концентрации в аллантоисной и амниотической жидкостях, тогда как концентрация других в амниотической жидкости составляет всего 30% от концентрации в аллантоисной жидкости.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ньюкаслскую болезнь диагностируют на основании эпизоотологических данных, симптомов болезни, патологоанатомических изменений и данных лабораторного исследования. Ранняя диагностика осуществляется на основании выделения и идентификации вируса при помощи РГА, РТГА, РН, гельпреципитации и иммунофлуоресценции, ретроспективная на основании парных проб сывороток в РТГА и РН.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и подготовка материала. Для исследования берут селезенку, легкие и мозг из свежих трупов погибшей птицы с соблюдением правил асептики. Тканевую суспензию готовят на физиологическом растворе 1:10 с добавлением антибиотиков (200 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина).

Для освобождения взвеси от крупных частиц суспензию отстаивают при температуре 0—4° один час или центрифугируют при 1000 об/мин 15 минут. В опыт берут надосадочную жидкость.

Выделение вируса на куриных эмбрионах. Куриные эмбрионы (9—11-дневного возраста), полученные из благополучного в отношении данной инфекции хозяйства, заражают в аллантоисную полость общепринятым методом и инкубируют в термостате (37°) в течение 48—60 часов. Овоскопию зараженных эмбрионов производят через 12—24—36—48—60 часов. Все погибшие эмбрионы сохраняют до вскрытия в рефрижераторе (2—4°). От каждого вскрытого эмбриона берут экстраэмбриональную жидкость, которую проверяют на присутствие бактериальной флоры (путем высева на МПБ и МПА) и гемагглютинирующую способность в отношении куриных эритроцитов. Реакцию гемагглютинации ставят вышеописанным методом.

Выделение вируса на птице. Если куриных эмбрионов нет, вирус можно выделить на неиммунной к псевдочуме птице. Для этого испытуемый материал инокулируют ($1:10\times0{,}5$) цыплятам в возрасте 2—4 месяцев внутримышечно. За инфицированной птицей наблюдают в течение 10—12 дней. При появлении характерных для псевдочумы симптомов (вялость, истечение из носа, синюшность гребня, понос, парезы, параличи конечностей крыльев,

нервный тик и т. п.) птиц в агональном состоянии убивают и берут пробы вируссодержащего материала (головной мозг, селезенка), которые в дальнейшем можно использовать для заражения куриных эмбрионов и иммунологической пробы (одновременного заражения иммунной и неиммунной групп птицы).

Выделение вируса в культуре ткани осуществляют редко, так как культуральный вирус по своей гемагглютинирующей активности значительно уступает эмбриональному. Однако в тех случаях, когда в лаборатории можно получить культуру фибробластов куриных эмбрионов и специалисты владеют этим методом, его следует применять для выделения и идентификации вируса. Приготовление вирусной суспензии, выращивание и заражение культуры клеток куриных фибробластов производится общепринятым методом.

В зараженной культуре фибробластов куриных эмбрионов вирус ньюкаслской болезни вызывает через 48—60 часов цитопатические изменения, специфичность которых подтверждается реакцией гемадсорбции с эритроцитами крови кур. С вируссодержащей культуральной жидкостью может быть поставлена реакция гемагглютинации в отношении эритроцитов крови кур. Обычно гемагглютинирующий титр культурального вируса при первичном выделении не превышает 1 : 32—1 : 128. Отсутствие или низкие титры ГА вируса в первом пассаже на культуре ткани не дают основания исключить ньюкаслскую болезнь.

Серологическая идентификация

Серологическую идентификацию вируса проводят при помощи РТГА, РН на куриных эмбрионах общепринятым методом. Обе реакции ставят с использованием диагностического набора, изготовленного биофабрикой (Г. А. Сафонов, М. А. Дымин, 1969).

Применение диагностического набора. Набор предназначен для идентификации вируса болезни Ньюкасла, установления наличия антител (антигемагглютининов и нейтрализующих) к нему в крови вакцинированной или переболевшей птицы (при ретроспективной диагностике и серологической оценке поствакцинального иммунитета), а также для учебных целей при освоении методики культивирования и титрования вирусов в куриных эмбрионах и культуре ткани, постановки реакций гемагглютинации и ее задержки, реакции нейтрализации и связывания комплемента *.

Диагностический набор состоит из антигена, антисыворотки, риванола и активированного угля. *Антиген* — лиофилизированная вируссодержащая экстраэмбриональная жидкость, полученная при заражении 10-дневных куриных эмбрионов производственным вакцинным штаммом Н вируса болезни Ньюкасла. Об-

* Применение единых, эталонных диагностикумов на всей территории СССР позволит проводить сравнимые объективные наблюдения за эпизоотическим течением ньюкаслской болезни и в случае появления антигенных вариантов или атипических форм своевременно идентифицировать их и проводить соответствующие профилактические и другие ветеринарно-санитарные мероприятия.

ладает активностью в реакции гемагглютинации с 1%-ной взвесью куриных эритроцитов в разведении 1 : 320—1 : 1280. Инфекционный титр его достигает $ЕЛД_{50} — 10^{7,5}—10^{8,5}$ в 0,1 мл. Расфасован в ампулах по 1 мл. Антисыворотка, лиофилизированная гипериммунная сыворотка лошади, полученная после многократного введения антигена, обладает активностью в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с 4—8 гемагглютинирующими дозами (ГАД) в разведении 1 : 320—1 : 1280; индекс нейтрализации при разведении 1 : 20 не меньше чем 10 000; расфасована в ампулы по 1 мл.

Риванол — порошок желтого цвета. Предназначен для удаления неспецифических ингибиторов гемагглютинации из антисывороток, расфасован по 0,2 г в ампуле.

Активированный уголь — мелкий порошок, выпускаемый Ленинградским химзаводом. Предназначен для удаления риванола из сыворотки после ее обработки; расфасован по 0,5 г в ампуле.

Подготовка диагностического набора к работе. *Приготовление антигена:* в ампулу, содержащую вирусный материал, добавляют 1 мл стерильной дистиллированной воды или физиологического раствора, пипетируют до полного растворения содержимого, после чего готовый антиген переносят в пробирку и делают двукратные разведения от 1 : 20 до 1 : 640.

Приготовление антисыворотки: в ампулу, содержащую антисыворотку, добавляют 1 мл стерильной дистиллированной воды или физиологического раствора, пипетируют до полного растворения содержимого, после чего готовую сыворотку переносят в пробирку.

Приготовление рабочего 0,4%-ного раствора риванола: содержимое ампулы растворяют в 50 мл дистиллированной воды до полного растворения. Раствор риванола помещают на 30 минут при 37°, pH его доводят до 7,2—7,4 добавлением 0,5 н. раствора едкого натра (обычно 1—2 капли).

Обработка антисыворотки раствором риванола. Большинство нормальных и гипериммунных сывороток животных содержат неспецифические ингибиторы, подавляющие гемагглютинацию вируса классической чумы птиц и в меньшей степени вируса болезни Ньюкасла. Перед постановкой РТГА все сыворотки для удаления ингибиторов необходимо обработать раствором риванола. Для этого к 0,5 мл (1 часть) сыворотки добавляют 2 мл рабочего раствора риванола (4 части). Риванол добавляют небольшими объемами. В процессе обработки появляется осадок, который увеличивается, если смесь 2—3 раза встряхнуть и выдержать при температуре 4° 20—30 минут.

Обработанную риванолом сыворотку центрифугируют для осаждения коагулировавшего белка. Полученную надосадочную жидкость для удаления риванола обрабатывают порошком активированного угля (к 5 мл обработанной сыворотки добавляют 0,5 г активированного угля). Смесь обработанной сыворотки и активированного угля энергично встряхивают до тех пор, пока раствор из желтого станет бесцветным, после чего центрифугированием при 3000—5000 об/мин в течение 20 минут уголь осаждают, а надосадочную жидкость используют для постановки реакции задержки гемагглютинации. Необходимо помнить, что не удаленный из сыворотки риванол может вызвать спонтанную реакцию гемагглютинации. Диагностический набор снабжен наставлением, в котором показаны возможности его применения и методика постановки серологических реакций.

Приготовление 1%-ной суспензии эритроцитов кур. В качестве доноров для получения эритроцитов используют петухов породы белый леггорн в возрасте от 6 месяцев до одного года. Для того чтобы отобрать доноров эритроциты их испытывают на агглютинабельность. Петухов, эритроциты крови которых в контролях с физиологическим раствором показали отрицательные результаты, а с антигеном — положительные, отбирают для дальнейшей работы. Кровь у петухов берут общепринятым методом.

Исследуемые материалы, обладающие гемагглютинирующей активностью, испытывают с заведомо специфической антисывороткой в РТГА. Если исследуемые пробы не обладают гемагглютинирующей активностью, ставят РН. Во всех опытах (РГА, РТГА, РН) вместе с испытуемым материалом в качестве контроля и для сравнения полученных результатов используют диагностический антиген и антисыворотку.

В качестве исследуемого вируссодержащего материала можно использовать 10%-ную суспензию висцеральных органов (селезенка, печень, почки, легкие, мозг) больной или погибшей (лучше убитой в агональном состоянии) птицы, экстраэмбриональная жидкость и материал, полученный с культуры ткани.

Все перечисленные материалы вначале испытывают на гемагглютинирующую активность с 1%-ной взвесью эритроцитов кур и лошади. Параллельно с испытуемым материалом в качестве контроля используют и диагностический антиген.

Реакцию гемагглютинации (РГА) используют с целью ориентировочного определения присутствия вируса ньюкаслской болезни в исследуемом материале и для его титрования. Как известно, гемагглютинины вируса входят в состав вирусной частицы (вириона) и могут содержаться в следующих инфицированных вирусом материалах: аллантоисной и амниотической жидкостях, оболочках и органах куриного эмбриона, в легких, печени, почках и селезенке погибшей птицы, в жидкой и клеточной фракции тканевых культур. Можно брать эритроциты крови кур, морской свинки, лошади, человека и др. Различные виды вирусов и даже штаммы одного и того же вируса могут отличаться друг от друга по способности агглютинировать эритроциты указанных видов животных. Спектр гемагглютинации служит характеристикой биологической активности вируса и штаммов. Например, вирус болезни Ньюкасла не вызывает агглютинацию эритроцитов лошади, чем отличается от вируса классической чумы птиц, который способен агглютинировать их в высоких разведениях.

Для постановки ориентировочной реакции гемагглютинации на предметном стекле эритроциты используют в виде 5%-ной взвеси в физиологическом растворе. Для титрования вируса в РГА берут 1%-ную взвесь эритроцитов.

Для постановки ориентировочной РГА на хорошо вымытые предметные стекла (или чашки Петри) наносят каплю 5%-ной суспензии эритроцитов и каплю вируссодержащего материала, тщательно перемешивают (покачиванием или пастеровской пипеткой) и наблюдают за появлением хлопьев агглютинированных эритроцитов.

Для дифференциальной диагностики вируса болезни Ньюкасла и классической чумы птиц берут эритроциты кур и лошадей в параллельных опытах.

Реакция торможения гемагглютинации высокоспецифична, проста в выполнении и применяется в двух случаях: для идентификации исследуемого вируса по эталонной антисыворотке и наличия специфических антител по эталонному штамму вируса (при ретроспективной диагностике и серологической оценке поствакцинального иммунитета).

РТГА, как РГА, может быть поставлена в пробирках или на досках из плексигласа. Для идентификации вновь выделенных штаммов в РТГА используют иммунные сыворотки экспериментальных животных (кур, кроликов, лошадей), а при ретроспективной диагностике или оценке напряженности иммунитета — парные

ладает активностью в реакции гемагглютинации с 1%-ной взвесью куриных эритроцитов в разведении 1 : 320—1 : 1280. Инфекционный титр его достигает $ЕЛД_{50} = 10^{7,5}—10^{8,5}$ в 0,1 мл. Расфасован в ампулах по 1 мл. Антисыворотка, лиофилизированная гипериммунная сыворотка лошади, полученная после многократного введения антигена, обладает активностью в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с 4—8 гемагглютинирующими дозами (ГАД) в разведении 1 : 320—1 : 1280; индекс нейтрализации при разведении 1 : 20 не меньше чем 10 000; расфасована в ампулы по 1 мл.

Риванол — порошок желтого цвета. Предназначен для удаления неспецифических ингибиторов гемагглютинации из антисывороток, расфасован по 0,2 г в ампуле.

Активированный уголь — мелкий порошок, выпускаемый Ленинградским химзаводом. Предназначен для удаления риванола из сыворотки после ее обработки; расфасован по 0,5 г в ампуле.

Подготовка диагностического набора к работе. *Приготовление антигена:* в ампулу, содержащую вирусный материал, добавляют 1 мл стерильной дистиллированной воды или физиологического раствора, пипетируют до полного растворения содержимого, после чего готовый антиген переносят в пробирку и делают двукратные разведения от 1 : 20 до 1 : 640.

Приготовление антисыворотки: в ампулу, содержащую антисыворотку, добавляют 1 мл стерильной дистиллированной воды или физиологического раствора, пипетируют до полного растворения содержимого, после чего готовую сыворотку переносят в пробирку.

Приготовление рабочего 0,4%-ного раствора риванола: содержимое ампулы растворяют в 50 мл дистиллированной воды до полного растворения. Раствор риванола помещают на 30 минут при 37°, pH его доводят до 7,2—7,4 добавлением 0,5 н. раствора едкого натра (обычно 1—2 капли).

Обработка антисыворотки раствором риванола. Большинство нормальных и гипериммунных сывороток животных содержат неспецифические ингибиторы, подавляющие гемагглютинацию вируса классической чумы птиц и в меньшей степени вируса болезни Ньюкасла. Перед постановкой РТГА все сыворотки для удаления ингибиторов необходимо обработать раствором риванола. Для этого к 0,5 мл (1 часть) сыворотки добавляют 2 мл рабочего раствора риванола (4 части). Риванол добавляют небольшими объемами. В процессе обработки появляется осадок, который увеличивается, если смесь 2—3 раза встряхнуть и выдержать при температуре 4° 20—30 минут.

Обработанную риванолом сыворотку центрифугируют для осаждения коагулировавшего белка. Полученную надосадочную жидкость для удаления риванола обрабатывают порошком активированного угля (к 5 мл обработанной сыворотки добавляют 0,5 г активированного угля). Смесь обработанной сыворотки и активированного угля энергично встряхивают до тех пор, пока раствор из желтого станет бесцветным, после чего центрифугированием при 3000—5000 об/мин в течение 20 минут уголь осаждают, а надосадочную жидкость используют для постановки реакции задержки гемагглютинации. Необходимо помнить, что не удаленный из сыворотки риванол может вызвать спонтанную реакцию гемагглютинации. Диагностический набор снабжен наставлением, в котором показаны возможности его применения и методика постановки серологических реакций.

Приготовление 1%-ной суспензии эритроцитов кур. В качестве доноров для получения эритроцитов используют петухов породы белый леггорн в возрасте от 6 месяцев до одного года. Для того чтобы отобрать доноров эритроциты их испытывают на агглютинабельность. Петухов, эритроциты крови которых в контролях с физиологическим раствором показали отрицательные результаты, а с антигеном — положительные, отбирают для дальнейшей работы. Кровь у петухов берут общепринятым методом.

Исследуемые материалы, обладающие гемагглютинирующей активностью, испытывают с заведомо специфической антисывороткой в РТГА. Если исследуемые пробы не обладают гемагглютинирующей активностью, ставят РН. Во всех опытах (РГА, РТГА, РН) вместе с испытуемым материалом в качестве контроля и для сравнения полученных результатов используют диагностический антиген и антисыворотку.

В качестве исследуемого вируссодержащего материала можно использовать 10%-ную суспензию висцеральных органов (селезенка, печень, почки, легкие, мозг) больной или погибшей (лучше убитой в агональном состоянии) птицы, экстраэмбриональная жидкость и материал, полученный с культуры ткани.

Все перечисленные материалы вначале испытывают на гемагглютинирующую активность с 1%-ной взвесью эритроцитов кур и лошади. Параллельно с испытуемым материалом в качестве контроля используют и диагностический антиген.

Реакцию гемагглютинации (РГА) используют с целью ориентировочного определения присутствия вируса ньюкаслской болезни в исследуемом материале и для его титрования. Как известно, гемагглютинины вируса входят в состав вирусной частицы (вириона) и могут содержаться в следующих инфицированных вирусом материалах: аллантоисной и амниотической жидкостях, оболочках и органах куриного эмбриона, в легких, печени, почках и селезенке погибшей птицы, в жидкой и клеточной фракции тканевых культур. Можно брать эритроциты крови кур, морской свинки, лошади, человека и др. Различные виды вирусов и даже штаммы одного и того же вируса могут отличаться друг от друга по способности агглютинировать эритроциты указанных видов животных. Спектр гемагглютинации служит характеристикой биологической активности вируса и штаммов. Например, вирус болезни Ньюкасла не вызывает агглютинацию эритроцитов лошади, чем отличается от вируса классической чумы птиц, который способен агглютинировать их в высоких разведениях.

Для постановки ориентировочной реакции гемагглютинации на предметном стекле эритроциты используют в виде 5%-ной взвеси в физиологическом растворе. Для титрования вируса в РГА берут 1%-ную взвесь эритроцитов.

Для постановки ориентировочной РГА на хорошо вымытые предметные стекла (или чашки Петри) наносят каплю 5%-ной суспензии эритроцитов и каплю вируссодержащего материала, тщательно перемешивают (покачиванием или пастеровской пипеткой) и наблюдают за появлением хлопьев агглютинированных эритроцитов.

Для дифференциальной диагностики вируса болезни Ньюкасла и классической чумы птиц берут эритроциты кур и лошадей в параллельных опытах.

Реакция торможения гемагглютинации высокоспецифична, проста в выполнении и применяется в двух случаях: для идентификации исследуемого вируса по эталонной антисыворотке и наличия специфических антител по эталонному штамму вируса (при ретроспективной диагностике и серологической оценке поствакцинального иммунитета).

РТГА, как РГА, может быть поставлена в пробирках или на досках из плексигласа. Для идентификации вновь выделенных штаммов в РТГА используют иммунные сыворотки экспериментальных животных (кур, кроликов, лошадей), а при ретроспективной диагностике или оценке напряженности иммунитета — парные

сыворотки переболевшей или вакцинированной птицы для обнаружения прироста антител. Пробы сывороток крови, взятые в первые дни болезни или перед вакцинацией и спустя 20 дней после нее (или выздоровления), прогревают при температуре 58° 30 минут.

Реакцию нейтрализации ставят для определения антигенного родства испытуемого вируса с заведомо позитивной сывороткой, обладающей высокой вируснейтрализующей активностью* (при серологической идентификации вируса) или родства испытуемой сыворотки к заведомо известному вирусу — эталону (при ретроспективной диагностике или оценке напряженности иммунитета). В первом случае РН ставят в варианте «а», во втором—в варианте «б» общепринятым методом. Как известно, РН проводят в два этапа: первый этап — контактирование вируса с сывороткой при 37° в течение 60 минут и второй — заражение полученной смесью лабораторных животных, куриных эмбрионов, культуру ткани. Реакцию нейтрализации ставят главным образом в куриных эмбрионах, где хорошо размножается вирус болезни Ньюкасла.

Иммунофлуоресценция. Данный метод основан на применении родаминсульфохлорида для конъюгации иммунной сыворотки к вирусу с целью идентификации вирусного антигена в пораженных клетках павших и убитых птиц. Применение этого красителя наиболее приемлемо и удобно благодаря яркому оранжево-красному свечению антигена. ФИТЦ-конъюгаты (флуоресцеин изотиоционат) менее пригодны, так как клетки и сама межуточная ткань птиц обладает собственным свечением (аутофлуоресценцией) зеленого цвета в оценке на 2—3 креста, что затрудняет выявление специфического антигена (М. А. Шесточенко, 1969). Метод флуоресцирующих антител (с применением РСХ-красителя) можно использовать для обнаружения вирусного антигена в мазках-отпечатках из паренхиматозных органов больных или павших птиц, а также зараженных куриных эмбрионов. Помимо микроскопа МЛ-2 с возбуждающими фильтрами, ацетона, нефлуоресцирующего иммерсионного масла и воды, необходимо иметь иммунный гамма-глобулин против вируса болезни Ньюкасла, меченный родаминсульфохлоридом (РСХ).

Методика исследований. Тонкие и ровные (площадью не более 0,8×0,8 см) мазки-отпечатки готовят из печени, почки, селезенки. От каждого кусочка необходимо делать по три отпечатка на одном стекле. Для контроля подобным образом готовят препараты из паренхиматозных органов от здоровых невакцинированных птиц. После высушивания на воздухе препараты фиксируют охлажденным ацетоном в течение 4—10 минут. Для обнаружения специфического антигена применяют гомологичные РСХ-конъюгаты общепринятым методом. В большинстве случаев антиген выявляется в ядрах клеток белой крови (лимфоцитах, моноцитах, псевдоэозинофилах и эозинофилах), или пораженных клеток указанных органов в виде яркой флуоресценции оранжево-красного цвета. В контрольных препаратах, обработанных теми же гомологичными конъюгатами, подобного свечения не наблюдается, лишь в некоторых случаях выявляется точечное желто-оранжевое свечение в цитоплазме юных псевдоэозинофилов.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ньюкаслскую болезнь необходимо отличить от классической чумы птиц, инфекционного ларинготрахеита, инфекционного бронхита и микоплазмоза птиц. Если есть заведомо позитивная ви-

* Индекс нейтрализации не ниже 10 000.

руснейтрализующая антисыворотка болезни Ньюкасла, легко идентифицировать выделенный агент в реакциях нейтрализации и торможения гемагглютинации.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА И СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИММУНИТЕТА

У переболевшей птицы или вакцинированной живыми вакцинами (F, B_1, Za-Sota, H и др.) выявляются антитела (антигенагглютинины, нейтрализующие и комплементсвязывающие). Для определения антигенагглютининов и нейтрализующих антител ставят РТГА и РН.

Указанные исследования проводят только с парными сыворотками, полученными от одних и тех же птиц (или из одной и той же группы птиц). Первую пробу берут перед вакцинацией (или в начале болезни), вторую — на 15—20-й день; последующие пробы берут в любое время (обычно один раз в месяц). Сыворотки получают путем прокола подкрыльцовой вены или убоя нескольких цыплят (4—6 цыплят из каждой исследуемой группы). Полученные сыворотки обрабатывают при температуре 58° 30 минут, после чего используют для постановки РТГА или РН.

Результаты считаются положительными, если разница в титрах первой и второй сыворотки составляет не менее трех разведений. Титр антител в РТГА 1 : 32 и выше у вакцинированной птицы свидетельствует о наличии специфического иммунитета. Техника постановки РН и РТГА описана выше.

При атипичном течении ньюкаслской болезни также исследуют парные пробы сывороток. Повышение числа положительно реагирующих в РТГА между двумя исследованиями свидетельствует о распространении инфекции в стаде.

Изготовление и контроль диагностического набора в условиях биофабрики. Набор включает диагностическую антисыворотку к штамму H, диагностический антиген — штамм H*, риванол и активированный уголь. Сухой диагностический антиген (лиофилизированная, содержащая штамм H экстраэмбриональная жидкость) должен иметь остаточную влажность не более 3—4% и сохраняться под вакуумом в темноте при температуре 4—8° не менее года.

Получение гипериммунной диагностической сыворотки производится на лошадях, которых подкожно иммунизируют антигеном, изготовляемым из вирусосодержащей (штамм H) экстраэмбриональной жидкости. Последнюю перед использованием очищают и концентрируют на центрифуге VAC-40. Для удаления крупных частиц ее центрифугируют при 10 000 g в течение часа. Затем надосадочную жидкость стерильно сливают и повторно центрифугируют 3 часа при 40 000 g. Надосадочную жидкость сливают, а к осадку добавляют стерильный физиологический раствор в объеме в 10 раз меньшем, чем исходный. Осадок ресуспендируют, к суспензии добавляют 6—7% гидроокиси алюминия из расчета на 100 мл суспензии вируса 20 мл ГОА. Далее материал помещают в рефрижератор (4, 8°), на 10—14 часов для сорбции вируса, затем сорбированным на ГОА вирусом гипериммунизируют лошадей по следующей схеме: первые три дня животным вводят внутривенно очищенный (несорбированный) вирус (антиген) в дозе 0,1 мл/кг веса животного. Через 21 день после последней инъекции вируса лошадям вводят подкожно сорбированный на ГОА антиген (вирус) в 8—10 точек шеи, спины, крупа в дозе по 0,3 мл/кг веса животного. На 12-й день после последней инъекции антигена у животных берут пробу крови для определения уровня антител. При титре сыворотки в РТГА не ниже 1 : 640—1 : 1280 берут 4—5 л крови. Через месяц (время отдыха) сорбированный антиген вводят повторно подкожно также из расчета 0,3 мл/кг веса животного. На 14-й день после введения антигена берут кровь. Если в сыворотке крови есть антигемагглютинины, последующие кровопускания делают каждый месяц. Кровь

---

* Лиофилизированный антиген H не снижает инфекционную и гемагглютинирующую активность при 4—8° в течение 12 месяцев.

берут в 1—2-литровые цилиндры, которые для ретракции сгустка помещают на час в термостат при температуре 37,5—38°, затем сыворотку стерильно отсасывают и помещают в рефрижератор (4, 8°). Через 18—24 часа сыворотку отсасывают повторно, консервируют мертиолятом (1 : 5000) и разливают в 5 мл ампулы по 1 мл.

В диагностическом наборе должен иметься активированный порошкообразный уголь, расфасованный по 0,5 г в 5-миллиметровых запаянных ампулах, и сухой риванол по 0,2 г. В каждой коробке диагностического набора имеется по 20 ампул угля и по две ампулы с риванолом. Кроме того, в каждой коробке содержится по три ампулы диагностического антигена и антисыворотки.

Проверка активности и специфичности диагностической сыворотки. Антисыворотка должна быть прозрачной, соломенного цвета, без осадка; в лиофилизированном виде — кремового цвета порошок, легко отстающий от стенок ампулы при встряхивании. Антигемагглютинирующая и нейтрализующая активность лиофилизированных сывороток сохраняется не менее двух лет при температуре 4—8°.

ГРИПП ПТИЦ
(INFLUENZA A/GALLI)

Грипп птиц — острая контагиозная болезнь кур, уток, индеек и других птиц, проявляющаяся общим угнетением, отеками или преимущественным поражением органов дыхания.

До 1949 г. единственным представителем гриппа кур являлась истинная (классическая) чума кур, вызываемая высоковирулентными штаммами: «Дач», «Росток», «Вена», «Вейбридж» и др. Поскольку данная инфекция не регистрировалась на территории СССР с 1927 г. и отмечалась лишь в некоторых странах Африканского континента, опасность появления и распространения ее считали нереальной. Не предполагалось и наличия антигенных вариантов этого вируса. Однако в 1949 г. Динтер и Бакос при вспышке болезни среди цыплят в ФРГ выделили вирус N. Этот вирус в антигенном отношении отличался от штаммов вируса классической чумы птиц и был апатогенен для взрослой птицы. Впоследствии вирус N был типирован как антигенная разновидность возбудителя гриппа птиц.

В 1956 г. Шеффер и Ватерсон впервые установили принадлежность вируса истинной (классической) чумы птиц к гриппу типа А — Myxovirus influenza A.

В дальнейшем сообщалось о выделении вирусов гриппа от кур, цыплят, уток, индеек, перепелов, крачек, воробьев и других птиц. Выделенные при этом штаммы в антигенном отношении отличались то вируса истинной чумы птиц, имея общий S-антиген, родственный гриппу типа А. Они различались по поверхностному V-антигену, нейраминидазной активности и антигенным свойствам этого фермента.

В 1967 г. в СССР Нгуен Ван Тим, Н. Г. Осидзе и В. Н. Сюрин при вспышке болезни среди цыплят в одном хозяйстве выделили антигенный вариант вируса гриппа птиц типа А (штамм 314). В 1968 г. Г. А. Иванова, Н. Г. Осидзе и В. Н. Сюрин изучили другой высоковирулентный штамм С гриппа кур, вызвавший тяжелую вспышку болезни в другом хозяйстве. По антигенным и иммунобиологическим свойствам этот штамм оказался близким к вирусу классической чумы птиц.

В 1970—1971 гг. Н. Г. Осидзе, В. Н. Сюрин и З. Я. Чистова выделили из пяти хозяйств антигенный вариант вируса гриппа птиц, отличающийся в РТГА от штамма 314/67, G/68, «Ростока» Ch/Scotl./59 и других вариантов птичьего гриппа. У больных гриппом птиц поражался преимущественно желудочно-кишечный тракт. Штаммы Б, Щ, О, К, П и З обнаружили антигенное родство с канадскими штаммами гриппа А/индеек.

В ряде случаев вспышки гриппа на фермах были связаны с заболеванием диких перелетных птиц. Так, в ноябре 1959 г. среди цыплят в Шотландии началась эпизоотия чумоподобной болезни, во время которой был выделен эпизоотический штамм, обозначенный A/Chicken/Scotland/59/. Болезнь вспыхнула после шторма, во время которого погибло, а также появилось на ферме много морских чаек. В 1961 г. вирус, выделенный в Северной Африке от крачек (A/Tern/South/Africa/61), обнаружил близкое антигенное родство с шотландским штаммом цыплят A/Chicken/Scotland/59.

В Англии, например, причиной ежегодного появления гриппа среди индеек являются дикие птицы, мигрирующие из Северной Африки, на территории которой регистрируется чума птиц.

КЛАССИЧЕСКАЯ ЧУМА ПТИЦ
(INFLUENZA A/FOWL PLAQUE/DUCK. 1929)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Классическая чума (истинная, обычная), экссудативный тиф, брауншвейгская болезнь кур, грипп птиц [⊥]; вызываемая вирусом гриппа птиц Myxovirus influenza/A Fowl plaque, — острая инфекционная болезнь, характеризующаяся чрезвычайно быстрым течением и высокой смертностью. За последние годы с открытием других слабопатогенных возбудителей гриппа птиц указанное определение относится только к истинной, или классической, чуме птиц, которая, как известно теперь, является антигенной разновидностью гриппа птиц.

В настоящее время классическая чума птиц как острое высокопатогенное заболевание кур всех возрастов регистрируется сравнительно редко. Чаще эта инфекция проявляется эндемическими вспышками болезни среди цыплят, вызываемыми штаммами низкой патогенности. Такие вспышки зарегистрированы в СССР, Италии, Англии, США, ФРГ и других странах.

Болезнь, вызываемая вирусом классической чумы птиц, характеризуется коротким инкубационным периодом, острым течением, быстрым развитием, внезапным повышением температуры, прекращением яйценоскости, отеками головы, поражениями органов дыхания, посинением гребня и гибелью через 24 часа. На ранней стадии болезни можно наблюдать нервные явления, некроз гребня и сережек.

Патологоанатомические изменения свидетельствуют о поражении слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта.

Слизистая оболочка с кровоизлияниями утолщена и обильно покрыта слизистыми выделениями; в селезенке, печени, почках и в центральной нервной системе видны очаги некроза. Смертность варьирует от 40 до 100%.

Симптомы классической (европейской) чумы птиц и ньюкаслской болезни (псевдочумы) во многом идентичны.

Во-первых, эпизоотологические данные — заносный характер инфекций, чаще протекают с поражением большого количества птицы и высоким процентом смертности. Восприимчивы птицы из семейства куриных и устойчивы водоплавающие птицы. Во-вторых, этиологические — высокая вирулентность возбудителей, высокая концентрация их в организме больных, легкая культивируемость на куриных эмбрионах. В-третьих, клинические — острый септический характер течения, потемнение гребня, сережек, выделение слизи из ротовой и носовой полости, затрудненное дыхание, угнетенное состояние, судороги, полупараличи и параличи. В-четвертых, — патологоанатомические, происходит набухание сосочков телец, кровоизлияния на слизистой оболочке железистого желудка, под кутикулой мышечного желудка, на слизистой ротовой полости, пищевода, иногда двенадцатиперстной и прямой кишок, носовой полости, трахеи, на серозных оболочках, в желтках, печени.

Учитывая приведенные сведения, точный диагноз на классическую чуму птиц можно поставить только проведением лабораторных исследований.

ВИРУС

Согласно современной классификации вирусов гриппа человека и животных, возбудитель классической чумы птиц относится к вирусу гриппа птиц типа А (Myxovirus influenza A), первому антигенному подтипу — А (Fowl pla-

que), представленному такими классическими штаммами, как «Дар», «Росток», «Вена», «Вейбридж», «Брешиа» и др.

Помимо первого подтипа гриппа птиц, включающего штаммы классической чумы, имеются и другие антигенные разновидности его, отличающиеся патогенностью только для цыплят и не вызывающие заболевания взрослых кур. К таким штаммам относится A/Virus N/49 (Динтер и Бакос, 1949), A/Chicken/Scot-land/59, A/курица/СССР/67 (Н. Г. Осидзе, Нгуен Ван Тим и В. Н. Сюрин, 1967) и др.

Вирус классической чумы птиц (как и другие вирусы гриппа птиц) содержит РНК и три структурных белка: S-антиген (нуклеопротеид, внутренний, растворимый антиген), V-антиген (гемагглютинин) и фермент нейраминидазу. Интактные частицы вируса гриппа полиморфны; наряду с шаровидными и овальными формами диаметром 80—120 ммк в препаратах встречаются удлиненные нитевидные структуры.

Рибонуклеопротеид (S-антиген) является типоспецифическим антигеном и обнаруживается при помощи РСК, а гемагглютинин (V-антиген) — штаммоспецифическим антигеном и обнаруживается при помощи РТГА, РСК, а также РН.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. При температуре 55° вирус инактивируется в течение часа, при 60° — в течение 10 минут, при 65—70° — 5—2 минут. Вируссодержащая кровь и экссудаты в запаянных пипетках в темном месте при температуре минус 30° могут сохранять вирулентность более 2 лет. Прямой солнечный свет обезвреживает вирус в течение 40 часов. Его инактивирует также 3%-ная хлорная известь, 2%-ная едкая щелочь, 5%-ный креолин, 5%-ный раствор карболовой кислоты. Вирус быстро инактивируется при pH ниже 4,0 и выше 12,7.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Материал, содержащий вирус классической чумы птиц, сохраняют так же, как материал, содержащий вирус ньюкаслской болезни.

Локализация в организме. Вирус обнаруживается в крови, селезенке, легких, печени, головном мозге и содержимом кишечника больной птицы. В наибольшей концентрации (до 10^7—10^8 ELD_{50}/мл) он обнаруживается в легких, селезенке.

Антигенная вариабельность. Собственно вирус классической чумы птиц представляет одну из антигенных разновидностей вируса гриппа птиц типа A/Myxovirus influenza — A/Fowl plaque/27. Другие антигенные варианты вируса гриппа птиц — вирус N/Динтер, Бакос, 1949/, A/Chick/Scotland/59, A/курица/314/67 (Нгуен Ван Тим и др.), как правило, патогенны только для цыплят.

Антигенная активность. В сыворотке крови переболевшей птицы образуются антигемагглютинины, вируснейтрализующие и комплементсвязывающие антитела. Антигемагглютинины появляются на 7—9-й день и регистрируют в титрах 1 : 64—1 : 128 до 4—5 месяцев.

Для определения антигенного родства между штаммами вируса гриппа птиц применяют РСК, РТГА и РН на куриных эмбрионах, мышах, культуре ткани.

Недостатком РТГА является присутствие неспецифических ингибиторов гемагглютинации в сыворотках крови кроликов. Обычно все известные штаммы гриппа птиц нечувствительны к термостабильным ингибиторам, содержавшимся в сыворотке крови морской свинки, поэтому обработка сыворотки их может ограничиться только прогреванием.

Необходимо иметь в виду, что, применяя РСК, нельзя обнаруживать те серологические различия между штаммами, которые выявляются в РТГА. С получением очищенных V-антигенов, стандартных диагностикумов и штаммоспецифических абсорбированных сывороток стало возможным более широкое применение штаммоспецифической РСК и РТГА для изучения антигенной структуры вируса гриппа птиц. Так, при помощи антигенов, приготовленных по Г. В. Еремееву, удается дифференцировать комплементсвязывающие антитела к различным подтипам вируса гриппа птиц типа А, не прибегая к штаммоспецифическим V-антигенам, приготовленным по Лиф и Генле (1959).

В последние годы для изучения иммунологического родства между штаммами этого вируса стал широко использоваться метод повторного перекрестного заражения птицы.

Гемагглютинирующие и гемолитические свойства. Вирус классической чумы птиц вызывает агглютинацию эритроцитов крови животных различных видов. Он обладает более широким спектром гемагглютинации, чем возбудитель ньюкаслской болезни, который не агглютинирует эритроциты лошади, кошки и овцы, что используют для лабораторной идентификации двух вирусов. Вирус чумы птиц не обладает гемолитическими свойствами.

Ферментативная активность. По различному сочетанию элюирующей и нейраминидазной активности штаммы вируса гриппа животных и птиц можно разделить на четыре группы. К первой группе отнесены штаммы цыплят /шотл/59 и крачка/Афр/61, характеризующиеся высокой нейраминидазной активностью (110 мкг/мл). Ко второй группе отнесены штаммы гриппа свиней типа А с активностью от 23 до 34 мкг/мл. В третью группу включены штаммы с низкой нейраминидазной активностью (от 10 до 18 мкг/мл) — A/Equi I; A/Equi/II; A/Duck/England/56; A/Duck/Czechosl/56 и вирус классической чумы птиц. К четвертой группе отнесен только один штамм гриппа человека типа Ао, у которого нейраминидазную активность определить не удалось (Т. В. Пысина, 1969). Установлено, что антигенно родственные штаммы обладают сходной нейраминидазной активностью (A/Tern/S. A./61 и A/Ch/Sc./59 и A/Equi/II/61). Штаммы второй группы характеризуются замедленным темпом элюции. Не обнаружено параллелизма между элюирующей и нейраминидазной активностью.

Кроме того, установлено, что штаммы, обладающие низкой ферментативной активностью, лучше размножаются в дыхательных путях лабораторных животных, чем штаммы с высокой активностью.

За последние годы установлено, что антигенные свойства нейраминидазы различных подтипов вируса гриппа птиц и животных не идентичны. Причем антигенные различия между штаммами в РТГА по V-антигену не совпадают с антигенными различиями по нейраминидазе.

Чувствительность к ингибиторам. Штаммы вируса гриппа различаются по чувствительности к неспецифическим ингибиторам мукополисахаридной и мукопротеидной природы. Ингибиторочувствительные варианты обладают свойством более прочно взаимодействовать с атакуемой клеткой, чем ингибиторорезистентные.

Спектр патогенности. В экспериментальных условиях вирус классической чумы птиц патогенен преимущественно для кур, индеек, цесарок, фазанов, павлинов. Сообщения о выделении вируса гриппа от кур, воробьев, грачек, перепелов, фазанов, уток, индюков, обнаружение антигемагглютининов в сыворотках диких птиц к вирусам домашних птиц показывают, что спектр патогенности этого вируса все более расширяется. В естественных условиях разные штаммы вирусов гриппа имеют различную степень патогенности.

К искусственному заражению восприимчивы многие виды диких птиц. Некоторые штаммы могут хорошо пассироваться на белых мышах при интрацеребральном и интраназальном методах заражения. По мере адаптации вирус приобретает выраженный тропизм в зависимости от метода инокуляции. Кролики, белые крысы, морские свинки и голуби устойчивы к данному вирусу при интрацеребральном и интраназальном заражении.

Т. В. Пысина (1969) установила, что малопатогенные для мышей штаммы A/Chick/Scotland и A/Duck/Czechosl, вызывающие у них скрытую инфекцию, могут играть роль в обмене вирусами между дикими и домашними птицами. Подтверждением этой точки зрения явилось и обнаружение антител у диких птиц к вирусам A/Chick/Scotl. и A/Duck/Czech., для которых характерна невысокая патогенность для мышей.

Единичные находки антител к вирусу А/Ут. в сыворотках молодых птиц, добытых во время осенних пролетов, указывают на возможность существования очагов «птичьего» гриппа в местах гнездований на Крайнем Севере. Для выяснения источника инфицирования птиц вирусами гриппа необходимо знать, переносят ли гриппозную инфекцию дикие птицы домашним или обмен идет в обратном направлении.

Токсические свойства. Вирусы гриппа нарушают гемодинамику (полнокровие сосудов, кровоизлияния, отек). Особенно резко эти нарушения выражены у мышей, зараженных штаммами классической чумы птиц, гриппом птиц типа A/Duck и A/Term; менее токсичными оказались штаммы A/Czech и A/Chick/Scotl/59.

Токсичность вируса определяют введением мышам весом 7—8 г аллантоисной культуры вируса в хвостовую вену в объеме 0,5—1 мл или в мозг в объеме 0,03 мл. При введении токсических штаммов мыши погибают в течение 1—3 суток.

Культивирование вируса в лабораторных условиях. Вирус классической чумы птиц культивируется в развивающихся куриных эмбрионах при заражении их в аллантоисную полость или на хориоаллантоисную оболочку. Зараженные эмбрионы погибают через 18—28 часов. Овокультура вируса обладает инфекционными и гемагглютинирующими свойствами. При заражении в аллантоисную полость «эмбриональными» штаммами наивысшая концентрация вируса наблюдается в хориоаллантоисной оболочке, теле эмбриона, аллантоисной жидкости и в меньшей степени в амниотической жидкости. Наибольшая концентрация (10^7—10^9 ELD_{50}) и наивысшая гемагглютинирующая активность (1:256—1:2048) вируса бывает к моменту гибели эмбрионов.

Вирус классической чумы птиц можно культивировать также в утиных и голубиных эмбрионах.

Вирус хорошо развивается в культуре фибробластов куриного эмбриона. Цитопатогенное действие обычно проявляется через 24—48 часов. Присутствие его устанавливают при помощи реакций гемагглютинации и реакции гемадсорбции.

Помимо фибробластов куриных эмбрионов, вирус классической чумы птиц удается адаптировать и к другим первичным и перевиваемым культурам клеток: легочной ткани эмбриона человека, культуре клеток почки свиньи, перевиваемым линиям клеток КЭМ-Ла и HeLa.

В условиях лаборатории вирус можно практически бесконечно пассировать на восприимчивой птице при внутримышечном, подкожном и интрацеребральном заражении.

Природная изменчивость. Существуют разные взгляды на антигенную изменчивость вируса гриппа птиц (в том числе и вируса классической чумы птиц). Она обусловлена или периодическим перераспределением доминирующих антигенов (Фрэнсис, 1959), или заменой новым антигеном с исключением из циркуляции штаммов-предшественников (Эндрюс, 1957). Существует и третья точка зрения, согласно которой изменчивость сводится к рекомбинации антигенно различных штаммов и последующему отбору вариантов, способных противостоять действию иммунитета птицепоголовья.

По мнению Перейра и др. (1966), естественное изменение антигенной структуры птичьих вирусов гриппа является непрерывным процессом, протекающим при отсутствии четких антигенных различий. Поэтому классифицировать вирус гриппа птиц на подтипы, равнозначные тем, на которые подразделяются вирусы гриппа человека и лошадей, невозможно.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Применяемые в настоящее время методы лабораторной диагностики гриппа птиц можно разделить на две группы: методы ранней и ретроспективной лабораторной диагностики.

К методам ранней лабораторной диагностики относятся иммунофлуоресценция, риноцитоскопия, изоляция вируса из выделений верхних дыхательных путей и органов павших и убитых птиц на куриных эмбрионах и его идентификация.

Иммунофлуоресценция, т. е. обнаружение вируса и его антигена в мазках-отпечатках со слизистой носовой оболочки при помо-

щи специфических сывороток, меченных флуоресцирующими красителями,— наиболее специфичный и быстрый метод ранней диагностики.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Для выделения вируса берут печень, селезенку, легкие, мозг, трахею, носовые истечения, слизистую оболочку и подглазничные синусы. Испытуемую суспензию инокулируют цыплятам 2—3-месячного возраста, а также в амниотическую или аллантоисную полости 10—12-суточных куриных эмбрионов. Летальную инфекцию у цыплят можно вызвать при любом методе заражения (подкожно, внутримышечно, в мозг, конъюнктиву). Заражение per os с кормом и водой удается непостоянно. Зараженные цыплята, как правило, гибнут через 36—72 часа.

Эмбрионы инкубируют в течение 28—30—48 часов при 37°. Если в испытуемом материале есть вирус, то уже после трех пассажей в аллантоисной жидкости вирулентность его для эмбрионов возрастает до 10^6—10^7 $ЕИД_{50}$/мл.

При выделении слабовирулентных штаммов гриппа птиц первые три пассажа следует проводить в амниотической полости. В дальнейшем после обнаружения его с помощью РГА вирус последовательно пассируют на эмбрионах при заражении их в аллантоисную полость.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВНОВЬ ВЫДЕЛЕННЫХ ШТАММОВ И ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ

Наличие вируса в зараженных эмбрионах обычно легко устанавливают РА. Идентификацию вновь выделенного штамма проводят с целью определения его серологического типа. Для типирования вируса при помощи РТГА наиболее пригодна аллантоисная жидкость куриного эмбриона.

Типирование вируса гриппа птиц (в том числе и классической чумы) проводят при помощи типовых иммунных сывороток крыс, петухов и кроликов*. Чем выше разведение сыворотки, в котором отмечается отрицательная РТГА с новым вирусом, тем ближе определится антигенное родство выделенного штамма с одним из ранее известных типов вируса по его антисыворотке. При этом особо учитывают титр каждой сыворотки со своим (гомологичным) вирусом. Совпадение гомологичного титра сыворотки с гетерологичным, т. е. с титром к другому штамму, свидетельствует об идентичности обоих вирусов, об их принадлежности к одному и тому же серологическому типу.

---

* Для их получения крыс и кроликов иммунизируют внутрибрюшинным методом двукратно или трехкратно.

При двукратной иммунизации используют вируссодержащую аллантоисную жидкость, которую вводят в количестве 2—5 мл крысам и 5—10 мл кроликам с интервалом в один месяц. Через 10 дней после второй инъекции делают пробное кровопускание для определения антител в сыворотке. При титре антигемагглютининов не ниже 1 : 320 животных обескровливают, сыворотку, полученную от нескольких животных, объединяют, прогревают 30 минут при 60° и консервируют фенилмеркурикинитратом (1 : 50 000), разливают в ампулы и хранят при 2°.

Иногда может быть установлено частичное серологическое родство, когда гетерологичный титр равен $^1/_2$, $^1/_4$ или $^1/_8$ гомологичного титра. Обычно единицей обозначают гомологичный титр сыворотки дробями — $^1/_2$, $^1/_4$, $^1/_8$ и т. д. — гетерологичные титры, нулем — отсутствие антигенного родства или родство, составляющее дробь меньше $^1/_{32}$.

Когда РТГА не удается установить родственные связи между вновь выделенным штаммом и каким-либо подтипом вируса гриппа птиц по антисыворотками, используют РСК с растворимым S-антигеном вируса гриппа, который обладает типовой, но не штаммовой специфичностью.

При сравнительном изучении антигенной структуры вируса гриппа животных и птиц все испытуемые штаммы проверяют на чувствительность к неспецифическим ингибиторам гемагглютинации с сывороткой морской свинки, которая, как известно, содержит термостабильные α- и γ-ингибиторы к некоторым штаммам вируса гриппа типа А.

Антигенную структуру можно изучать при помощи одной из трех реакций:

реакции связывания комплемента — испытуемая сыворотка со стандартными диагностикумами, приготовленными по Еремееву;

реакция торможения гемагглютинации — испытуемая сыворотка со стандартными диагностикумами или штаммоспецифические абсорбированные сыворотки с испытуемым штаммом;

реакции диффузионной преципитации. Для этого необходимо иметь очищенные антигены (растворимый S-антиген, вирусный V-антиген по Лиф и Хенле, диализованные по Бранду и Кеплю, методом адсорбции-элюции или высаливания) и испытуемую сыворотку или очищенный испытуемый вирус и абсорбированные штаммоспецифические сыворотки.

Нужно помнить, что некоторые штаммы гриппа млекопитающих и птиц независимо от их происхождения имеют двустороннюю или одностороннюю антигенную взаимосвязи.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Классическую чуму и другие формы гриппа птиц следует отличать от ньюкаслской болезни, холеры, инфекционного бронхита, инфекционного ларинготрахеита, гемофилеза и респираторного микоплазмоза. Классическая чума птиц, вызываемая вирусом Fowl plaque (Duck) 1929, протекает остро с летальным исходом и по клиническому проявлению сходна с острым течением ньюкаслской болезни, от которой она должна быть дифференцирована в первую очередь. Вышеуказанный диагностический набор используется для идентификации вирусов ньюкаслской болезни и классической чумы птиц. С учетом этого составными компонентами набора являются антиген вируса классической чумы птиц (неинфекционный), обладающий гемагглютинирующей и комплементсвязывающей активностью *, и антисыворотка к вирусу классической чумы птиц, обладающая нейтрализующей и антигемагглютини-

При трехкратной иммунизации антиген вводят в тех же количествах с недельным интервалом. Через 10 дней после последней инъекции делают пробное кровопускание.

Петухов иммунизируют так же, с той лишь разницей, что количество вводимого антигена доводят до 10 мл на каждую инъекцию и полученную сыворотку прогревают при 56° в течение 30 минут.

* Антиген представляет лиофилизированную вирусосодержащую аллантоисную культуру штамма «Росток», инактивированную эфиром. ГА-активность такого препарата с 1%-ной взвесью куриных эритроцитов составляет 1 : 128—1 : 1024. Срок годности при температуре хранения 4—18° не менее года.

рующей активностью *. Помимо этого, в том же наборе должна быть нормальная сыворотка, риванол и активированный уголь.

Если под рукой нет необходимых типоспецифических сывороток, идентификацию вирусов классической чумы и ньюкаслской болезни можно провести при помощи других методов, применяемых в настоящее время в лабораторной практике (Г. А. Иванова, Г. А. Сафонов, В. Н. Сюрин и др., 1965).

Гемагглютинация с тканевыми суспензиями. Данный тест основан на различии в агглютинирующей активности вируссодержащих тканевых суспензий. Суспензии из селезенки, печени и легких птицы, погибшей от классической чумы, содержат вирус в высокой концентрации и обладают высокой гемагглютинирующей активностью, в то время как при ньюкаслской болезни гемагглютинины можно обнаружить только в суспензиях из органов цыплят, а не взрослой птицы.

Из полученного патологического материала (селезенка, печень, легкие, мозг) готовят 10%-ные суспензии, которые испытывают на гемагглютинирующую активность с 1%-ной взвесью эритроцитов кур или морской свинки.

Суспензии, приготовленные из органов птиц, погибших от вируса классической чумы (в возрасте от 1 дня и старше), обычно обладают гемагглютинирующей активностью в разведении 1 : 16—1 : 512 и выше. Титр гемагглютинации бывает высокий, если птица погибает в пределах 48—96 часов. При длительном переболевании (120 часов и выше) суспензии могут не обладать гемагглютинирующей активностью. Проявление гемагглютинирующей активности суспензий, содержащих вирус болезни Ньюкасла, неэкономерно.

Гемагглютинирующие суспензии испытываются в РТГА с диагностическими антисыворотками к вирусам болезни Ньюкасла и классической чумы птиц. РТГА в данном случае является [illegible]ецифической и окончательной.

Гемагглютинация с эрит[illegible]ади. При отсутствии диагностических сывороток можно ставить [illegible]тами крови лошади, которые агглютинируются вирусом класс[illegible]ц и не агглютинируются вирусом болезни Ньюкасла. Для э[illegible]жидкости куриных эмбрионов, погибших от обоих вирусов [illegible]А с 1%-ной взвесью эритроцитов крови кур и лошадей.

Тест с азотистой кис[illegible]вороток, как дополнение к РГА с эритроцитами кур и [illegible]ность можно обрабатывать азотистой кислотой. [illegible]кой чумы птиц полностью инактивируются п[illegible]оторая не влияет на вирус ньюкаслской болезни[illegible]ом виде быстро разлагается, поэтому ее получают не[illegible]робирке с исследуемым материалом. Она образуется при взаимодей[illegible]створа азотнокислого серебра с ацетатным буфером. Для этого в пробирку, содержащую 1 мл исследуемого материала, вливают 0,5 мл 4 М раствора азотнокислого серебра и 0,5 мл 1 М ацетатного буфера и оставляют для контакта на 60 минут при 37°. После чего полученную смесь используют для постановки РГА. При оценке результатов РГА следует учитывать, что в первых трех разведениях под действием азотистой кислоты происходит частичное разрушение и склеивание эритроцитов (до 1 : 8).

Иммунологическая проба. В сомнительных случаях для дифференциального диагноза ставят РН на куриных эмбрионах и заражают птиц, предварительно

---

* Гипериммунные сыворотки к вирусу классической чумы птиц (гриппу птиц A^1) готовят на овцах; активность их в РТГА 1 : 160—1 : 2560. Вирусонейтрализующая активность их со штаммами вируса гриппа птиц колеблется в пределах 10^5—10^6 при отрицательном индексе со штаммом Н вируса болезни Ньюкасла. Активность и специфичность сывороток не снижаются в течение года при хранении в условиях 4—6° (Г. А. Сафонов, 1970).

Исследования с диагностическим набором проводят во всех лабораториях, имеющих условия для культивирования вирусов.

иммунных к вирусу болезни Ньюкасла. Для этого берут 12—16 кур (желательно, чтобы возраст птицы, взятой в опыт, соответствовал возрасту птицы, от которой был выделен материал). Половину кур (6—8) отсаживают и иммунизируют живой вакциной из штаммов H и B_1 (вируса болезни Ньюкасла), оставшихся — штаммами P_5 или Ру (вируса классической чумы птиц) в дозе 10^3 ELD_{50}. Через 10—12 дней кур обеих групп заражают исследуемым материалом в дозе 10^3 ELD_{50}. В случае родства вся привитая птица выживает (допускается гибель 1—2 птиц из 10 в иммунной группе) при 100%-ной гибели контрольной.

Оба теста высокоспецифичны, но при их постановке диагноз может быть поставлен только через 4—10 суток.

ТАБЛИЦА 1

Основные различия в биологических свойствах вирусов классической чумы и ньюкаслской болезни

Маркеры	Вирусы	
	классической чумы птиц	ньюкаслской болезни
Экспресс-диагностика		
Реакция гемагглютинации с суспензиями из висцеральных органов:		
взрослых кур	+	—
цыплят	+	+
Реакция гемагглютинации с эритроцитами:		
петуха	+	+
лошади	+	—
кошки	+	—
Чувствительность гемагглютининов к действию:		
азотистой кислоты	+	—
Адсорбция гемагглютининов на формалинизированных эритроцитах, предварительно обработанных:		
вирусом классической чумы	—	+
вирусом ньюкаслской болезни	+	—
Лабораторная диагностика		
Выделение вируса на куриных эмбрионах	+	+
Сроки гибели зараженных:		
эмбрионов	До 30 часов	Больше 30 часов
птицы	Около 48 часов	Больше 96 часов
Патогенность для:		
мышей	+	—
голубей	—	+
Отношение: $\frac{\text{титр ГА в хорионаллантоисной оболочке}}{\text{титр ГА в аллантоисной жидкости}}$	больше 1	меньше 1
Чувствительность к фотодинамическому действию метиленовой синей	+	—

Условные обозначения: + положительные результаты; — отрицательные результаты.

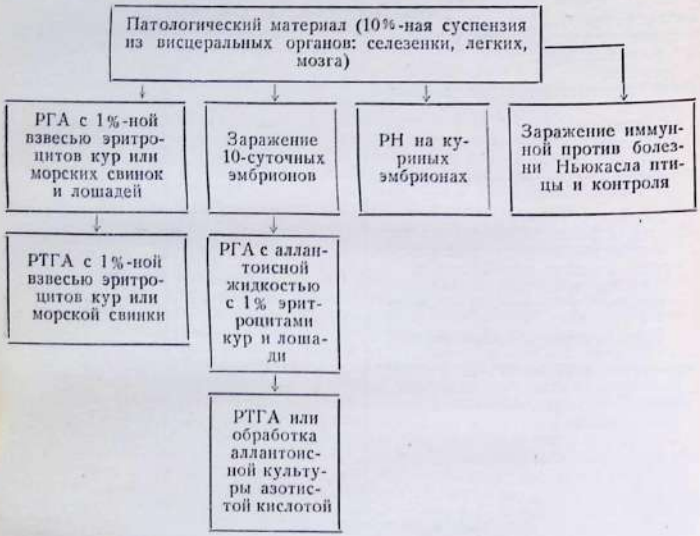
Тест с сенсибилизированными эритроцитами. Для дифференциации этих болезней можно использовать метод агглютинации сенсибилизированных эритроцитов (пассивная гемагглютинация). Гипериммунная в отношении вируса ньюкаслской болезни сыворотка агглютинирует эритроциты, обработанные только гомологичным вирусом, и совершенно не реагирует с эритроцитами, сенсибилизированными вирусом чумы птиц. Аналогично ведет себя сыворотка чумы птиц к гомологично сенсибилизированным эритроцитам.

При постановке дифференциального диагноза на вирус болезни Ньюкасла и классической чумы птиц следует учитывать все перечисленные и другие биологические особенности вирусов (Г. А. Сафонов, Г. А. Иванова, В. Н. Сюрин, 1964) (табл. 1).

Ниже приводится схема исследования материала на присутствие вирусов болезни Ньюкасла и классической чумы птиц (Г. А. Сафонов, А. Дымин, 1968).

СХЕМА

исследования материала на обнаружение вирусов болезни Ньюкасла и классической чумы птиц



Вялое течение гриппа сходно с течением вышеуказанных респираторных болезней и клинически не может быть точно дифференцировано. В этом случае необходимо проводить лабораторные методы диагностики: выделение и идентификацию вируса и серологическую идентификацию антител (в РТГА, РН, РДП и РСК).

Инфекционный бронхит и ларинготрахеит птиц отличаются от классической чумы птиц незначительной летальностью, четко вы-

раженными симптомами поражения органов дыхания, отсутствием реакции гемагглютинации вируссодержащей аллантоисной жидкости. При лабораторном исследовании все штаммы вируса инфекционного бронхита птиц, адаптированные к эмбрионам, вызывают типичную патологию. Вирус инфекционного ларинготрахеита вызывает оспоподобные поражения хориоаллантоиса. Микоплазмоз устанавливается при помощи специфических серологических реакций.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Обнаружение антигемагглютининов, вируснейтрализующих и комплементсвязывающих антител — надежный признак протекающей или уже прошедшей инфекции гриппа в стаде птицы.

Исследование парных сывороток проводят с диагностической целью при атипичном, часто вялом течении болезни с поражением органов дыхания. Исследуют и сыворотку от диких птиц на присутствие противогриппозных антител при изучении проблемы роли перелетных птиц в распространении гриппа. В этих случаях испытуемые сыворотки исследуют в РТГА с заведомо известными вирусами гриппа птиц *.

Обязательным условием для ретроспективной диагностики гриппа птиц является одновременное исследование парных сывороток, так как для диагностических целей имеет значение сравнительный титр антител против вирусов различных серологических подтипов в первой и второй пробах сыворотки. Первую пробу сыворотки хранят при 4° или в замороженном виде. Обе пробы сыворотки исследуют одновременно. Перед постановкой реакций их прогревают при 56° в течение 30 минут.

Если титр антител (РТГА) во второй пробе сыворотки (через 10—14 дней после заболевания) превышает не менее чем в 4 раза титр антител к тому же типу вируса в первой пробе, то РТГА считается положительной, подтверждающей диагноз гриппа птиц.

При постановке РТГА с парными сыворотками больных птиц необходимо использовать не только набор эталонных штаммов (например, к вирусам A/Fowl plaque; A/Chick/Scotland, A/Turkey, A/Duck и т. п.), но и местные штаммы того птицехозяйства, где зарегистрирована болезнь.

При анализе результатов РТГА необходимо указывать, сколько сывороток было с низким титром торможения гемагглютинации к тому или иному штамму вируса гриппа, сколько со средним и высоким титрами. В ряде случаев вместо индивидуальных сывороток показатели иммунитета стада (после переболевания или прививки живой вакциной) можно изучить на сыворотках, полученных от нескольких птиц. В этих случаях испытуемые сыворотки, взятые от отдельных птиц, нужно соединять в равных объемах.

Реакция торможения гемагглютинации. Данную реакцию ставят с диагностикумами (инактивированными антигенами) вирусов гриппа типа А, приготовленными из ингибиторорезистентных штаммов **. РТГА позволяет установить не

---

* Кровь у диких птиц берут из сердца и крупных сосудов. Кровь от мелких птиц собирают на диски из фильтровальной обеззоленной бумаги диаметром 12,7 мм (поглощает 0,12 мл крови) или в пробирки со стерильным физиологическим раствором в соотношении 1 : 3. Хранят сыворотки при минус 20°, а диски — при 4°.

** Свойство ингибиторочувствительности штаммов вируса гриппа не зависит от авидности. Во избежание ошибок при оценке результатов реакции задержки гемагглютинации необходимо подбирать ингибиторорезистентные штаммы. Чувствительность вновь выделенных штаммов вируса гриппа птиц к неспецифическим ингибиторам выявляется в РТГА с нормальной сывороткой морской свинки.

только тип вируса (А), но и внутритиповые различия выделенных штаммов. Реакцию торможения гемагглютинации ставят на панелях из плексигласа в объеме 0,4 мл. Перед постановкой каждой реакции тщательно оттитровывают рабочую дозу антигена (4 АЕ). Цельные сыворотки разводят 1 : 10 дистиллированной водой, освобождают от неспецифических термолабильных ингибиторов прогреванием в водяной бане при 56° в течение 30 минут. Для освобождения от термостабильных ингибиторов прогретые сыворотки обрабатывают углекислотой по методу В. М. Стахановой (1957).

Для получения сыворотки из дисков фильтровальной бумаги их мелко нарезают, заливают дистиллированной водой (0,1+1 мл), ставят на 20 минут в термостат и затем на 18—20 часов в рефрижератор при 4°. Далее жидкость отсасывают, прогревают 30 минут при 56° и обрабатывают CO_2. После центрифугирования добавляют гипертонический раствор (0,1 мл на 0,9 мл сыворотки) и используют в РТГА.

В качестве модификации РТГА можно указать на метод, предложенный лабораторией иммунологии Института вирусологии имени Д. И. Ивановского АМН СССР. Для этого готовят диагностические моноспецифические сыворотки, которые не нужно освобождать от неспецифических ингибиторов, так как при получении их используется принцип абсорбции добавочных антигемагглютининов и неспецифических ингибиторов (З. И. Ровнова, 1959).

Сыворотки диких птиц, разведенные физиологическим раствором, обрабатывают каолином, после чего прогревают 30 минут при 56° и истощают эритроцитами крови гусей, затем кур или человека. Для этого берут сыворотки до разведения 1 : 320. Каждую сыворотку испытывают в РТГА с шестью антигенами вируса гриппа птиц. Параллельно ставят контроль исследуемой сыворотки и антигена. Контакт сыворотки с антигеном продолжают 18 часов при 4°. В опыте РТГА используют 1%-ную взвесь эритроцитов крови кур, а иногда 1%-ную взвесь эритроцитов крови человека группы О, морской свинки и голубя.

Реакция связывания комплемента. Данную реакцию применяют для обнаружения антигенов и антител в целях ранней и ретроспективной диагностики гриппа. РСК ставят либо с аллантоисными жидкостями куриных эмбрионов, или же с очищенными диагностикумами. Антигены из неочищенных аллантоисных жидкостей очень нестойки, и при хранении на холоде в них выпадает осадок из труднорастворимых уратов, поэтому перед употреблением их встряхивают, осветляют центрифугированием и разводят физиологическими растворами до получения в 1 мл 16—20 агглютинационных единиц. Например, при титре вируса в РГА 1 : 160 аллантоисную жидкость разводят 1 : 10. Контролем антигена служит нормальная аллантоисная жидкость, разведенная так же, как в опыте.

Помимо нативной вируссодержащей аллантоисной жидкости, в РСК используют стандартные гриппозные диагностикумы после определения их титра в РГА.

РСК ставят по классическому и модифицированному методу. Микрометод Фултона и Дамбела (1949), модифицированный В. В. Ритовой (1965), позволяет одновременно исследовать каждую сыворотку с 12 антигенами. Реакцию этим методом ставят в объеме 5 капель. Все ингредиенты разводят на вероналовом буферном растворе *. Ингредиенты реакции разносят откалиброванными капельницами, входящими в комплект микротитратора «Такачи» (объем капли 0,025 мл). В качестве антигенов используют диагностикум, приготовленный по способу Еремеева (1960) и разведенный вероналовым буферным раствором 1 : 8—1 : 16 (20 АЕ). Контрольным антигеном служит нормальная аллантоисная жидкость (в тех же разведениях, что и диагностикум), из которой предварительно удаляют ураты высаливанием по методу Г. В. Еремеева.

---

* Готовят пятикратный концентрат раствора по следующей прописи: NaCl — 85,0, меднал — 3,75; веронал — 5,75; 1 М $MgCl_2$ — 5,0; 1 М $CaCl_2$ — 1,5 мл. Дистиллированной воды берут до 2000 мл, pH 7,3—7,4. Перед работой пятикратный раствор вероналового буфера разводят дистиллированной водой в 5 раз и охлаждают до 4—8°.

Исследуемые сыворотки разводят 1 : 10 вероналовым буферным раствором (pH 7,2), прогревают 30 минут при 56° и обрабатывают углекислотой. В опыт берут сыворотки до разведения 1 : 320. Для контроля применяют сыворотку морской свинки. Комплемент разводят 1 : 20, 1 : 25, 1 · 30, 1 : 35, 1 : 40, 1 : 50, 1 : 60, 1 : 70, 1 : 80, 1 : 100, 1 : 200. Наибольшее разведение, обеспечивающее полный гемолиз эритроцитов барана, принимают за титр. Гемолитическую систему готовят из равной смеси 0,4%-ной взвеси эритроцитов барана и гемолитической сыворотки, взятой в четырехкратном титре. После соединения сыворотки с антигеном панели встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 20 минут. По истечении этого времени добавляют 1 каплю (2 рабочие дозы) комплемента. Панели встряхивают и оставляют на 16—18 часов при 4°. Затем прибавляют гемолитическую систему в объеме двух капель. Панели снова встряхивают и переносят в термостат на 1½ часа (через каждые 15 минут панели встряхивают), затем их охлаждают в течение 30 минут при 4° и учитывают результат. За титр сыворотки принимают ее наибольшее разведение, в котором при отсутствии гемолиза наблюдается четкий осадок эритроцитов.

Приготовление и применение диагностикумов *. Для идентификации и изучения антигенной структуры вновь выделяемых эпизоотических штаммов вируса гриппа птиц при помощи РТГА, РСК и РДП необходимо иметь или заведомо известные стандартные антигены и испытуемые сыворотки, или же штаммоспецифические сыворотки и испытуемые антитела.

Стандартные диагностикумы (антигены) можно с успехом приготовить: в вирусологических отделах НИВИ, НИВС или областных (краевых) ветеринарных лабораториях.

---

* Методика приготовления диагностикумов вирусов гриппа птиц методом высаливания уратов и белков (по Г. В. Еремееву), приготовление антигена для РТГА методом адсорбции-элюции, приготовление глицеринового гриппозного диагностикума, получение моноспецифических диагностических противогриппозных сывороток методом адсорбции и методика постановки РТГА с моноспецифическими противогриппозными сыворотками изложены в книге «Руководство по лабораторной диагностике гриппа, парагриппозных и аденовирусных заболеваний», Медгиз, 1960, стр. 96—115.

ГРИПП УТОК
(INFLUENZA A. ANATIS)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Грипп уток (инфекционный синусит, хроническое респираторное заболевание уток, заразный насморк утят, заразный катар дыхательных путей уток, синусит утят, грипп утят) — инфекционная болезнь уток, характеризуется воспалением слизистых оболочек носовой полости, подглазничных синусов и сопровождающаяся нарушением дыхания, истечением из носовых отверстий и появлением подглазничных опухолей.

При гриппе утят смертность молодняка доходит до 50% и выше; рост и развитие утят замедляются. Вес выздоровевшего утенка в убойном возрасте на 500—600 г меньше веса непереболевших сверстников (И. Н. Дорошко, 1962).

Заболевают утята до 25-дневного возраста. Куры, индейки, фазаны, гуси и перепелки к гриппу утят невосприимчивы. Грипп среди уток диагностируют в странах Северной Америки и Европы.

Повальное смертельное заболевание утят в Чехословакии в 1956 г. было вызвано вирусом гриппа A/Duck/Czech/56. В СССР грипп птиц впервые обнаружен на юге УССР и описан в 1957 г. (И. Н. Дорошко и М. Т. Прокофьева). В дальнейшем штаммы этого вируса были выделены в других районах УССР (П. Ф. Цимох и М. Т. Прокофьева), в Ташкентской (Н. А. Белоусов, 1960), Воронежской (Е. М. Кожевников и А. А. Бобров, 1961) и Амурской (И. К. Кравец, 1960) областях. Установлено, что резервуаром вируса гриппа уток в природе являются взрослые утки (П. Ф. Цимох, 1966). В естественных условиях к гриппу уток восприимчивы утята в возрасте 1—25 дней. В стадах, неблагополучных по данной болезни, падеж среди молодняка может продолжаться в течение двух месяцев. В 1960 г. А. А. Корнилова наблюдала энзоотию гриппа среди взрослых уток.

Грипп утят регистрируют преимущественно среди утят поздних выводов — в июле—августе. Провоцируют вспышки гриппа чаще такие факторы, как охлаждение (выращивание птенцов без обогрева при похолодании, намокание под холодным дождем, холодная вода на водном выгуле), недостаток зелени в рационе утят, скученность при выращивании.

Симптомы болезни разнообразны. Вначале у заболевших утят отмечают чихание, выделение из ноздрей вязкой, вначале прозрачной, а затем мутной грязно-серого цвета жидкости. Утенок трет лапкой нос и вытирает его о перья. Дыхание становится затрудненным, птенцы дышат с открытым ртом, слышны хрипы. Иногда наблюдаются судороги, утенок падает на бок или спину, конечности и шея вытягиваются. Припадок продолжается 10—15 минут, и в таком состоянии птенцы часто погибают. Если болезнь затягивается, в подглазничных синусах накапливается жидкость, появляются одно- и двусторонние опухоли. Они обычно мягкие и лишь в отдельных случаях затвердевают вследствие накопления в них фибринозно-казеозных масс. Иногда опухолей совсем не бывает, наблюдаются только насморк и синусит с накоплением небольшого количества жидкости.

Грипп длится от 5—10 дней до 2 месяцев. Возможно обострение болезни и появление судорог. Иногда грипп осложняется паратифом, калибациллезом или глистными инвазиями (И. Н. Дорошко, 1962).

Отмечены случаи рецидивов гриппа через 2—5 месяцев после заболевания.

Патологоанатомические изменения можно обнаружить главным образом в органах дыхания. Ноздри у павших утят заклеены засохшим экссудатом, при надавливании с боков у основания носа из ноздрей выделяется тягучая жидкость. Слизистые оболочки гиперемированы, в носовых ходах и подглазничных полостях — серовато-желтая фибринозная масса; в воздухоносных мешках — фибринозные отложения в виде небольших желтых комочков. Сердечная сорочка часто растянута экссудатом со свертками фибрина. Часто фибринозные массы покрывают сердечную сорочку снаружи. Чем острее течение болезни, тем менее выражены патологоанатомические изменения. В остро протекающих случаях изменения находят только на слизистой оболочке носовой полости и подглазничных синусов; остальные органы без видимых изменений (И. Н. Дорошко, 1962).

ВИРУС

Возбудитель гриппа уток относится к гриппу типа А. Это — РНК-содержащий вирус, по морфологии и химическому составу идентичен остальным вирусам гриппа птиц. За последние годы получены данные об антигенной вариабельности штаммов вируса гриппа уток, выделенных в различных странах. Поэтому в 1965 г. было предложено объединить штаммы вируса гриппа уток в две группы: первую Duck (Czechoclovakia/56) и Duck (England/62) и вторую Duck (England) 56. Недавно был идентифицирован новый тип утиного вируса гриппа А — A/Duck (Canada) 53.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Прямые солнечные лучи убивают вирус за 5 минут, рассеянные — не инактивируют его в течение 5 часов. В питьевой воде он сохраняется пять дней.

На скорлупе утиных яиц, в древесных стружках при 38,5° вирус сохраняет активность в течение 24 часов, при 22—25° — двое суток; 3%-ный раствор фенола и 3—5%-ные растворы креалина убивают вирус в течение 40 минут; 1%-ный раствор едкой щелочи, 2%-ный раствор формалина и 1,5%-ная хлорная известь не инактивируют полностью вирус в течение 50 минут. Вирус устойчив к пенициллину и стрептомицину, которые широко используются при выделении его из клинического и патологоанатомического материала (Л. М. Контримавичус, 1969).

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. В патологоанатомическом материале при температуре минус 20—40° активность вируса сохраняется в течение 12 месяцев. Вируссодержащая аллантоисная жидкость и эмбрионы при хранении в рефрижераторе (2—4°) сохраняют активность не менее 9 месяцев (Л. М. Контримавичус, 1969).

Локализация в организме. Вирус находится в слизистой оболочке носа, синусов, в легких и мозге. Длительность вирусоносительства не изучена. Выделяется вирус с носовыми истечениями, слюной и через яйцо, снесенное переболевшей птицей.

Антигенная вариабельность. Выше указывалось на то, что штаммы гриппа уток имеют три антигенные разновидности. Отечественные штаммы, выделенные П. Ф. Цимохом и М. Т. Прокофьевой, обнаружили антигенные связи со штаммами гриппа, выделенными в Чехословакии и Англии. Помимо этого, у вирусов гриппа уток обнаружены антигенные связи с вирусом гриппа лошадей второго подтипа.

В. М. Стахановой (1965, 1966) показана возможность получения рекомбинантов между вирусами гриппа уток A/Duck/Czechoslovakia/56 и гриппа человека A_2/Китай ПА/61.

Антигенная активность. У переболевших уток образуются антигемагглютинины, обладающие вируснейтрализующей активностью, и комплементфиксирующие антитела. Вирус гриппа уток (штамм A'Duck/Czech/56) обладает низкой нейраминидазной активностью.

Гемагглютинирующие свойства. Спектр гемагглютинирующих свойств отдельных штаммов вируса гриппа уток различен (табл. 1).

В отличие от возбудителей гриппа человека и свиней вирус гриппа уток обладает высокой вирулентностью в отношении куриных эмбрионов, часто вызывая их гибель уже через 24 часа после заражения. Независимо от способа заражения вирус накапливается в экстраэмбриональных жидкостях, оболочках, легких и головном мозге зараженных эмбрионов.

Патологические изменения у инфицированных эмбрионов в основном характеризуются гиперемией и кровоизлияниями на коже в области головы, шеи и конечностей. Титры вируса в аллантоисной жидкости достигают 10^7 $ЭЛД_{50}$/мл.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, симптомов болезни, патологоанатомических изменений и результатов лабораторного исследования — выделения и идентификации вируса или положительных серологических данных о наличии специфических противогриппозных антител.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Для лабораторных исследований лучше брать больных утят или свежие трупы. Материалом для выделения вируса могут служить легкие, истечения из носа, мозг, печень, селезенка, слизистые оболочки носа и подглазничных синусов, яичники. Суспензией органов и истечениями, обработанными антибиотиками, заражают утят 1—10-дневного возраста; 10—11-дневные куриные или 14-дневные утиные эмбрионы заражают в аллантоисную полость и инкубируют их в течение 48—72 часов (до гибели) при 37°.

Экспериментальное заражение удается посредством контакта здоровых утят с больными и инъекцией материала от больных птиц в нос, глаз, внутримышечно, в синус, в трахею, внутрибрюшинно. За инфицированными утятами наблюдают в течение 10—15 дней. В положительных случаях через 5—8 дней у зараженных птиц появляется насморк, подопытные утята часто гибнут.

При искусственном заражении погибает от 10 до 90% заболевших, что зависит от вирулентности вируса, возраста утят и условий содержания (И. Н. Дорошко, М. Т. Прокофьева, 1959).

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

С вируссодержащей аллантоисно-амниотической жидкостью ставят реакцию гемагглютинации. Иногда реакция проявляется со 2—4-го пассажей. Специфичность РГА подтверждается РТГА с положительными сыворотками, полученными на морских свинках, курах или кроликах. Активную сыворотку от уток можно получить путем их гипериммунизации. Задержка агглютинации происходит в титрах 1 : 8—1 : 32. Те же сыворотки обладают вируснейтрализующей активностью. Сыворотки предварительно прогревают и освобождают от термостабильных ингибиторов (кроличьи сыворотки). РТГА ставят так же, как при чуме и ньюкаслской болезни птиц.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Необходимо исключить паратиф, вирусный гепатит и А-авитаминоз. Паратиф протекает более остро и сопровождается большей смертностью. У павших от паратифа птиц отмечают некротические фокусы. При бактериологическом исследовании выделяют культуру паратифа. При лечении антибиотиками паратиф быстро прекращается.

При вирусном гепатите заболевают также утята раннего возраста. При гепатите утята гибнут без всяких предвестников. При вскрытии обнаруживают изменения печени (жировая дистрофия и кровоизлияния на поверхности). Вирус гепатита утят не обладает гемагглютинирующими свойствами.

А-авитаминоз возникает спорадически, заболевают 4—10-дневные утята. С возрастом число больных увеличивается, тогда как при гриппе утята приобретают возрастную устойчивость к вирусу.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

У переболевшей птицы установлено наличие антител (антигемагглютинины, вируснейтрализующие антитела) в титрах 1 : 16 для утят 6—30-дневного возраста и 1 : 16—1 : 256 — у взрослых-реконвалесцентов. Динамика антител не изучена. В отдельных случаях у птицы 10-месячного возраста обнаружены антигемагглютинины в титре 1 : 256.

Специфическая профилактика не разработана, поэтому неизвестна и серологическая оценка поствакцинального иммунитета.

ИНФЕКЦИОННЫЙ ЛАРИНГОТРАХЕИТ КУР
(TRACHEOLARYNGITIS POULTRY)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Инфекционный ларинготрахеит — энзоотическая болезнь кур, протекающая с симптомами кашля, удушья и часто конъюнктивита. Болезнь контагиозна, может возникать в любое время года и протекает в виде энзоотии. Восприимчивы куры всех пород и возрастов, особенно молодняк, а также фазаны.

Инфекционный ларинготрахеит распространен в США, Канаде, Австралии, Новой Зеландии, Индонезии, Италии, Франции, ГДР, ФРГ, Венгерской Народной Республике, Польше, Югославии, Испании, Голландии, Швеции и в ряде птицеводческих хозяйств СССР.

Различают ларинготрахеальную и конъюнктивальную формы болезни. Первая обычно протекает остро и проявляется кашлем, чиханием, удушьем, затрудненным дыханием, при наличии экссудата в трахее сопровождающимися характерными хрипами. У больной птицы отмечают вялость, угнетение, потерю аппетита и у взрослых кур — снижение яйценоскости.

При конъюнктивальной форме болезни конъюнктива воспалена и отечна, глазная щель сужена, появляются слезотечение и светобоязнь, ринит, иногда синусит.

Слизистая оболочка трахеи воспалена, гиперемирована, нередко с кровоизлияниями. В гортани, трахее желтоватые наложения и так называемые пробки. У маленьких цыплят такие же казеозные наложения можно обнаружить в фабрициевой сумке.

ВИРУС

Возбудитель инфекционного ларинготрахеита по классификации В. М. Жданова и С. Я. Гайдамович относится к классу Jenneria, порядку Latentiales (нитавирусы, герпесвирусы), роду S. celus, виду S. avium. Содержит ДНК. Размеры вируса, по данным Бича, 45—82 ммк; В. М. Жданова — 90 ммк. Легко проходит через фильтр Беркефельда V, пластинки Зейтца ЕК, а также мембранные ультрафильтры с величиной пор от 0,3 до 0,9 мк, нерегулярно проходит через фильтр Беркефельда и мембранный ультрафильтр с величиной пор 0,1 мк.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус сравнительно слабо устойчив к различным физическим и химическим воздействиям. В лиофилизированном состоянии он сохраняет активность свыше 12 лет, но инактивируется при 55,5° в течение 10—15 минут, при 60° — в течение 2—3 минут. Вируссодержащая аллантоисная жидкость при хранении в условиях комнатной температуры (20—26°) уже через шесть дней резко снижает вирулентность по сравнению с вирусом, хранившимся при температуре 2°. В замороженных тушках больных кур, хранившихся при температуре минус 10—28°, вирус сохраняет жизнеспособность свыше 19 месяцев. В хорионаллантоисной оболочке при температуре 2° он сохраняет вирулентность не менее 105 дней, при температуре 8—10° — 210 дней; в патологическом материале (трахеи от вынужденно убитых больных ларинготрахеитом кур) при температуре 8—10° вирус сохраняется свыше 370 дней; в трахеальном экссудате выживает 22 часа при температуре 37°, 10 дней — при комнатной температуре и 30 дней — при темпе-

ратуре рефрижератора (4°). Под воздействием прямых солнечных лучей вирус утрачивает вирулентность в течение 7 часов. В тушках павшей птицы он сохраняется до начала гниения трупа, а на поверхности скорлупы яйца в условиях термостата теряет вирулентность через 12 часов.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Лучшей для сохранения вируссодержащего материала является температура минус 70°. В этих условиях он сохраняет активность в течение 3 месяцев хранения в любой дисперсной среде.

Восьмикратное замораживание (при минус 28°) и оттаивание (при комнатной температуре) не влияют отрицательно на жизнеспособность и вирулентность вируса. Вируссодержащий патологический материал можно хранить при минус 8, 10° до 100 дней.

Локализация в организме. Вирус инфекционного ларинготрахеита фиксируется в поврежденной эпителиальной ткани на месте внедрения (слизистая оболочка ротовой и носовой полостей, конъюнктива), вызывая воспалительный процесс. Через поврежденные стенки кровеносных сосудов вирус может из мест поражения проникать в кровь уже через 24 часа после заражения. В печени, почках, сердце и селезенке он обнаруживается непостоянно.

Антигенные свойства. Установлены различия между штаммами в отношении патогенности для куриных эмбрионов и птиц, антигенных свойств, скорости выделения из пораженных клеток и сроков выживания в процессе хранения. Штаммы, вызывающие мелкоузелковые поражения хориоаллантоисной оболочки, обычно выделяются в конце вспышки болезни и слабо или совсем не нейтрализуются специфическими антисыворотками. Штаммы же, обусловливающие тяжелое течение болезни, вызывают очаговые поражения хориоаллантоисной оболочки и, как правило, легко нейтрализуются иммунными сыворотками. Установлено также, что свежевыделенные эпизоотические штаммы, длительно хранившиеся при температуре минус 70°, утрачивают свойство индуцировать смешанные (мелкоузелковые и очаговые) поражения, вызывают образование мелкоузелковых фокусов и проявляют полную интактность к гомологичным специфическим антисывороткам.

Установлено также и наличие различных серологических типов среди штаммов вируса инфекционного ларинготрахеита. Помимо того, встречаются штаммы, обладающие выраженной антигенной активностью, но слабо нейтрализующиеся гомологичными антисыворотками, что сближает их с некоторыми штаммами вируса гриппа, которым свойствен переход фазы Р в фазу Q и, видимо, способствует таким штаммам переживать в иммунном окружении.

Спектр патогенности. В естественных условиях вирус поражает главным образом кур и фазанов, вызывая геморрагический трахеит с затрудненным дыханием и кашлем. Вирус можно обнаружить главным образом в дыхательных путях и реже в печени и селезенке. У некоторых больных птиц отмечают геморрагический конъюнктивит. Инкубационный период длится 2—6 дней. Смертность может доходить до 70%, продолжительность болезни 2—3 недели. У взрослых больных кур снижается яйценоскость.

Инфекционным ларинготрахеитом болеет подрастающий молодняк и взрослые куры, но могут заболевать и маленькие цыплята начиная с 20—35-дневного возраста. В экспериментальных условиях заболевают индейки всех возрастов, независимо от способа заражения (М. Т. Прокофьева и Б. М. Момчур, 1965, 1966, 1967). Больные индейки являются источником инфекции для здоровых кур и индеек. Патологические изменения у них аналогичны наблюдаемым у больных кур. Имеются сообщения, что инфекционным ларинготрахеитом могут болеть и голуби, контактирующие с больными курами или цыплятами. Млекопитающие невосприимчивы.

Культивирование вируса в лабораторных условиях. Вирус хорошо культивируется на хориоаллантоисной оболочке эмбрионов кур, индеек и уток и совсем не развивается на эмбрионах голубей и морских птиц. На хориоаллантоисе куриных эмбрионов возбудитель индуцирует два типа поражения: крупные бляшки с непрозрачной белой периферией и некротическим центром и мелкие, без некроза. Узелковые поражения обычно появляются на всей поверхности оболочки, очаговые же только на месте инокуляции вируса. В зараженном курином эм-

брионе в 1,5—2 раза увеличивается количество аллантоисной жидкости, отмечается незначительная гиперемия кожных покровов погибшего зародыша.

Помимо куриных эмбрионов, вирус инфекционного ларинготрахеита размножается в культуре клеток фибробластов, почек и легкого эмбрионов кур, вызывая цитопатические изменения с 3-го по 7-й день после заражения. Вирус размножается также и в клетках HeLa, но без цитопатогенного эффекта.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Метод ранней диагностики основан на выделении вируса инфекционного ларинготрахеита на куриных эмбрионах, выявлении вирусного антигена в мазках-отпечатках при помощи метода флуоресцирующих антител, обнаружении в мазках-отпечатках со слизистых оболочек носовых ходов ацидофильных внутриядерных включений и постановке биопробы на восприимчивых цыплятах.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Выделение вируса на куриных эмбрионах — наиболее распространенный метод лабораторной диагностики. Для этого используют экссудат трахеи, слизистые оболочки трахеи больных и погибших кур. Материал гомогенизируют с физиологическим раствором в разведении 1 : 10, центрифугируют при 1000—1500 об/мин в течение 10 минут. К надосадочной жидкости добавляют по 1000 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 мл суспензии и выдерживают в холодильнике при 2—4° в течение 24 часов, после чего заражают 9—12-дневные эмбрионы. Материал лучше инокулировать на хориоаллантоисную оболочку куриного эмбриона. Макроскопические изменения появляются через $2^1/_2$—3 суток и достигают максимума к 5—6-му дню.

Штаммы вируса инфекционного ларинготрахеита вызывают мелкоузелковые и очаговые поражения хориоаллантоиса. Узелковые поражения обнаруживаются по всей поверхности хориоаллантоиса, очаговые — только на месте инокуляции вируса.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Идентификация вируса основана на микроскопическом и серологическом исследованиях, а также иммунофлуоресценции.

Микроскопические исследования. Вирус инфекционного ларинготрахеита размножается в эпителиальных клетках слизистой оболочки гортани, трахеи, клоаки, вызывая острое воспаление этих оболочек с образованием внутриядерных включений. Включения обнаруживаются до наступления некроза эпителия между первым и пятым днем после интратрахеального заражения цыплят. В мазках из конъюнктивы включения находят через 48 часов после заражения; ядро, содержащее включение, обычно увеличено, отмечается гиперхромация ядерной оболочки. Включения имеют округлую форму, иногда форму диплококков и занимают $^1/_2$—$^2/_3$ кле-

при помощи заражения эмбрионов. Реакция преципитации специфична, но недостаточно чувствительна, ее используют главным образом для ретроспективной диагностики среди взрослых кур.

Получение гипериммунных преципитирующих сывороток на птице. Центрифугированную суспензию хориоаллантоисной оболочки в разведении 1 : 10 вводят взрослым петухам в подкрыльцовую вену в объеме 1—2 мл по схеме: четыре инъекции с промежутками в 1 день — 7 дней отдыха; четыре инъекции — с промежутками в один день. На 6-й день после последней инъекции проводят пробное взятие крови из сердца; в случае неактивности сыворотки проводят трехкратное введение вируса с суточными интервалами; на 6-й день — вторично пробное взятие крови.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ретроспективную диагностику проводят с целью установления в хозяйстве природы респираторной инфекции, часто при клинически атипичном течении болезни. Для этого применяют реакцию нейтрализации на куриных эмбрионах и реакцию преципитации в агаровом геле. Пробы сыворотки от птицы исследуют дважды — через 14—28-дневный интервал. Повышение титра антител к вирусу и числа положительно реагирующих птиц в стаде свидетельствует о наличии и распространении инфекции в хозяйстве, а сохранение или снижение уровня антител — о прошедшей инфекции.

Вируснейтрализующие антитела появляются через 2—3 недели от начала заболевания и сохраняются у переболевших кур до 8—21 месяца.

Постановка реакции нейтрализации описана выше. В данной реакции испытуемыми являются полевые куриные сыворотки, в качестве антигена используется стандартный оттитрованный штамм вируса, адаптированный к хориоаллантоисной оболочке куриного эмбриона. В реакции используют смесь сывороток от 3—5 кур.

При постановке реакции преципитации в агаровом геле в среднюю лунку помещают антиген (вирус ИЛТ), а в периферические лунки — испытуемые сыворотки крови кур. Параллельно ставится контроль; стандартный антиген с нормальной и гипериммунной сыворотками.

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

При лабораторной диагностике инфекционного ларинготрахеита следует исключить: ньюкаслскую болезнь, инфекционный бронхит, респираторный микоплазмоз, оспу, заразный насморк, хронический (локализованный) пастереллез, А-гиповитаминоз.

Вирус ньюкаслской болезни обладает хорошо выраженными гемагглютинирующими свойствами; для исключения болезни Нью-

касла ставят РГА, специфичность которой подтверждается РЗГА со специфической сывороткой.

Инфекционный бронхит дифференцируют в РН и РП со специфической сывороткой.

Респираторный микоплазмоз исключают путем высева материала на специальные питательные среды для культивирования микоплазм (см. Наставление по лабораторной диагностике микоплазмоза).

Оспу дифференцируют путем постановки «фолликулярной» биопробы на восприимчивой птице с последующей микроскопией на присутствие элементарных телец.

Гемофилез (заразный насморк) исключают проведением бактериологического исследования патологического материала на наличие возбудителя B. haemophilus gallinarum.

Пастереллез (хроническое течение) исключают проведением бактериологического исследования патологического материала на наличие возбудителя Pasteurella multocida.

Гиповитаминоз А исключают биохимическим исследованием печени, крови и яиц от больных птиц на содержание каротина и витамина А.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

В борьбе с инфекционным ларинготрахеитом в некоторых странах изготавливают живые вакцины. Одни из них готовят из штаммов вируса, прошедшего большое количество пассажей при культивировании на куриных эмбрионах; другие — из авирулентных штаммов вируса инфекционного ларинготрахеита, выделенных при эпизоотических вспышках болезни.

Установлено, что в сыворотке крови вакцинированных кур на 3—4-й день обнаруживаются вируснейтрализующие антитела; повышение титра их совпадает с устойчивостью птицы и к искусственному заражению. Установлено также, что птица, иммунизированная клоачно, не заболевает при интратрахеальном заражении, а выжившая после интратрахеальной вакцинации остается невосприимчивой при заражении в клоаку. В связи с этим поствакцинальный иммунитет оценивают по наличию вируснейтрализующих антител в сыворотке крови вакцинированных кур, а также при постановке биопробы (клоачная реакция).

ИНФЕКЦИОННЫЙ БРОНХИТ КУР
(INFECTIOUS BRONCHITIS OF FOWLS)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Инфекционный бронхит — остропротекающая контагиозная вирусная болезнь кур всех возрастов. Наиболее характерные симптомы болезни проявляются у цыплят до 30-дневного возраста. У кур, переболевших в раннем возрасте, вследствие глубоких патологических изменений органов яйцеобразования продуктивность не превышает 50%. Заболевание кур-несушек при отсутствии ярко выраженных симптомов нарушения функции органов дыхания ведет к снижению яйценоскости на 35—60%, которая медленно восстанавливается, не достигая прежних показателей.

Впервые болезнь была установлена Шалком и Хауном в 1931 г. в США (штат Северная Дакота). В последующие годы ее регистрировали в других штатах США, в ряде государств Америки и на других континентах. В настоящее время инфекционный бронхит распространен во всех государствах, где птицеводство поставлено на промышленную основу. В СССР возбудитель инфекционного бронхита впервые выделили и типировали З. Я. Чистова, Н. К. Гуненкова и В. Н. Сюрин, А. С. Митропольский, Я. Р. Голод (1968).

Инфекционный бронхит заслуживает внимания как синергист комплекса — «хроническая респираторная болезнь», где он находится совместно с микоплазмой и E. coli, и как болезнь, являющаяся непосредственной причиной снижения яйценоскости у кур-несушек. Наиболее восприимчивы цыплята до 30-дневного возраста. В крупных птицехозяйствах инфекция приобретает стационарный характер. Протекает болезнь в отдельных странах не одинаково. Первоначально в Европе она не имела такого эпизоотического течения и не вызывала такой смертности, как в США. В большинстве случаев болезнь протекает скрыто и проявляется только снижением яйценоскости.

Инкубационный период короткий (18—36 часов), контагиозность высокая, заболевает до 100% восприимчивой птицы. У молодых цыплят наблюдают признаки нарушения функции органов дыхания (ринит, затрудненное дыхание, хрипы, кашель). Среди цыплят до 3-недельного возраста летальность достигает 25%. Цыплята старше 1½-месячного возраста и взрослые куры не гибнут. Больная птица отстает в росте и развитии. У несушек в течение нескольких дней после клинического проявления болезни резко (на 20—30% и более) снижается яйценоскость. Восстанавливается она через 3—5 недель, часто не достигая прежнего уровня. Больные или переболевшие куры-несушки долго несут яйца со скорлупой неправильной формы, мелкие, низкого качества. У некоторых переболевших кур яйценоскость не восстанавливается совсем.

На вскрытии отмечают скопление серозного экссудата в трахее и бронхах, помутнение мембраны воздухоносных мешков и выпадение фибрина, недоразвитость яйцевых фолликул у 20—25% кур-несушек, переболевших инфекционным бронхитом в раннем возрасте. У некоторых павших цыплят находят казеозные бляшки в трахее и бронхах.

ВИРУС

Вирус точно не токсономирован. Учитывая наличие РНК, размеры вирионов, чувствительность их к эфиру, бо́льшую чувствительность к вирусу куриных эмбрионов, чем культуры ткани, некоторые авторы относят его к группе миксо-

вирусов. В 1968 г. предложено отнести вирус инфекционного бронхита наряду с другими вирусами к новой группе короновирусов, поскольку морфологически под электронным микроскопом их капсида имеет вид солнечной короны. Величина вируса 65—135 ммк. Вирионы сферические, с нитевидными отростками, имеющими к свободному концу утолщение 90—110 А. Вирионы, выделенные из хориоаллантоиса инфицированных эмбрионов, имеют в среднем диаметр 82 ммк, две оболочки: наружную — 7—8 ммк и внутреннюю — 9—17 ммк.

Устойчивость вируса к физико-химическим воздействиям не велика. В аллантоисной жидкости он сохраняется при 37° три дня, при 20—30° — 24 дня, в фосфатном буфере при pH 7,79 и 4° — до 170 дней. Замораживание и оттаивание на вирус не действует. В лиофилизированном виде в условиях рефрижератора его активность сохраняется до 13 лет. Большинство штаммов вируса инактивируется при 56° через 30 минут. Однако термостабильность полевых штаммов вируса вариабельна и зависит от числа пассажей на куриных эмбрионах.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Вируссодержащий тканевый материал в 50%-ном глицерине при 4° сохраняет активность свыше 400 дней, при минус 25° — 530 дней. В качестве стабилизатора при лиофилизации широко используют 10%-ный раствор глюкозы. Вирус хорошо сохраняется в лиофилизированном состоянии. Вируссодержащая аллантоисная жидкость остается инфекционной в течение 7 месяцев при минус 35°. При этой температуре лучше сохраняется вируссодержащая суспензия хориоаллантоисной оболочки. Лиофилизированная аллантоисная жидкость, хранившаяся при 4°, сохраняется дольше.

Локализация в организме. При аэрозольном методе заражения птицы вирус обнаруживают в трахее и легких с 3-го по 6-й день после заражения в титре $10^{-3,0}$ и выше. К седьмому дню концентрация его снижается. Вирус присутствует в селезенке со 2-го по 6-й день в титре $10^{-3,5}$, в фабрициевой сумке — в титре $10^{-4,0}$, в почках — с 4-го дня по 7-й день в титре $10^{-4,3}$. Его выделяют также из плазмы цыплят, убитых на 2, 4 и 6-й день после заражения.

У экспериментально зараженных цыплят вирус выделяется с пометом и экссудатом трахеи в течение 35 дней после заражения (Я. Р. Голод, 1971).

Антигенные свойства. В настоящее время общепризнана антигенная вариабельность вируса инфекционного бронхита птиц. Бесспорно установлены следующие антигенные и иммунобиологические серотипы этого вируса, выделенные в различных странах в условиях различной эпизоотической обстановки: «Массачусетс», «Коннектикут», «Айова-97», «Айова-609», «Грей», «Холт», IMK, «Армиленд» (австралийский штамм, не нейтрализующийся сыворотками американского происхождения) и австралийский штамм «Брисбенн», дающий непостоянные результаты в реакции нейтрализации. Вирус инфекционного бронхита индеек, вероятно, родствен вирусам CELO. За последние годы выделено еще много новых неклассифицированных штаммов, отнесенных в группу бронхитоподобных.

Гемагглютинирующие свойства. Вирус инфекционного бронхита вызывает агглютинацию эритроцитов кур после предварительной обработки его трипсином. Теоретическая предпосылка этого такова: трипсин разрушает пептидные связи карбоксильных групп аргинина или лизина или обеих аминокислот вместе, которые присутствуют в молекуле вирусного белка. Трипсинизированные эритроциты не дают агглютинации с необработанным вирусом. Трипсинизированный вирус агглютинирует только эритроциты кур. По мере адаптации к эмбрионам штаммы вируса инфекционного бронхита утрачивают гемагглютинирующие свойства. Очевидно, это связано с изменением физической или химической структуры вирусного протеида. С трипсинизированным вирусом инфекционного бронхита эритроциты реагглютинабельны.

Вирионы инфекционного бронхита содержат две фракции гемагглютинина: одну — связанную с вирусной частицей и другую — отделимую от нее. В отличие от вируса гриппа, который полностью сорбируется эритроцитами при 4°, гемагглютинин вируса инфекционного бронхита сорбируется только при 37°, причем в отношении этого вируса эритроциты реагглютинабельны. Специфичность

РГ с трипсинизированным вирусом не удается подтвердить постановкой РТГА со специфической иммуносывороткой, поэтому тест ГА используется только при дифференциации вируса инфекционного бронхита от возбудителя болезни Ньюкасла.

Спектр патогенности. В естественных условиях восприимчивы только цыплята. В экспериментальных условиях и к некоторым штаммам восприимчивы мыши-сосунки при интрацеребральном методе заражения. Возбудитель инфекционного бронхита выделен от перепелов, однако для цыплят он непатогенен. До последнего времени считалось, что вирус инфекционного бронхита кур для человека не опасен, однако недавно (Беккер, 1967) при респираторном заболевании людей был выделен вирус (229Е), идентичный по морфологии вирусу инфекционного бронхита кур.

Культивирование вируса в лабораторных условиях ведут на эмбрионах кур при нанесении материала на хориоаллантоисную оболочку или в аллантоисную полость. Иногда адаптация к куриным эмбрионам наступает после шести и более серийных пассажей. Гибель эмбрионов в начальных пассажах при изолировании вируса не рассматривается как постоянный признак. С увеличением числа пассажей возрастает и процент летальности и сокращается срок гибели эмбрионов.

Глубоко адаптированные штаммы вызывают 100%-ную гибель эмбрионов кур через 24—48 часов после заражения. Хотя такие штаммы утрачивают и иммуногенные свойства, они нейтрализуются специфической иммунной сывороткой. За рубежом в РН широко используют штамм Бодетт, который вызывает 100%-ную гибель куриных эмбрионов и является полностью авирулентным для птицы.

Адаптация вируса происходит быстрее, если куриные эмбрионы заражать в аллантоисную полость. «Эффект карликовости» очень характерен и патогномоничен для вируса инфекционного бронхита птиц и имеет большое значение для диагностики болезни.

Культивировать вирус инфекционного бронхита в культуре ткани довольно трудно. Только некоторые штаммы вируса удается выращивать и титровать в первично-трипсинизированной культуре почки, легкого и печени куриного эмбриона, в культуре фибробластов куриного эмбриона. Многие авторы сообщили, что только хорошо адаптированный к куриным эмбрионам штамм «Бодетт» может размножаться в культуре почек и фибробластов куриного эмбриона и вызывать характерный цитопатический эффект.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Лабораторная диагностика инфекционного бронхита основана на: выделении вируса от больной птицы; постановке биопробы на птице и обнаружении специфических вирусонейтрализующих и преципитирующих антител и непрямой реакции гемагглютинации.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Вирус выделяют тогда, когда респираторная инфекция протекает слабо и длительно. В этом случае выделение вируса надо проводить параллельно с серологическими реакциями.

Взятие и подготовка материала. От павших или вынужденно убитых цыплят берут кусочки легкого, соскобы трахеи, гортани, бронхов, от больной птицы пробы берут во время инкубационного периода или проявления клинических признаков в течение примерно двух недель. В период острого течения болезни вирус также может быть выделен из яиц. Патологический материал до иссле-

дования хранят при температуре минус 30° не более 6 месяцев. Из него готовят 10%-ную суспензию на фосфатном буфере или триптозофосфатном бульоне. Суспензию центрифугируют в течение 5—10 минут при 2500 об/мин. К надосадочной жидкости добавляют антибиотики из расчета 1000 ЕД/мл суспензии, выдерживают при 4° в течение 1—4 часов и заражают птицу, куриные эмбрионы или культуру ткани.

Биопроба. Используют цыплят 10—25-дневного возраста из хозяйств, благополучных по респираторным болезням. Вируссодержащий материал им инокулируют интратрахеально или интраназально по 0,3—0,5 мл. За птицей ежедневно наблюдают, отмечая симптомы болезни. Первые признаки болезни появляются через 18—36 часов, а иногда через 4—5 дней. У птиц отмечают хрипы, насморк, кашель, чихание, затем угнетение и сонливость. Заболевают 10—100% зараженных птиц; случаев падежа может не быть. Через 10 дней цыплят вскрывают.

Изменения в органах дыхания, свойственные бронхиту, при наличии респираторных симптомов дают основание для постановки предварительного диагноза. При вскрытии в носовой полости, трахее, бронхах, бронхиолах и воздухоносных мешках обнаруживают обильный серозно-слизистый экссудат.

Заражение эмбрионов. Используют эмбрионы 9—11-суточного возраста. Патологический материал в дозе 0,2 мл им инокулируют в аллантоисную и амниотическую полости и наносят на хорионаллантоисную оболочку. Иногда приходится делать не менее 6—8 «слепых» пассажей до тех пор, пока не станут проявляться типичные для бронхита патологические изменения. Из партии зараженных испытуемым материалом эмбрионов на 3-й день после заражения вскрывают 1—2 живых эмбриона, берут от них аллантоисную жидкость и ею заражают эмбрионы следующего пассажа. Остальные зараженные эмбрионы вскрывают на 6—8-й день и ставят пробы для обнаружения вируса. Перед вскрытием эмбрионы охлаждают 2—3 часа при 4°. При вскрытии учитывают изменения эмбрионов.

Характерными для инфекционного бронхита изменениями зараженных эмбрионов являются карликовость их с перекручиванием шеи и прилипанием лапок к голове, выраженная задержка в росте по сравнению с контролями. Обычно тело пораженного эмбриона в 2 раза меньше контрольного; свернувшиеся в клубок больные зародыши имеют округлую форму, уплотненной консистенции. Амниотическая оболочка утолщена, имеет фибринозные налеты. В экстраэмбриональной жидкости — повышенное содержание уратов. Отсутствие изменений под влиянием специфической сыворотки подтверждает наличие вируса инфекционного бронхита.

От павших эмбрионов (гибель в первые 24 часа считают неспецифической) и от эмбрионов, отставших в росте, собирают в стерильные пробирки аллантоисную жидкость и после проверки на отсутствие бактериальной загрязненности помещают в холодиль-

ник при минус 20°. Перед использованием аллантоисную жидкость оттаивают и центрифугируют при 2500 об/мин 5—10 минут для осаждения примесей, образовавшихся при замораживании и оттаивании. Для заражения используют надосадочную жидкость.

При первичном выделении вируса патологические изменения у куриных эмбрионов рассматривают как результат действия вируса. Последний скорее адаптируется при нанесении материала в амниотическую, чем в аллантоисную полость или на хориоаллантоисную оболочку. Летальность зараженных эмбрионов зависит от вирулентности полевого штамма, иногда она проявляется на 6—8-м пассаже.

ТИТРОВАНИЕ ВИРУСА

Титрование вируса на куриных эмбрионах производят общепринятым методом. Вируссодержащий материал разводят мясопептонным (от 10^{-1} до 10^{-8}) бульоном и определяют ID_{50} или LD_{50} (в зависимости от патогенности штамма). Зараженные эмбрионы просматривают ежедневно в течение 8 дней. Уменьшение веса зараженных эмбрионов по сравнению с контрольными на 25% и более рассматривают как результат действия вируса. Вирус высокого титра получают при заражении 10—11-дневных эмбрионов адаптированным штаммом и материал берут от живых эмбрионов через 30 часов после заражения. Вирус в экстраэмбриональной жидкости зараженных эмбрионов устанавливают реакцией гемагглютинации с трипсинизированным вирусом, а принадлежность выделенных вирусов к инфекционному бронхиту подтверждают в РН и РДП с гипериммунными сыворотками кроликов и кур против вируса инфекционного бронхита.

Титрование на восприимчивых цыплятах. При титровании учитывают способность вируса вызывать респираторные симптомы. Обычно глубоко адаптированные эмбриональные штаммы утрачивают способность вызывать поражения у цыплят. При титровании на птице цыплят заражают аэрозольно, наносят материал интратрахеально или интраназально в дозе 0,1 мл на каждое разведение по 4 цыпленка. Подопытных и контрольных цыплят содержат изолированно. Наблюдение ведут в течение 7 дней. Проявление клинических признаков экспериментальной инфекции зависит от биологической природы титруемого штамма. При отсутствии выраженных симптомов подопытных цыплят убивают и учитывают патоморфологические изменения. Признаки болезни обычно проявляются на 2—4-й день.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Реакция гемагглютинации. В 1959 г. Карбо и Каннингэм предложили ставить РГА с трипсинизированным вирусом инфекционного бронхита. К 1 объему вирусной суспензии добавляют 1 объем

кристаллического трипсина, разведенного 1 : 100. Вместо кристаллического трипсина можно использовать аморфный, разведенный 1 : 500. Затем смесь вируссодержащей аллантоисной жидкости и трипсина инкубируют 3 часа при 37° и добавляют 1 часть 1%-ного куриного белка. Реакцию ставят с 1%-ной взвесью куриных эритроцитов по общепринятой методике. Параллельно также обрабатывают нормальную аллантоисную жидкость, используемую в качестве контроля. С нормальной аллантоисной жидкостью можно наблюдать неспецифическую агглютинацию в титре 1 : 4—1 : 8. РГА с трипсинизированным вирусом является неспецифической, так как не разработаны тесты для постановки РТГА, но она подтверждает наличие вируса в испытуемом материале.

Серологическая идентификация

Серологическую идентификацию проводят при помощи РН, РДП, непрямой РА и РСК.

Реакция нейтрализации является типоспецифической реакцией и используется для определения серологического типа вируса (типы: «Массачузетс», «Коннектикут» и т. д.).

Реакция диффузионной преципитации и реакция непрямой гемагглютинации — серологические реакции, при помощи которых может быть идентифицирован вирус инфекционного бронхита без учета его типовой принадлежности.

РСК — высокочувствительная серологическая реакция, при помощи которой устанавливают штаммоспецифичность в пределах одного антигенного типа.

Реакцию нейтрализации применяют:

при исследовании сывороток крови больных и переболевших птиц с заведомо известным антигеном. При этом исследуют смесь сывороток не менее чем от пяти птиц;

при идентификации выделенного вируса при помощи специфических противобронхитных сывороток.

Для постановки РН требуются: испытуемые или гипериммунные сыворотки; нормальные куриные и кроличьи сыворотки; вирус инфекционного бронхита птиц или испытуемый вирус; мясопептонный бульон (МПБ); антибиотики: пенициллин и стрептомицин; 9-дневные куриные эмбрионы.

При постановке реакции нейтрализации на куриных эмбрионах пробирки с испытуемой аллантоисной жидкостью оттаивают, отсасывают прозрачный слой жидкости и готовят необходимые разведения. Сухими стерильными пипетками разливают в каждую пробирку по 0,5 мл сыворотки. Параллельно для контроля разливают нормальную сыворотку в таком же объеме. Все используемые асептически собранные сыворотки инактивируют при 56° 30 минут. До использования в реакции сыворотки хранят в замороженном виде. К разлитым по пробиркам сывороткам и бульону добавляют по 0,5 мл вируса в разведениях от 10^{-1} до 10^{-6},

приготовленных на питательном бульоне. Далее РН на эмбрионах проводят общепринятым методом.

Смесь сыворотки с соответствующими разведениями испытуемой аллантоисно-амниотической жидкости встряхивают и помещают в холодильник при температуре 2—4° на 1 час, после чего ее инокулируют в аллантоисную полость 9—10-дневных куриных эмбрионов в дозе 0,2 мл (по четыре эмбриона на каждое разведение вируса). Смесь с нормальной сывороткой инокулируют в последнюю очередь и до этого ее хранят в холодильнике или ледяной бане при 0°. Зараженные эмбрионы инкубируют при температуре 37,5°. Все вируссодержащие образцы аллантоисной жидкости (обычно первых разведений) одновременно проверяют на бактериальное загрязнение.

Зараженные эмбрионы овоскопируют дважды в день для определения гибели или прекращения подвижности. Эмбрионы, погибшие в течение 24 часов после заражения, не учитывают. Инфицированные эмбрионы могут оставаться живыми до 18—19-го дня инкубирования, поэтому на 20-й день инкубирования вскрывают все эмбрионы. О наличии вируса судят по характерным патологическим изменениям эмбриона: мумификация, карликовость, перекручивание шеи. Индексы нейтрализации, рассчитанные по Риду и Менчу, менее 10 следует считать отрицательными, от 10 до 49 — сомнительными и выше 100 — положительными. Индекс нейтрализации нормальной сыворотки не бывает выше 32.

В связи с наличием антигенной вариабельности вируса инфекционного бронхита целесообразно типирование выделенных штаммов его проводить в РН типоспецифическими иммунными сыворотками кроликов ко всем эталонным серотипам («Массачузетс», «Коннектикут», «Айова-97», «Айова-609» и др.).

Реакцию диффузионной преципитации применяют для идентификации вируса с заведомо известной антисывороткой для ретроспективной диагностики болезни, а также дифференциации инфекционного бронхита от других вирусных респираторных инфекций. Для этого в лаборатории необходимо иметь набор диагностических гипериммунных сывороток против вируса инфекционного ларинготрахеита, бронхита, оспы птиц, ньюкаслской болезни и др., испытуемые сыворотки крови кур; преципитирующие куриные сыворотки крови кур; нормальные сыворотки крови кур; вируссодержащие антигены; испытуемые антигены; нормальные антигены; агаровые пластинки, отмытые и обезжиренные плоскодонные чашки Петри, тонкостенная металлическая или стеклянная трубочка диаметром 5,6 мм (можно использовать гильзу патрона мелкокалиберной винтовки), пипетки Мора на 15 мл, пастеровские пипетки, агар дальневосточный (лучше фирмы Difco), 8%-ный раствор NaCl pH 7,0. В качестве антигена для РДП используют суспензию хориоаллантоисных оболочек зараженных эмбрионов кур.

Агар готовят по общепринятой методике: к 470 мл 8%-ного раствора NaCl добавляют 6,25 г порошка агара и кипятят в водяной

бане до полного расплавления и просветления агара. Устанавливают pH 7,0 добавлением 1 н. раствора NaOH.

Примечание. Если используют отечественный (не Difco) агар, его нужно предварительно осветлить. Для этого берут 1% по весу агара к объему дистиллированной воды и расплавляют в кипящей водяной бане. Раствор быстро фильтруют через вату. Профильтрованный агар разливают в чашки Петри по 15 мл, если их диаметр 7 см, или по 20 мл, если 8,5 см, и охлаждают до затвердевания. Далее чашки с агаром помещают в холодильник при 4° и используют для работы через 24 часа. Неиспользованные залитые агаром чашки можно хранить при 4° 72 часа.

Флаконы с агаром, не снимая пробки, разогревают в водяной бане и тотчас же разливают в стерильные обезжиренные плоскодонные чашки Петри. Высота слоя агара 0,5 см. После того как агар застынет, перед постановкой реакции в нем делают при помощи трубочек или штампов округлые лунки в виде звеньев, состоящих из шести лунок по периферии и одной центральной в каждом звене. Диаметр лунок 0,6 см, расстояние между краями лунок одного звена 0,4—0,5 см. Агаровые пыжи извлекают иглой, после чего на дно каждой лунки наносят каплю расплавленного агара, чтобы предупредить подтекание ингредиентов под агар. В приготовленные лунки наливают ингредиенты до уровня поверхности агара. В центральную лунку вносят вируссодержащий антиген, а в периферийные — испытуемые сыворотки. Для контроля вируссодержащий и нормальный антигены параллельно проверяют с заведомо положительной и отрицательной сыворотками. Кроме того, в той же чашке в другом звене лунок параллельно ставят контрольную реакцию с испытуемыми сыворотками и нормальным антигеном.

После разливки антигена и сывороток чашки накрывают крышками и оставляют при комнатной температуре на 24—48 часов. Специфические линии преципитации появляются между лунками с антигеном и сыворотками через 24—48 часов, а иногда к 72-му часу. Учет и оценку РДП проводят по степени выраженности преципитационных полос и оценивают в крестах.

В связи с высокой чувствительностью и специфичностью РН и РДП, а также быстрым получением результатов выделения вируса серологический метод широко используют при изучении степени распространения инфекционного бронхита.

Приготовление диагностикумов (сывороток и антигенов) для РН и РДП в агаровом геле при диагностике инфекционного бронхита. Для постановки реакции нейтрализации и реакции диффузионной преципитации необходимы следующие диагностикумы, которые можно приготовить в условиях биологической фабрики, а при необходимости в оборудованной диагностической лаборатории:

1) два антигена — лиофилизированная вируссодержащая экстраэмбриональная жидкость, полученная от эмбрионов, раздельно зараженных в 9-дневном возрасте штаммами вируса инфекционного бронхита «Бронвакс» (типа «Коннектикум») и «Бодетт» (типа «Массачузетс»);

2) лиофилизированные вируснейтрализующие антисыворотки крови кроликов «Коннектикут» и «Массачузетс»;

3) преципитирующая лиофилизированная гипериммунная антисыворотка крови кур, также полученная на один из антигенных типов;

4) нормальная лиофилизированная сыворотка крови кроликов (для РН);

5) нормальная лиофилизированная сыворотка крови кур (для РДП).

Приготовление антигенов для реакции нейтрализации. Штамм «Бронвакс» вызывает гибель эмбрионов кур на 2—5-й день после заражения или специфические изменения их (карликовость, мумификация эмбриона).

Штамм «Бодетт», авирулентный для кур, вызывает гибель эмбрионов в течение 20—48 часов. Заражают эмбрионы вышеуказанным методом (стр. 367). На 5-й день инкубации все погибшие эмбрионы вскрывают после предваритель-

ного охлаждения при 4° в течение 4—6 часов. От каждого павшего или имеющего специфические изменения эмбриона берут экстраэмбриональную жидкость и хранят в холодильнике при минус 20°. После бактериологического контроля образцов их объединяют во флакон и сохраняют при минус 20° в течение 2—3 месяцев. Собранную вируссодержащую жидкость проверяют на активность титрованием на куриных эмбрионах. Титр ее должен быть не ниже 10^5 EID_{50} в 0,1 мл. Далее жидкость подвергают лиофильному высушиванию в равных объемах с обезжиренным коровьим молоком и расфасовывают по 1 мл в ампулы БЦЖ. Ампулы с высушенным антигеном запаивают в условиях вакуума и лиофилизированный антиген проверяют на стерильность, активность, наличие вакуума, растворимость и остаточную влажность. На активность содержимое трех ампул каждого антигена разводят в 3 мл физиологического раствора и титруют на развивающихся куриных эмбрионах вышеописанным методом.

Антигены из штаммов «Бронвакс» и «Бодетт» представляют собой сухую кремового цвета аморфную массу высушенной экстраэмбриональной вируссодержащей жидкости. Срок годности сухих антигенов при температуре хранения не выше 8° 3 года с момента изготовления.

Для постановки РН в ампулу сухого антигена добавляют 1 мл стерильного физиологического раствора и пипетируют до полного растворения содержимого ампулы, после чего антиген переносят в стерильную пробирку и делают необходимые разведения.

Приготовление антигена для реакции диффузионной преципитации. Заведомо положительный антиген для РДП получают из хориоаллантоисных оболочек эмбрионов, инфицированных вирусом инфекционного бронхита или разведенным антигеном (лиофилизированным) для реакции нейтрализации. Для этого содержимое одной ампулы сухого антигена (любого типа вируса) разводят 4 мл стерильного физиологического раствора с антибиотиками, пипетируют до полного растворения и заражают этим материалом 9-дневные эмбрионы в аллантоисную полость в дозе по 0,2 мл. Через 36—48 часов инкубации эмбрионы охлаждают 3 часа при 4°, затем вскрывают и хориоаллантоисные оболочки собирают в пробирки. До использования в РДП вируссодержащие хориоаллантоисные оболочки сохраняют при минус 20°. Аналогичным образом готовят контрольный антиген из нормальных хориоаллантоисных оболочек незараженных эмбрионов 12-дневного возраста.

По мере необходимости вируссодержащие оболочки оттаивают, гомогенизируют, центрифугируют 10 минут при 3000 об/мин. Надосадочная жидкость представляет собой положительный антиген для РДП, используемый в реакции. Аналогичным образом готовят испытуемый и контрольный антиген. После проверки в РДП (с отрицательным результатом) с заведомо известной преципитирующей сывороткой антиген из нормальных оболочек используют в качестве контрольного антигена.

Приготовление вируснейтрализующих сывороток. Для этого используют два штамма вируса [illegible] ного бронхита: штамм «Коннектикут Т-2», вызывающий переболев[illegible] респираторными симптомами и гибель куриных эмбрионов на 2[illegible] их заражения, а также специфические изменения у зараж[illegible] брионов, и штамм «Массачузетс № 41», вызывающий аналог[illegible] ражения цыплят и эмбрионов. Вируснейтрализующие сыво[illegible] иммунизацией кроликов (весом 2—3 кг) по одной из дву[illegible]:

Схема первая: вируссодержа[illegible] жидкость разводят физиологическим раствором 1 : 10 [illegible] с интервалом в 5 дней в дозах: первые три инъе[illegible] инъекций по 2 мл. Через семь дней после [illegible] обескровливают. *Схема вторая:* вируссо[illegible] : 10, вводят кролику внутривенно 3 раза в неделю (чере[illegible] 3 недель в дозах: первую неделю — по 2 мл, вторую — по 3 мл, [illegible] неделю — по 4 мл. Через семь дней после последней инъекции вводят внутрибрюшинно 10 мл вируса и на следующий день (внутривенно) 10 мл. Через 7 дней после последнего введения вируса кроликов обескровливают. Кровь берут стерильно из сердца в стерильные цилиндры, содержащие незначительное количество физиологического ра-

створа (для увлажнения стенок цилиндра перед взятием крови). Цилиндры с кровью выдерживают 2—3 часа при комнатной температуре, затем переносят в помещение с температурой не выше 10° для полного оттаивания. Через 24—48 часов сыворотку из отдельных цилиндров отсасывают в общий стерильный флакон раздельно по серотипам и проверяют на стерильность общепринятым методом. Посевы выдерживают в термостате 10 дней. В случае бактериального загрязнения сыворотку фильтруют через асбестовые пластинки (типа СФ) и составляют серии, соответствующие типовой принадлежности антигенов. Расфасованную по 1 мл сыворотку лиофилизируют. Нормальную сыворотку от здоровых кроликов получают аналогичным способом. Сухие специфическую и нормальную сыворотки проверяют на наличие вакуума, стерильность, активность и специфичность. Активность и специфичность вируснейтрализующей сыворотки оценивают по индексу нейтрализации на эмбрионах с гомологичными штаммами вируса. Вируснейтрализующий индекс их должен быть не ниже 100. Срок годности лиофилизированных вируснейтрализующих сывороток один год при условии хранения не выше 8°.

Получение преципитирующих сывороток. Преципитирующие сыворотки получают из крови цыплят 30-дневного возраста, однократно зараженных интратрахеально штаммом Т-2 («Коннектикут») в дозе 0,5 мл. Через 35—42 дня после введения антигена проводят пробное взятие крови у цыплят из подкрыльцовой вены для проверки наличия в сыворотке преципитирующих антител. При наличии последних цыплят тщательно обескровливают и получают сыворотку. Цыплят, в крови которых не установлены преципитирующие антитела, дополнительно иммунизируют по следующей схеме: интратрахеально по 0,5 мл 2 раза с интервалом в семь дней, перерыв семь дней, далее внутримышечно по 5 мл 2 раза с интервалом в семь дней и перерыв семь дней и, наконец, внутривенно по 5 мл 2 раза с интервалом в семь дней. Через 21 день после последней инъекции цыплят обескровливают. Пробы сыворотки подвергают бактериологическому контролю, объединяют соответственно серотипу, разливают в ампулы по 1 мл и лиофилизируют. Лиофилизированную преципитирующую сыворотку контролируют на стерильность, активность, специфичность. Активность и специфичность преципитирующей и нормальной куриных сывороток проверяют в РДП со специфическим и нормальным антигенами.

Реакция непрямой гемагглютинации. В 1962 г. Браун и др. описали реакцию непрямой (пассивной) гемагглютинации для выявления антител в сыворотках переболевших цыплят. Для этого вирус адсорбировали на эритроцитах лошади, обработанных дубильной кислотой. Эритроциты становились агглютинабельными по отношению к специфической антисыворотке. В 1963 г. Вазингтон с сотрудниками предложили вместо эритроцитов крови лошади использовать эритроциты крови барана.

Данную реакцию применяют для обнаружения специфических антител в сыворотках больной или переболевшей инфекционным бронхитом птицы. Для постановки РНГА нужны: плексигласовые панели с лунками; физиологический раствор; фосфатный буфер pH 6,2 и 7,2; нормальная сыворотка крови кролика; формалин, содержащий не менее 37% формальдегида; водорастворимый танин; эритроциты крови барана; гипериммунная сыворотка крови кур к вирусу инфекционного бронхита; нормальная сыворотка крови кур; лабораторный штамм вируса инфекционного бронхита (штамм «Бодетт»).

Примечание. Штамм «Бодетт» вируса инфекционного бронхита получают на куриных эмбрионах 8—10-дневного возраста общепринятым методом.

К собранной экстраэмбриональной жидкости добавляют антибиотики по 500 ЕД/мл и сохраняют замороженными.

Буферные солевые растворы для реакции готовят следующим образом: смешивают 0,15 М раствор NaH_2PO_4 (берут 21,45 г безводной соли NaH_2PO_4 на 1 л физраствора) и 0,15 М раствора $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (26,85 г на 1 л физраствора) в количествах, необходимых для получения pH 6,4 и 7,2*.

Эритроциты получают от здорового барана, трижды отмывают физиологическим раствором pH 7,2. Из осадка отмытых эритроцитов готовят 10%-ную взвесь на физиологическом растворе pH 7,2. Далее эритроциты формалинизируют, для чего 10%-ную взвесь их смешивают с равным объемом 5%-ного раствора свежеприготовленного на физиологическом растворе (pH 7,2) формалина. Смесь выдерживают в течение суток в термостате при 37°, встряхивают и центрифугируют; осадок пятикратно отмывают физиологическим раствором pH 7,2 и готовят вновь 10%-ную взвесь их на физиологическом растворе, содержащем формалин 1 : 1000. Формалинизированные эритроциты пригодны для использования в НРГА в течение 11 месяцев при хранении в условиях 4°.

Для танизации эритроцитов пригоден танин всех марок, хорошо растворяющийся в воде. Готовят основное разведение танина 1 : 100 на бидистиллированной воде. Раствор сохраняют в холодильнике (4°) в течение месяца. Из основного разведения танина делают разведение 1 : 20 000 на буферном солевом растворе (pH 7,2). Далее берут 10%-ную взвесь формалинизированных эритроцитов, центрифугируют и к осадку их д[illegible] танина (1 : 20 000) в соотношении 1 : 10. Суспензию выде[illegible] й бане при 37° в течение 15 минут, встряхивая ее 3—4 раза. [illegible]нные эритроциты однократно отмывают от танина буфер[illegible]ром pH 7,2 и сохраняют не более месяца при 4° в виде 1[illegible]ферном растворе.

Сенсибилизация эритр[illegible] инфекционного бронхита. Для этого осадок [illegible]0%-ной взвеси формалинизированных и танизир[illegible]руют в вируссодержащей аллантоисной жид[illegible]авляют четырехкратный объем буферного сол[illegible]держивают в термостате при 37° в течение 15 мин[illegible]встряхивают 3—4 раза. Сенсибилизированные эритроциты двукрат[illegible]дают физиологическим раствором, содержащим 1% нормальной кроличьей сыворотки. Формалинизированные, танизированные и сенсибилизированные эритроциты сохраняют в холодильнике (4°) в виде 1,5%-ной взвеси в физиологическом растворе, содержащем 1% нормальной кроличьей сыворотки. Срок хранения один месяц.

Получение нормальной сыворотки крови кролика производят общепринятым методом. Сыворотка не должна иметь следов гемолиза эритроцитов. Полученную сыворотку инактивируют в водяной бане 30 минут при 56° и адсорбируют формалинизированными и танизированными эритроцитами. Для этого на 10 мл сыворотки добавляют 1 мл осадка эритроцитов, тщательно перемешивают и выдерживают 30 минут при 37°, после чего сыворотку центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 минут. Сыворотку сливают и хранят при 4°.

Постановка реакции непрямой гемагглютинации. В главном опыте используют те эритроциты, которые дают равномерную гомогенную взвесь без гемолиза и спонтанной агглютинации.

Реакцию ставят на плексигласовых досках. Испытуемые сыворотки разводят двукратно от 1 : 2 до 1 : 64 физиологическим ра-

---

* Растворы $Na_2H_2PO_4$ и $Na_2HPO_2 \cdot 2H_4O$ готовят на физиологическом растворе NaCl.

** Вначале вируссодержащую аллантоисную жидкость размораживают, центрифугируют при 3000 об/мин в течение 15 минут и для сенсибилизации эритроцитов используют только прозрачную надосадочную жидкость.

створом, содержащим 1% нормальной кроличьей сыворотки, в объеме по 0,2 мл. Для этого в каждое углубление панели вначале наливают по 0,2 мл физраствора с нормальной кроличьей сывороткой и далее, начиная с первой по последнюю лунку, переносят по 0,2 мл испытуемой сыворотки. В каждую лунку с соответствующим разведением сыворотки добавляют по 0,2 мл 1,5%-ной взвеси формалинизированных, танизированных и сенсибилизированных вирусом эритроцитов и тщательно перемешивают. Реакцию ставят при комнатной температуре в течение 3—4 часов.

При этом ставят следующие контроли: 1) контроль формалинизированных, танизированных и сенсибилизированных эритроцитов (0,2 мл физиологического раствора с 1%-ной нормальной кроличьей сывороткой плюс 0,2 мл 1,5%-ной взвеси формалинизированных, танизированных и сенсибилизированных эритроцитов);

2) контроль нормальной (отрицательной) сыворотки (0,2 мл нормальной сыворотки+0,2 мл 1,5%-ной взвеси вышеуказанных сенсибилизированных эритроцитов);

3) контроль заведомо положительной сыворотки (0,2 мл сыворотки+0,2 мл обработанных вышеуказанным методом сенсибилизированных эритроцитов).

Реакцию учитывают в том случае, когда 1 и 2-й контроли отрицательные и 3-й — положительный. Реакцию учитывают через 3—4 часа после постановки и оценивают по четырехбалльной системе в крестах. Положительная реакция характеризуется появлением осадка эритроцитов в виде зонтика с ровными зубчатыми краями и обозначается 4 крестами (++++). Если зонтик покрывает $^2/_3$ дна лунки, ставят 3 креста (+++); если $^1/_2$ — 2 креста (++). Отрицательная реакция характеризуется выпадением эритроцитов в осадок в виде маленькой пуговицы с ровными краями. При агглютинации эритроцитов испытуемыми сыворотками в разведении 1 : 16 и выше с оценкой не ниже чем на 3 креста реакция считается положительной, с разведением 1 : 8 — сомнительной и ниже 1 : 8 — отрицательной.

Реакция связывания комплемента. Впервые РСК для диагностики инфекционного бронхита была предложена Брумфильдом и Померой (1957). В 1962 г. Джон стандартизировал этот тест и изучил механизм его проявления. Однако до сих пор данная реакция еще не нашла широкого применения для диагностики инфекционного бронхита. Стил и Лугинбул (1964) считают, что непрямая РСК может быть полезной при выявлении родства между штаммами, выделенными во время эпизоотии и при серодиагностике заболевания. Аппел (1970) предложил метод прямой РСК для установления комплементсвязывающих антител у птиц при инфекционном бронхите.

Постановка непрямой РСК. Готовят последовательные двукратные разведения испытуемых сывороток цыплят (инактивированных при 56° 30 минут) и разливают их в пробирки по 0,1 мл. Затем в пробирки добавляют 1—1,5 или 2 единицы антиге-

на вируса инфекционного бронхита *, 2 единицы комплемента морской свинки и 1 единицу антисыворотки морской свинки ** (объем каждой единицы 0,1 мл). После инкубирования в течение 12 часов при 4° в каждую пробирку добавляют по 0,2 мл гемолитической системы, затем снова инкубируют при 37° 30 минут и читают результат. Наивысшее разведение сыворотки, давшее 10 или 25% связывания, принимают за титр.

Постановка прямой РСК. Готовят последовательные двукратные разведения испытуемой сыворотки крови цыплят в объеме 0,2 мл (непрогретая куриная сыворотка)***. Затем в пробирки добавляют 0,2 мл антигена (4 дозы)**** и комплемента (в объеме 0,2 мл) — 2 дозы.

После инкубирования в течение 3 часов при 4° в каждую пробирку добавляют по 0,2 мл гемолитической системы, затем снова инкубируют при 37° в течение 30 минут и читают результат. Наивысшее разведение сыворотки, давшее 50% связывания, принимают за титр.

Иммунофлуоресценция. Вирус инфекционного бронхита выявляется методом флуоресцирующих антител в срезах из органов, преимущественно в эпителиальных клетках слизистой оболочки носовой полости, трахеи, стенки воздухоносного мешка, а также в клетках печени. При применении непрямого метода иммунофлуоресценции необходимо иметь стандартную меченную изоционатфлуоресценном сыворотку к глобулинам кролика. Специфическую сыворотку получают иммунизацией кролика. Для освобождения сыворотки от неспецифических антител их необходимо очищать порошком из хорионаллантоиса здоровых эмбрионов. Хорионаллантоисные оболочки 12—14-суточных эмбрионов тщательно гомогенизируют. Затем к гомогенату добавляют физиологический раствор в 4—6-кратном объеме, все тщательно перемешивают и центрифугируют 30 минут при 3000 об/мин. Операцию повторяют 3—4 раза. Затем центрифугат высушивают и растирают в мелкий порошок, который добавляют к сыворотке в соотношении 1 : 3—1 : 4. Перемешивают на магнитной мешалке в течение 3 часов, после чего выдерживают 24 часа при 4° и вновь центрифугируют при 6000 об/мин. 1 час.

Я. Р. Голод, М. А. Шесточенко (1970) предложили для метки иммунных сывороток родаминсульфохлорид. Метод флуоресцирующих антител позволяет выявлять антигены вируса инфекционного бронхита в мазках из паренхиматозных органов, мозга у инфицированных цыплят и куриных эмбрионов.

---

* В качестве комплементсвязывающего антигена используют аллантоисную жидкость куриных эмбрионов, инфицированных вирусом инфекционного бронхита. Аллантоисную жидкость центрифугируют при 40 000 об/мин 2 часа, затем надосадочную жидкость сливают, а осадок ресуспендируют в физиологическом растворе до $^1/_{10}$ первоначального объема.

** Антисыворотки для РСК готовят на морских свинках, которых иммунизируют штаммом «Бодетт», выращенным в культуре почечной ткани цыпленка. При получении позитивных сывороток цыплят их иммунизируют вирусосодержащей аллантоисной жидкостью (но не штаммом «Бодетт»), которую вводят цыплятам дважды интратрахеально по 0,2 мл с интервалом в одну неделю. Через 30 дней после последней инъекции птицу обескровливают.

*** В качестве комплементсвязывающего антигена используют аллантоисную жидкость эмбрионов кур, инфицированных вирусом инфекционного бронхита (титр вируса $10^{6,5}$ ELD_{50}/мл). Аллантоисную жидкость центрифугируют при 19 000 об/мин 1 час, осадок ресуспендируют в вероналовом буфере до $^1/_{100}$ первоначального объема.

**** В прямой РСК используют непрогретые свежие куриные сыворотки или сыворотки, хранящиеся при минус 20° в течение одного месяца.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ретроспективная диагностика при инфекционном бронхите чаще основывается на обнаружении вируснейтрализующих и преципитирующих антител. От больной птицы получают парные сыворотки в начальной стадии болезни и повторно через три недели. Обе пробы сыворотки одновременно исследуют на вируснейтрализующие антитела. Установление низкого титра вируснейтрализующих антител в начале болезни и высокого — после выздоровления показательно для инфекционного бронхита. Наличие положительного результата в двух реакциях свидетельствует о хроническом инфицировании стада. При постановке РН с целью ретроспективной диагностики используют вируссодержащую аллантоисную жидкость и испытуемые полевые сыворотки кур. Рекомендуется использовать смесь сывороток от 5 птиц. Методика постановки реакции описана выше.

Вируснейтрализующая активность испытуемых парных сывороток оценивается индексом нейтрализации.

Вируснейтрализующие антитела в сыворотках цыплят удается обнаружить лишь с 8—14-го дня после заражения. Максимального титра они достигают через шесть недель, и уровень их в течение 3 месяцев существенно не меняется, а затем снижается. Вируснейтрализующие антитела сохраняются при отсутствии реинфекции по меньшей мере до 20 недель. В хозяйствах, имеющих птицу различных возрастов, где она может реинфицироваться, нейтрализующие антитела практически могут сохраняться в течение всей жизни птиц.

За последние годы при диагностике инфекционного бронхита стал широко применяться метод преципитации в агаре. Преципитирующие антитела обнаруживаются через семь дней и удерживаются в течение 30—50 дней. Следовательно, наличие их позволяет установить только недавно прошедшую инфекцию. При помощи этой реакции можно диагностировать инфекционный бронхит, также исследуя парные пробы сыворотки в начале болезни и через 15 дней после проявления клинических признаков. При отрицательном результате ставят реакцию нейтрализации.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО ИММУНИТЕТА

При инфекционном бронхите очень трудно предотвратить распространение инфекции, даже если проводить убой птиц. Для лечения больных специфических средств нет. Большую роль играет вакцинация.

В настоящее время для этого применяют живые и инактивированные вакцины. В США, Голландии, ФРГ и других государствах применяют живую вакцину. Она обеспечивает более длительный иммунитет, и применение ее в экономическом отношении более выгодно. Однако применение живых вакцин способствует распространению вируса на непривитое поголовье, активизирует вторичные вирусные инфекции. Возможная передача вируса лейкоза и других возбудителей является противопоказанием к использованию живых вакцин. В связи с этим в некоторых странах широко используют инактивированные вакцины

для предотвращения снижения яйценоскости, однако они малоценны для предотвращения респираторной формы болезни среди бройлеров.

Поствакцинальный иммунитет в результате применения живой вакцины наступает через три недели и сохраняется в течение года. Устойчивость, сообщаемая инактивированной вакциной, зависит от кратности применения. При двукратной вакцинации первый раз прививают цыплят в 10—12-недельном возрасте и второй раз — за 10 дней до начала яйцекладки.

У вакцинированных птиц вырабатываются вируснейтрализующие и преципитирующие антитела, устанавливаемые в соответствующих реакциях. Raggi и Lee (1957) показали несоответствие между титрами антител в сыворотке крови у птиц и их невосприимчивостью к заражению вирусом после вакцинации. Hofstad (1961) подтвердил это наблюдение, изучив серологические реакции и иммунитет на повторное заражение различными штаммами вируса. В упомянутых выше исследованиях критерием оценки иммунитета было наблюдение за респираторными симптомами. Hitchner и др. (1964) подтвердили эти данные; они отмечали аналогичное несоответствие между серологическими титрами и иммунитетом на повторное заражение, используя в качестве критерия оценки иммунитета выделение вируса из трахеи.

В то же время Raggi и Lee (1958) наблюдали у цыплят, вакцинированных в 2-месячном возрасте живой вакциной, прямую зависимость между вакцинальными, серологическими реакциями и результатами контрольного заражения на 50-й день после вакцинации. Эти результаты свидетельствуют о хорошей иммуногенности и антигенности использованного вакцинного штамма вируса. При вакцинации птиц более раннего возраста отмечено несоответствие между серологическими показателями и результатами контрольного заражения.

Оценка иммунитета у птиц, привитых инактивированными вакцинами, основана на обнаружении вируснейтрализующих и преципитирующих антител. Обычно через две недели после второй вакцинации индекс нейтрализации составляет 3 lg.

ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ УТЯТ
(VIRUS HEPATITUS)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Вирусный гепатит утят — острая контагиозная болезнь, характеризующаяся бурным течением и высокой (100%) смертностью утят в возрасте от 1 до 10 дней. Утята старше 5-недельного возраста и взрослые утки, как правило, переболевают без клинических признаков, надолго оставаясь вирусоносителями.

Впервые эту болезнь описали Левин и Фабрикант в 1950 г. в США. В настоящее время она распространена во многих странах мира. В СССР вирусный гепатит утят регистрируется с 1958 г. В последние годы он имеет тенденцию к распространению. Погибает от 5 до 100% заболевших утят.

Инкубационный период продолжается 1—5 дней; иногда он затягивается до 8—13 дней. Чаще утята заболевают внезапно в первый день жизни и через 2—3 часа гибнут. Они становятся малоподвижными, отказываются от корма; у некоторых наблюдается сужение глазной щели, понос. Через 1—2 часа и редко позже после появления первых признаков болезни отмечают цианоз слизистой оболочки ротовой полости, а также клюва и плавательной перепонки лапок, слабость конечностей, расстройство координации движения, судороги. Утята больше сидят, лежат на груди, вытянув конечности назад или расставив их в стороны, затем падают на бок или спину, судорожно вытянув ноги вдоль туловища, запрокидывают голову на спину или бок и в таком положении погибают (явление опистотонуса).

Основные патологоанатомические изменения находят в печени. Она увеличена, консистенция паренхимы дряблая, легко рвется. У отдельных птиц печень бывает желатинообразной консистенции. Изменяется и цвет печени. Из рыжевато-красной она становится охряно-коричневой, а в типичных случаях почти зеленой. На поверхности множество кровоизлияний различной величины и формы. Иногда они бывают пятнистыми, разлитыми и не имеют четких границ. Кровоизлияния обнаруживают не у всех утят, павших от вирусного гепатита. Всегда отмечается увеличение желчного пузыря с выраженной инфильтрацией его стенок, иногда перикардит и отложение беловато-желтоватых фибринозных масс на воздухоносных мешках.

Кроме указанных изменений, отмечаются бледность сердечной мышцы, увеличение почек (иногда кровоизлияния), желтушность скелетной мускулатуры, геморрагический асцит, отек легких, ринит и увеличение селезенки с наличием множественных очагов некроза. Атипично вирусный гепатит утят протекает у молодняка 30—60-дневного возраста. Болезнь может продолжаться до 40 и более дней и чаще проявляется угнетением, снижением аппетита, малой подвижностью больных утят. Через 7—8 дней у таких утят отмечают скованность движений, поражение суставов, увеличение объема живота. Утята при передвижении принимают позу пингвина.

ВИРУС

Возбудитель гепатита утят — РНК-содержащий вирус размером 20—40 ммк, вирионы округлой формы с шероховатой поверхностью. Вирус проходит через фильтры Беркефельда, Зейтца ЕК.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус устойчив к действию диэтилового эфира, хлороформа, pH среды 3,0, не инактивируется при 50° в присутствии хлористого магния в течение часа (А. Д. Майборода, 1969). При 2—4° вируссодержащая экстраэмбриональная жидкость сохраняет инфекционность в течение 700 дней, а при минус 20° — до 7 лет. Колебания pH от 4,8 до 7,8 также не инактивируют вирус. Он выдерживает воздействие квасцов калия, сернокислого аммония и 30%-ного метилового спирта в течение 24 часов, хлороформа — в течение часа. Вирус сохраняется вирулентным в течение 62—74 дней в условиях инфицированного водоема при 15—16° (В. Д. Буряковский, 1964); в супесчаной почве с естественным колебанием влажности в пределах 18—22% и температуры от 1 до 6° при pH 5,2—8,4 вирус оставался активным в течение 105 дней. В кормах в зимне-весенний период он сохраняется вирулентным около 125 дней, а внутри птицеводческих помещений — от 44 до 100 дней (Г. Д. Волковский, 1967). В неочищенных инфицированных брудерах выживает 37 дней, во влажном помете под навесом выдерживает нагревание до 56° в течение 60 минут; резистентен к антибиотикам. По данным других исследователей, вирус теряет вирулентность в условиях комнаты через 48—96 часов хранения.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Вируссодержащий материал в условиях лаборатории рекомендуется хранить в рефрижераторе при температуре минус 10—20°.

Локализация в организме. Вирус распространяется по всему организму больного утенка, вызывая септическое течение инфекционного процесса. Вирус можно обнаружить в слизи трахеи, в легких, крови, сердце, печени, мозге, селезенке, почках и мускулатуре ног инфицированных утят, а также в экстраэмбриональных жидкостях, мозге, печени, селезенке и хорионаллантоисной оболочке инфицированных эмбрионов. Это доказывает пантропную природу вируса. Больше всего вируса концентрируется в печени, головном мозге и селезенке.

Антигенная вариабельность. До последнего времени большинство исследователей считали, что в антигенном отношении полевые штаммы вируса гепатита утят родственны. Однако в 1965 г. Эсплин сообщил о том, что вновь изолированный от утят вирус гепатита серологически отличается от штамма, который превалировал в Норфалке (Англия) с 1953 по 1963 г. Первоначальный серотип назвали типом I, а новый — типом II. Антисыворотка типа I оказалась не способной нейтрализовать вирус типа II, равно как и антисыворотка типа II не защищала утят от заражения вирусом типа I. Бивалентная вакцина, приготовленная Эсплиным, в эксперименте предохраняла утят от заражения штаммом вируса типа II и только частично против типа I.

Антигенная активность. У естественно переболевших и экспериментально зараженных утят продуцируются сывороточные антитела, обладающие вируснейтрализующими, преципитирующими и комплементфиксирующими свойствами, что широко используется в серодиагностике данной болезни.

Спектр патогенности. Вирус инфекционного гепатита утят строго монопатогенен для утят в возрасте от 1 до 30 дней. Ни один из испытанных видов лабораторных животных к данному возбудителю невосприимчив. Штаммы вируса гепатита, выделенные в различных хозяйствах, обладают различной вирулентностью. Наряду с высоковирулентными штаммами, заражающими утят в разведении 10^{-9}, встречаются и маловирулентные штаммы, вызывающие заболевание только в разведении 1 : 10 (М. Т. Прокофьева, 1962; Кривинка и Козушник, 1962). Вирус гепатита утят патогенен для гусят, поэтому в неблагополучных хозяйствах по гепатиту утят необходимо проводить строгий ветеринарный контроль и не допускать контакта утят и гусят.

Помимо природной изменчивости, этот вирус сравнительно легко аттенуируется при серийном пассировании в развивающихся куриных эмбрионах.

Культивирование вируса в лабораторных условиях. Вирус гепатита утят можно пассировать на 1—2-суточных утятах (при интраназальном, внутримышечном и интраперитонеальном способах заражения), куриных эмбрионах 8—9-суточного возраста, 12—14-дневных утиных эмбрионах, гусиных эмбрионах (А. Д. Майборода, 1969), культуре фибробластов куриных и

утиных эмбрионов, почечной ткани утиного зародыша и перевиваемой линии клеток ПП.

Первые признаки цитопатогенного действия обычно отмечаются через 48 часов. Через 48—72 часа заметны некоторая расплавленность и сетчато-ячеистая структура цитоплазмы; в некоторых инфицированных клетках видны цитоплазматические оксифильные включения. Через 96 часов у большинства клеток цитоплазма бывает разрушена и представляет собой слабо выраженную эозинофильную зернистость около ядер. В клетках, сохранивших очертания, формируются оксифильные включения. Через 120 часов встречаются сморщенные клетки с пикнотичными ядрами. Сами клетки приобретают звездчатую, угловатую и округлую формы. В гигантских клетках обнаруживается несколько ядер (симпласты). Через 144 часа весь монослой разрушается, отдельные группы клеток имеют округлую форму, ядра сморщены и уплотнены, интенсивно окрашиваются гематоксилином. Фицжеральд, Хэнсон и др. (1963), культивируя вирус в клетках почек утиного эмбриона, наблюдали цитопатический эффект только с 8-го пассажа. А. Д. Майборода (1969) показала чувствительность к этому вирусу культуры клеток эмбриона гусей. В этой системе вирус размножается, вызывая цитопатогенное действие, и накапливается в высоких титрах ($10^{6,5}$—$10^{7,5}$ $ТЦД_{50}$ в 0,2 мл). Для проявления цитопатического эффекта требуется провести несколько слепых пассажей. В чувствительных культурах цитопатогенное действие обычно проявляется через 36—48 часов после инфицирования и наблюдается в течение 4—6 суток, в зависимости от дозы вируса и вида культуры клеток. В инфицированных культурах почечной ткани утиных эмбрионов цитопатические изменения состоят в округлении и вакуолизации цитоплазмы, разрывах клеточной оболочки, явлении клазматоза цитоплазмы, формировании многоядерных структур, сходных с симпластами.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Лабораторная диагностика вирусного гепатита основана на выделении вируса, идентификации его в реакциях: нейтрализации с иммунной сывороткой переболевших или гипериммунных уток и кроликов; иммунофлуоресценции; реакции диффузной преципитации с иммунными утиными и кроличьими сыворотками, а также биопробе на 1—3-дневных утятах и первичной культуре клеток почки или фибробластов утиного эмбриона.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Взятие и обработка материала. Для выделения вируса из свежих трупов утят берут печень, селезенку и головной мозг, а от убитых утят, кроме того, кровь. Готовят 10%-ную суспензию на физиологическом растворе, добавляют антибиотики и выдерживают в течение часа при комнатной температуре; затем суспензию центрифугируют при 2500 об/мин 10—15 минут; надосадочную жидкость используют для заражения эмбрионов и утят.

Биопроба на утятах. Берут утят 1—3-дневного возраста из заведомо благополучного по вирусному гепатиту хозяйства. На каждый метод заражения нужно брать по 10 утят, так как в положительных случаях погибает 30—70% зараженных утят. Заражают утят интраназально, внутримышечно, контактно и per os. При интраназальном заражении испытуемый материал (10%-ная суспензия ткани) вводят в объеме 0,2 мл. При алиментарном заражении

погибает до 40% утят, при внутрибрюшинном и внутримышечном — 50%, при интраназальном — до 75%. Однако при недостаточной концентрации вируса в исследуемом материале или наличии пассивно переданных через яйцо антител проба на утятах не всегда удается. У экспериментально зараженных утят вирус можно обнаружить в печени, мозге, крови и селезенке в течение 5—7 дней после заражения. Переболевшая птица надолго остается вирусоносителем (на год, а возможно, и на всю жизнь).

Выделение вируса на куриных и утиных эмбрионах. Вирус гепатита удается изолировать заражением в аллантоисную полость 8—9-дневных куриных или 12—14-дневных утиных эмбрионов, иногда после нескольких слепых пассажей или в случаях запоздалой гибели при заражении маловирулентными штаммами. Обычно в первых пассажах единичные случаи гибели эмбрионов наблюдают на 4—5-й день после заражения. Утиные эмбрионы погибают на 2—5-й день после заражения. На 6-й день всех живых зараженных эмбрионов убивают холодом. Более регулярно они гибнут, начиная с третьего пассажа. У погибших эмбрионов вирус содержится в печени, селезенке, головном мозге и экстраэмбриональной жидкости. При гибели эмбрионов обнаруживают застойные явления и кровоизлияния на теле, головке, крылышках и фалангах пальцев; сильные отеки хорионаллантоисной оболочки и темя эмбриона; иногда признаки желтухи (аллантоисно-амниотическая жидкость, содержимое кишечника и желточного мешка окрашены в зеленый цвет); печень резко увеличена, дряблая, серо-гнилостного, желто-охряного, а иногда зеленого цвета с кровоизлияниями и очагами некроза в виде точек или переплетающихся тяжей. Эмбрионы, павшие или убитые на 5—6-й день (и позднее), слабо развиты; погибает 90—100% зараженных эмбрионов, при этом происходит аттенуация вируса в отношении утят.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Серологическая идентификация

Реакция диффузной преципитации. В качестве антигена можно использовать экстраэмбриональную жидкость, суспензию легких, селезенки и печени инфицированного куриного эмбриона. Наилучшей для данной реакции является среда Ленинградского ВНИИБП, содержащая 1—1,5%-ный агар на фосфатно-буферном физиологическом растворе поваренной соли pH 7,1—7,2 с добавлением 0,01% мертиолята (А. Н. Куриленко, 1968). Агар предварительно промывают проточной водопроводной водой в течение двух дней и один день дистиллированной водой. Перед фильтрацией среду осветляют добавлением белка одного куриного яйца на 1 л среды. Разлив среды и приготовление лунок в агаре производят общепринятым методом.

Специфические сыворотки, необходимые для реакции диффузной преципитации и реакции нейтрализации, а также иммунофлуоресценции, готовят на кроликах (2,5—3 кг) и утках 2—4-месячного возраста по схемам А. А. Синицкого и Куо-Чинг-Вуона или З. Я. Чистовой и В. Н. Сюрина (см. статью «Ларинготрахеит»).

По *первой схеме* (А. А. Синицкого) животных иммунизируют концентрированной вируссодержащей аллантоисной жидкостью тремя циклами. Первый цикл: первый день — 2,5 мг белка (определяемого по Лоури в пересчете на сухое вещество), второй — 5 мг, третий — 10 мг, четвертый день — 15 мг того же материала. Антиген в объеме 1 мл вводят внутривенно. Второй и третий циклы проводят аналогично. Перерывы между циклами 4—5 дней. Кровь берут через шесть дней после последней инъекции антигена (А. Н. Куриленко, 1968).

По *второй схеме* первый цикл иммунизации начинают с внутриконъюнктивального введения в оба глаза по 0,1 мл вируссодержащего белка в 1%-ной концентрации попеременно три дня подряд. После 2-дневного интервала второй цикл иммунизации повторяют аналогично первому. Затем через два дня кроликам вводят таким же образом вируссодержащий белок в 2%-ной концентрации ежедневно в течение трех дней. Кровь берут из сердца через трое суток, после последней инъекции антигена.

Утиную гипериммунную сыворотку получают по схеме И. Н. Дорошко, П. И. Поникер (1964), Б. Ф. Бессарабова (1967): вируссодержащую аллантоисную жидкость трехкратно вводят внутримышечно с интервалом в семь дней. Количество антигена составляет 1—3 мл. Через 7 дней после последней иммунизации уток обескровливают.

Для иммунизации кроликов и уток используют эмбриональный штамм вируса, инфекционный титр которого должен быть не ниже 6,5 lg EID_{50}/мл.

Перед иммунизацией уток вирус предварительно концентрируют диализом против насыщенного раствора сахарозы (3 части сахарозы и 1 часть дистиллированной воды) в течение 13 часов.

За сутки до обескровливания проводят пробную реакцию преципитации в пробирках следующим образом. Полученные сыворотки разводят 1:1 0,87%-ным раствором NaCl (0,2 мл), антиген берут (по 0,2 мл) в разведениях: 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}. В пробирки наливают 0,2 мл сыворотки и затем осторожно наслаивают антиген в указанных разведениях. Реакцию ставят при температуре 18—20° и считают положительной в случае появления кольца преципитации не позже чем через 15 минут. Резко положительная (++++) — кольцо преципитации образуется в течение первой минуты; хорошо выраженная реакция (+++) — не позже 5 минут; положительная реакция (++) — не позже 10 минут и слабоположительная (+) — появление кольца преципитации в течение 10—15 минут. Контролями в тех же объемах служат: физиологический раствор плюс преципитирующая сыворотка, физиологический раствор плюс антиген, нормальная кроличья сыворотка плюс антиген (А. Н. Куриленко, 1968).

Титры гипериммунных кроличьих сывороток, полученных по указанным обеим схемам, а также гипериммунных утиных сывороток колеблются в пределах 1:200—1:2000.

Гипериммунные кроличьи и утиные сыворотки используют в реакции диффузионной преципитации.

Реакцию в главном опыте ставят следующим образом: в центральную лунку вносят 0,2 мл испытуемого антигена, а в боковые — иммунные и контрольные сыворотки или физиологический раствор в том же объеме (0,2 мл). Чашки выдерживают при 18—20°. В другом варианте в центральную лунку вносят гипериммунную сыворотку, а в боковые — испытуемые вируссодержащие суспензии и контрольные жидкости.

Линии преципитации (2 или 3) появляются через 18—24 часа при температуре 18—20° и сохраняются в течение 5—7 дней. Время появления и четкость линий преципитации у разных штаммов неодинаковы. Для повышения чувствительности реакции вируссодержащий материал очищают хлороформом, к которому вирус гепатита утят оказался устойчивым.

И. И. Сконсманас (1964) считает, что сыворотки уток-реконвалесцентов, так же как и гипериммунных птиц, непригодны для реакции диффузионной пре-

ципитации, так как и сыворотки здоровых уток давали в его экспериментах эффект преципитации.

Хлороформенный метод очистки состоит в следующем. Суспензию печени 1 : 20 в физиологическом растворе NaCl встряхивают в течение часа, после чего к ней в равном объеме добавляют хлороформ, смесь шуттелируют и центрифугируют при 2000 об/мин 15 минут. Надосадочную жидкость используют в качестве антигена. По второму варианту очистки суспензию печени вначале обрабатывают хлороформом в разведении 1 : 2, затем просветляют нагреванием при 56° в течение 2—3 минут и последующим центрифугированием. Надосадочную жидкость используют в РДП в качестве антигена.

Предложен метод очистки данного вируса фреоном. Для этого к 1 части испытуемого гомогената тканей добавляют 2,5 части фреона-113 и 4 части буферного раствора pH 7,4. При исследовании яичного желтка на присутствие вируса желток в равном объеме смешивают с хлороформом и центрифугируют при 5000 об/мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость обрабатывают хлороформом, центрифугируют и используют в РДП.

Для повышения специфичности реакции диффузионной преципитации проводят истощение гипериммунных кроличьих сывороток. В качестве адсорбента используют гомогенат нормальных хориоаллантоисных оболочек в соотношении 1 : 3 к сыворотке. Смесь на 45 минут помещают в термостат (37°), а затем в рефрижератор (4°). Через 24 часа ее центрифугируют при 2500 об/мин в течение 10 минут и сыворотку отсасывают. Адсорбированная сыворотка не образует линий преципитации с антигенами нормальных эмбрионов.

При постановке реакции преципитации необходимо учитывать, что при наличии слабоактивной сыворотки и низкой концентрации вируса реакция сильно задерживается.

Реакцию нейтрализации применяют для идентификации вируса, серологически атипичных случаев болезни, обнаружения специфических антител при ретроспективной диагностике болезни и, наконец, для определения вируснейтрализующей активности экспериментально полученных (на кроликах и утках) гипериммунных сывороток. В первом случае (при серологической идентификации вируса) в реакции участвуют испытуемый вирус в десятикратных разведениях до 10^{-6} и заведомо позитивная гипериммунная сыворотка (цельная или в разведении 1 : 10)*.

Реакцию нейтрализации ставят на 8—10-дневных куриных или 12—16-дневных утиных эмбрионах общепринятым методом. Результат оценивают или по индексу нейтрализации (который в пределах 11—49 считается сомнительным, а от 50 и выше — положительным), или по степени разведения сыворотки, когда последнюю разводят двукратно, а вирус берут в постоянной дозе.

Гипериммунные сыворотки получают от кроликов и уток по вышеприведенной схеме. Сыворотка крови кроликов обладает нейтрализующей активностью до 1 : 128—1 : 256, а уток — 1 : 256—1 : 512.

---

* При втором варианте постановки реакции нейтрализации смесь равных объемов вируса, содержащего 100—300 LD_{50}/0,1 мл, и сыворотки, разведенной с коэффициентом 2, инкубируют при 36° в течение 40 минут и затем инокулируют в аллантоисную полость 8-дневных куриных эмбрионов. Каждым разведением смеси заражают по 4—6 эмбрионов. Сыворотки, нейтрализующие меньше 10 LD_{50} вируса в 0,1 мл, титруют добавлением к вирусу неразведенной сыворотки. Титр вируса и индекс нейтрализации сывороток определяют по смертности куриных эмбрионов через шесть дней инкубации.

Данная реакция является основным методом диагностики атипичного и бессимптомного течения вирусного гепатита.

Следует иметь в виду, что сыворотка уток-реконвалесцентов обычно имеет более низкие титры антител, чем гипериммунные сыворотки уток и кроликов. Кроме того, уровень антител зависит и от времени переболевания. Поэтому при ретроспективной диагностике следует использовать реакцию нейтрализации по методике, где делается разведение вируса (от 10^{-1} до 10^{-6}), а испытуемую сыворотку берут в постоянной дозе (в разведении 1 : 2 или 1 : 5).

Иммунофлуоресценция. Для применения непрямого метода флуоресцирующих антител используют гипериммунные сыворотки крови уток и кроликов, получаемые вышеописанным методом, и антиутиную сыворотку, которую получают на кроликах.

Материалом для исследования служит печень, мозг зараженных вирусом гепатита и павших или убитых утят или погибших куриных эмбрионов. В качестве контроля исследуют те же органы здоровых утят и эмбрионов. Мазки-отпечатки готовят из свежего нефиксированного материала, затем их фиксируют ацетоном при температуре 2—4° в течение 10 минут или метиловым спиртом 5 минут при 18—20° и подсушивают на воздухе.

Окрашивание препаратов прямым и непрямым методами, а также определение красящего титра сывороток и гашение собственной флуоресценции проводят общепринятым методом.

Метод флуоресцирующих антител позволил установить цитоплазматическую локализацию антигена в пораженных вирусом клетках печени и мозга куриных эмбрионов. Присутствие вируса устанавливается начиная с 24 часов после заражения; антиген вначале локализуется по периферии цитоплазмы клеток, затем, по мере размножения вируса, распространяется по всей цитоплазме; количество клеток, пораженных вирусом, постоянно возрастает. Вирус в куриных эмбрионах можно обнаруживать как по гистосрезам, так и по мазкам-отпечаткам. Более четкие результаты получаются при обработке препаратов прямым методом.

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА

Ретроспективную диагностику можно проводить при помощи реакции диффузионной преципитации или реакции нейтрализации. Утята-реконвалесценты 15—30-дневного возраста обычно имеют титр вируснейтрализующих антител 1 : 256—1 : 512; через четыре месяца он снижается до 1 : 32, а у взрослых уток-реконвалесцентов до 1 : 16 (И. Н. Дорошко, В. Д. Буряковский, 1965).

ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА

Вирусный гепатит утят следует отличать от ботулизма, чумы уток, инфекционного серозита и паратифа. При ботулизме, вызванном поеданием кормов, зараженных Bac. botylinus, наблюдаются

быстро наступающая слабость, судороги и смерть большого числа уток. Ботулизм чаще возникает у утят, переведенных на водоемы, и характеризуется конъюнктивитом, цианотичностью, общей слабостью, параличами мышц шеи, крыльев и ног, кровоизлияниями на серозных оболочках. Замена недоброкачественных кормов приводит к прекращению падежа, чего не происходит при вирусном гепатите. При ботулизме в отличие от вирусного гепатита гибнут утята всех возрастов.

Чума уток отличается от гепатита иммунологически. Возбудитель чумы уток в отличие от вируса гепатита утят обладает способностью гемагглютинировать эритроциты. У больных утят вначале появляются шаткая походка и понос. При вскрытии обнаруживают геморрагии на сердце, на серозных оболочках, пищеводе. Болезнь зарегистрирована в Нидерландах и Индии.

Инфекционный серозит — болезнь молодых уток, вызываемая бактерий Moraxella anatipestifer. У больных наблюдаются кашель, топающая походка, потеря равновесия, судороги. При вскрытии обнаруживают фибринозное воспаление серозных оболочек; фибрин в виде пленки покрывает сердце и печень, а в воздухоносных мешках может содержаться желтый творожистый экссудат. Печень и селезенка увеличены. Из печени и крови выделяют возбудителя. После дачи террамицина падеж утят прекращается, чего не происходит при вирусном гепатите.

Паратиф поражает молодых утят начиная с 1-дневного возраста. Болезнь характеризуется слабостью, поносом, внезапно наступающими судорогами и смертью. При паратифе течение болезни более продолжительное (1—3 дня и меньше), чем при вирусном гепатите утят. Скармливание антибиотиков (биомицина, левомицетина или синтомицина по 20—50 мг 2 раза в день с кормом) и применение сыворотки быстро прекращает отход. При вирусном гепатите антибиотики и сыворотка не оказывают влияние на ход эпизоотии. Часто наблюдается смешанная инфекция — паратиф, вирусный гепатит и выделение Salmonella typhi murium еще не исключает отсутствие возбудителя гепатита. Необходимо проводить вирусологическое исследование. Кроме того, в последнее время отмечают и такую смешанную инфекцию, как вирусный гепатит и колисептицемия. До сих пор еще часто вирусный гепатит проходит под диагнозом острого кормового отравления.

Профилактика. В качестве профилактического средства в неблагополучных хозяйствах рекомендуют применять сыворотку реконвалесцентов (Левин и Фабрикант, 1950); 0,5 мл такой сыворотки предохраняет утят от заболевания в течение всего периода, пока они не станут резистентными. В неблагополучном хозяйстве сыворотку вводят внутримышечно всему молодняку 2—3-дневного возраста. По данным других исследователей, сыворотка обладает лишь кратковременным профилактическим действием (до 10 дней), поэтому необходимо двукратное введение ее, так как вирусным гепатитом болеют утята и старше 2-недельного возраста. В этом отношении данные Риспенса (1962) подтвердили и отечественные исследователи (И. Н. Дорошко и др., 1963; Р. А. Зубцова и др., 1962). Врожденный пассивный иммунитет, переданный уткой потомству через племенное яйцо, бывает стойким только в течение двух, а не трех недель

жизни (Хэнсон и Альбертс, 1960). По данным Реусса (1959), чтобы получить стойкий пассивный иммунитет, необходимо утку иммунизировать многократно (3—6 раз) подкожно с интервалом в три недели в дозе 0,5 мл. Одновременно автор установил, что повторные инъекции вируса вызывают у птицы отрицательную реакцию: утята, привитые 6 раз, находились в значительно худшем состоянии упитанности и начали яйцекладку на восемь недель позднее, чем привитые 3 раза.

В Англии Эсплиным предложена вакцинация уток-несушек живым вирусом гепатита, размноженным на куриных эмбрионах. После прививки взрослые утки бессимптомно переболевают, у них образуются антитела, передающиеся через желток потомству и предохраняющие его от естественного инфицирования в течение 3—4 недель. Предложены авирулентные варианты из аттенуированных штаммов вируса гепатита. К сожалению, вакцинный штамм Т, предложенный Эсплиным, оказался недостаточно аттенуированным и способен реверсировать в исходное состояние. В СССР живую вакцину с профилактической целью не применяют.

ЛЕЙКОЗ ПТИЦ

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Лейкоз — неопластическое заболевание, вызываемое вирусом и характеризующееся поражением главным образом органов кроветворения. В настоящее время лейкоз птиц рассматривается в общебиологическом аспекте. С одной стороны, эта болезнь наносит значительный ущерб экономике страны, с другой — возбудители лейкоза представляют потенциальную онкогенную опасность для человека при употреблении сырых яиц и вакцинации препаратами, изготовленными на куриных эмбрионах.

Болезнь наносит значительный экономический ущерб сельскому хозяйству. По данным В. П. Зеленского (1969), ущерб от лейкоза только на одной птицефабрике нашей страны в среднем составляет 30—70 тыс. рублей на каждые 100 тыс. кур-несушек.

Серологическое обследование пяти хозяйств Московской и двух хозяйств Саратовской областей показало, что около 50% образцов куриных сывороток были положительными в отношении вирусов лейкоза птиц. В четырех хозяйствах Латвийской ССР установлено около 60% сывороток, которые содержали антитела против вирусов этой болезни. Исследование 260 куриных эмбрионов на обсемененность их вирусами лейкоза птиц показало, что 25% из них содержали вирус лейкоза. Изучение культуры фибробластов куриных эмбрионов от 400 эмбрионов (каждый эмбрион трипсинизировали отдельно) показало в РСК 30% положительных образцов (Е. С. Воронин и др., 1968).

Исследованиями А. Г. Кравченко и сотр. (1968), Е. С. Воронина и сотр. (1968) установлено, что в нашей стране в ряде птицехозяйств циркулирует вирус лейкоза, антигенно родственный штамму «Бриан» вируса саркомы Рауса. Доказательством этому служит изучение в реакции нейтрализации сывороток [illegible] и кроликов, гипериммунизированных аллантоисными культурами вируса [illegible] человека, псевдочумы и ларинготрахеита птиц. Примерно 18% обследованных сывороток этих животных содержали антитела к штамму «Бриан» вируса саркомы Рауса. Эти данные свидетельствуют о том, что в природе преобладает [illegible] вируса лейкоза птиц, сходный со штаммом «Бриан». Кроме того, [illegible] антител к вирусу лейкоза птиц в сыворотках гипериммунизированных [illegible] свидетельствует об [illegible] возбудителя в эмбрионах [illegible] при инкубации, способного [illegible] реакцию в гетерологичном организме.

[illegible] те же исследователи [illegible] контаминацию вирусами группы [illegible] птиц биологических препаратов, [illegible] эмбрионах, полученных от кур из обычных птицехозяйств. [illegible] с этим встал вопрос о [illegible] перед использованием [illegible] готовления живых вакцин против [illegible] псевдочумы и ларинготрахеита на [illegible] тую биологическую [illegible], свободную от вирусов [illegible] лейкозов птиц. [illegible] отношении [illegible] эмбрионы и [illegible] культуры [illegible] японских [illegible], которые [illegible] сотр. ([illegible] ались своеобразных [illegible]. При [illegible] установлено [illegible] вакцинных [illegible] вирусов [illegible] ахеита и [illegible] как в куриных [illegible] перевиваемых [illegible] онах.

При лейкозе, так же как при другой болезни птиц, наблюдаю
следность гребешков, диарею, снижение яйценоскости. С прак
ражения вирусные опухоли кур можно отнести к трем категор
лейкозы (миелобластоз, эритробластоз и лимфоидный
комбинированной ткани (саркома, остеонетроз, опухоли по
ластоз и опухолированные болезни лейкозо-саркомного комп
Собственно лейкозы кур, как заболевание о
ают на две группы: эритробластоз и саркома
раваскулярные (алейкемические, протекающие без зн
ровии (лимфоидный лейкоз).
ломатоз
м формам лейкоза)
отекает в с т о з
ризнаком
и мозге и
отные
кой

перьевые фолликулы, раны кожи и слизистой оболочки. Больные птицы слабы, вялы, апатичные. Печень сильно увеличена.

Форму лейкоза определяют гистологическим исследованием пораженных органов. В природе преимущественно встречается лимфоидный лейкоз, который проявляется наиболее выраженным опухолевым процессом. В органах наблюдается очаговое разрастание лимфобластических клеток. Для лимфоидного лейкоза свойственна прогрессирующая пролиферация лимфоидных клеток.

В начальной стадии заболевания печень слегка увеличена, вишнево-красного цвета, кишечник в состоянии катарального воспаления. По мере развития болезни печень увеличивается и может занять всю грудобрюшную полость. Цвет ее от светло-желтого до темно-коричневого. На поверхности заметны сероватобелые очажки и саркомоподобные узлы различной величины. Селезенка серовато-красного цвета с многочисленными белыми узелками, чаще с просяное зерно. Картина крови непостоянна, в результате чего не может быть использована в качестве дополнительного диагностического теста.

ВИРУС

Известны три вируса, близко родственные между собой, которые принято объединять в группу вирусов комплекса лейкозов кур: вирус миелобластоза, эритробластоза и лимфоматоза. Все эти вирусы родственны вирусам, вызывающим саркомы кур. Вирусы этой группы относятся к РНК-содержащим вирусам, размер их от 60 до 120 мк. Нуклеокапсид представляет собой закрученную спиралью трубочку диаметром 75—85 Å, образующую шар диаметром 750—850 Å. РНК расположена в центре этого шара. Липопротеидная оболочка состоит из мельчайших шариков. Эритробластоз, представленный штаммами R, RPZ-12, E-26, C, S-13, вирус ES-4, вызывает комбинированное заболевание — эритробластоз, саркому и карциному почек.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирусы лейкозов птиц быстро инактивируются при температуре 46° и выше, чувствительны к эфиру и хлороформу.

Хранение вируссодержащего материала. При 2° зона оптимальной стабильности вирусов миелобластоза и эритробластоза колеблется в пределах pH 5,0—8,7. Вирус длительно сохраняет активность в лиофилизированном виде. Опухоль, содержащая вирус саркомы Рауса, сохраняет активность при минус 20° в течение 1—2 лет; вируссодержащая суспензия того же материала при той же температуре — в течение 2 месяцев, при минус 40° — 3—4 месяца, в жидком азоте (минус 197°) — в течение 2—3 лет. Указанные режимы хранения относятся ко всем известным вирусам лейкоза птиц. Лиофилизацию штаммов вируса саркомы Рауса производят на 10%-ном растворе пептона, смешивая равные количества вируса и наполнителя.

Локализация в организме. Вирус локализуется в крови, печени, яичнике, фабрициевой сумке, реже в кишечнике и мышцах. При внутривенном заражении цыплят вирусом миелобластоза он вскоре исчезает из крови, проникает в костный мозг, где и фиксируется. Примерно с 3—16-го дня (в зависимости от дозы и вирулентности вируса) он вновь появляется в крови, которая становится заразной для других кур. У зараженных цыплят чувствительной линии продолжительность заболевания от момента появления незрелых форм клеток в крови до гибели птицы составляет 12—15 дней; наблюдается прогрессирующая анемия и гранулоцитопения. Вирус миелобластоза может находиться в плазме крови больной птицы в очень высоком титре (10^{12} ID_{50}).

В организме птиц, инфицированных через яйца, вирус лимфоматоза длительно находится в организме в относительно высоких концентрациях; кроме того, он содержится в слюнных железах, носовой полости, трахее и в испражнениях, выделяясь в окружающую среду.

Антигенная структура вируса миелобластоза кур сложна. В его состав входит: антиген, специфический для вируса, проявляющий свою активность в организме хозяина; антиген, идентичный с антигеном нормальной куриной ткани, проявляющий свою активность только в гетерологичном организме,

и форсмановский антиген. Особенностью антигенной структуры вируса миелобластоза является наличие форсмановского антигена.

В отличие от вируса миелобластоза вирус эритробластоза имеет только два антигенных компонента: антиген, специфичный для вируса, и антиген со специфичностью нормальной куриной ткани. Форсмановский антиген в составе этого вируса не обнаружен. Поэтому эталонный штамм R этого вируса нейтрализуется обеими кроличьими антисыворотками — на вирус и на нормальную куриную ткань. Получение моноспецифической сыворотки (только к вирусу) достигается методом истощения ее нормальной куриной тканью.

Антигенная активность. Конкретное заражение кур вирусом лимфоматоза всегда сопровождается выработкой вируснейтрализующих антител. Последние связывают вирус, циркулирующий через желток передают антитела потомству, у которого они обнаруживаются на протяжении двух недель с момента вылупления. Сыворотка выздоровевших от лейкоза кур способна нейтрализовать вирус в лейкемической плазме, но не влияет на материал, содержащий лейкозные клетки.

Антигенные взаимоотношения между вирусами куриных неоплазм. В соответствии с классификацией Фогта и Ишизаки (1966) вирусы лейкозно-саркомной группы делятся на три подгруппы: A, B, C. В Государственном контрольном институте им. Тарасевича недавно выделена четвертая подгруппа D. А. Д. Альштейном и сотр. (1966) были показаны антигенные различия между четырьмя штаммами вируса саркомы Рауса, представителями всех четырех серогрупп. Представители этих подгрупп отличаются друг от друга антигенной структурой, интерферирующим действием и поведением in vivo и in vitro. Наиболее часто в птицеводческих хозяйствах СССР циркулируют вирусы подгруппы A (40%), реже подгруппы B (15%) и C (11%) и почти не встречаются неклассифицированные вирусы.

Антигенные свойства вируса саркомы Рауса зависят от антигенных свойств сопутствующего вируса RAV (Raus associated virus), без участия которого вирус саркомы Рауса не может образовывать протеиновую оболочку. В настоящее время выделено более пяти типов сопутствующего агента (RAV), различающихся по своим антигенным свойствам.

Однако дефектность вируса саркомы Рауса не абсолютна, обнаруживается незначительное количество вируса Рауса, способного трансформировать высокочувствительные клетки японских перепелок и куриных эмбрионов фенотипа C/O и C/A. Этот вирус назван RSV (O), так как его репродукция не зависит от лейкозного вируса помощника (Фогт, 1967). Между вирусами миелобластоза и эритробластоза имеется антигенное родство. Антисыворотка, полученная на первый вирус, нейтрализует не только его, но и гетерологичный (эритробластоза) вирус. Наоборот, антисыворотка к вирусу эритробластоза, полученная таким же способом, лишь частично преципитирует гомологичный вирус и почти не преципитирует вирус миелобластоза. Кроличьи антисыворотки, полученные на нормальную куриную ткань, нейтрализуют оба вируса за счет входящего в их состав компонента нормальных куриных тканей.

Вирусы миелобластоза и эритробластоза антигенно родственны с вирусом и лимфоматоза кур и вирусом саркомы Рауса. Однако антисыворотка к вирусу саркомы Рауса не нейтрализует вирус эритробластоза. Антигенные взаимоотношения между вирусами, вызывающими неоплазмы у птиц, представлены в таблице 1 (В. А. Парнес, 1966).

В 1960 г. Рубин выделил в культуре фибробластов куриных эмбрионов вирус, который обладает свойством ингибировать репродукцию вируса саркомы Рауса. Автор назвал его вирусом RIF (resistance inducing factor — фактор, вызывающий резистентность). Вирус саркомы Рауса, размножаясь в течение нескольких дней, трансформирует культуру фибробластов куриных эмбрионов в опухолевые очаги. В естественных условиях вирус RIF встречается и в некоторых эмбрионах. Клетки фибробластов куриного эмбриона, зараженные этим вирусом, полностью или частично становятся устойчивыми к повторному заражению RSV. В настоящее время считают, что вирус RIF сходен с вирусом лимфоматоза (штамм RPZ-12).

Антигенные взаимоотношения между вирусами

с вирусом	Перекрестная реакция нейтрализации с антисывороткой к вирусу			
	лимфоматоза	миелобластоза	эритробластоза	саркомы Рауса
Лимфоматоза	+	+	+	+
Миелобластоза	+	+	+	+
Эритробластоза	—	+	+	—
Саркомы Рауса	+	+	+	+

Условные обозначения: + реакция положительная; — реакция отрицательная.

Благодаря разработанной методике идентификации вирусов неоплазм птиц in vitro их разделяют на две группы: RIF-положительные и RIF-отрицательные. RIF-положительные вирусы (к ним относится и возбудитель лимфоидного лейкоза) способны подавлять рост вируса саркомы Рауса в культуре фибробластов куриного эмбриона, а в организме восприимчивых птиц обладают свойствами индуцировать лимфоидный лейкоз, эритробластоз, миелобластоз, эндотелиому, фибросаркому, нейробластому и остеонейроз. RIF-отрицательные вирусы не обладают ингибирующим действием на вирус саркомы Рауса, а у цыплят вызывают развитие только болезни Марека.

Однако установлено, что вирусы лейкоза птиц весьма разнообразны в антигенном отношении, и феномен интерференции между ними и вирусом Рауса иммунологически строго специфичен: трансформирующая активность вируса Рауса (штамма Бриан) подавляется только таким штаммом ассоциированного вируса лейкоза, который соответствует ему в антигенном отношении и принадлежит к одной подгруппе. На основании перекрестных реакций в тестах нейтрализации и иммунофлуоресценции в 1966 г. Ишизаки и Фогт установили в оболочках лейкозно-саркомного комплекса птиц различные группо-специфические антигены. В зависимости от серотипа авторы предложили разделить все лейкозные вирусы на три подгруппы:

A — RAV-1, RAV-3, RAV-4, RAV-5, FAV-1, AMV-1, RIF-1, RPZ-12, SR-RSV-1, MH-RSV.

B — RAV-2, AMV-2, RIF-2, SR-RSV-2, HA-RSV.

C — CZ-RSV, PR-RSV.

Сюда же можно отнести около десяти штаммов вируса эритробластоза, новый вирус — помощник RAV-50, штаммы вируса саркомы Рауса RPZ-22, «Брайан-С», «Дядькова-5» и 6 и др.

Энзиматическая активность. Вирус миелобластоза способен дефосфорилировать аденозинтрифосфат. Свойство этого вируса используют для количественного определения его в плазме по активности аденозинтрифосфатазы. Установлена полная корреляция между энзиматической активностью, количеством вирусных частиц и их инфекционными свойствами. По энзиматическому тесту можно отбирать птиц с высоким содержанием вируса в плазме.

Вирусы эритробластоза и лимфоматоза не проявляют энзиматической активности.

Спектр патогенности. Каждый из перечисленных вирусов обладает широким спектром патогенных свойств. В настоящее время выделены многочисленные штаммы вирусов птичьих неоплазм с разными онкогенными потенциями. Лейкозные вирусы обладают определенной спецификой в отношении способности вызывать пролиферацию тех или иных клеточных элементов, некоторые из них способны вызывать развитие саркомы. До сих пор дебатируется вопрос, действительно ли вирусы лейкоза кур являются полипатентными (способными

вызывать разные патологические синдромы) или же выделенные штаммы представляют собой смесь нескольких вирусов. В таблице 2 приводятся спектры онкогенных свойств вирусов птичьих неоплазм (В. А. Парнес, 1966).

ТАБЛИЦА 2

Спектр онкогенных свойств вирусов птичьих неоплазм

Болезнь	Вирус				
	лимфоматоза	эритробластоза	миелобластоза	саркомы Рауса	ретикулоэндотелиомы
Лимфоматоз	+	штамм R (w)	+		
Эритробластоз	+	+		+	
Миелобластоз			+		
Саркома		штамм B (w)		+	
Остеопороз	+		+		
Опухоль почки			+		
Гемангиоматоз	+				
Эндотелиальная болезнь				+	
Ретикулоэндотелиома					+

Условные обозначения: + способность вызывать болезнь.

Вирус саркомы Рауса патогенен (при экспериментальном заражении) для кур, уток, гусей, перепелок, фазанов, голубей, воробьев, цесарок, индеек, морских свинок, сирийских хомячков, новорожденных обезьян, диплоидных клеток и человеческих фибробластов. Чувствительность цыплят к экспериментальной инфекции вирусом миелобластоза колеблется в широких пределах в зависимости от породы, возраста птицы, дозы вируса и способа заражения.

Эритробластоз — наиболее злокачественная форма лейкоза птиц. Для него патогномонично появление в токе крови зараженной птицы больших эритробластов. Уже через 48 часов после заражения появляются первые клинические признаки болезни: в крови увеличивается число полихроматофильных эритроцитов, изменяются их форма, размеры, структура ядра. Болезнь быстро развивается. Зараженная птица гибнет после 7—9-го дня. Вирус эритробластоза значительно вирулентнее вируса миелобластоза; латентный период при экспериментальной инфекции короче. Закономерности накопления вируса эритробластоза в крови и органах больной птицы иные. Вскоре после внутривенного введения он исчезает из тока крови, проникает в костный мозг и находится в нем до гибели птицы. На третий день в костном мозге образуются первые фокусы неопластической ткани. На пятый день изменения в костном мозге резко выражены. Очаги пролиферации появляются в печени, селезенке, почках и других органах. Для пассажей вируса эритробластоза используют цыплят в возрасте 2—3 недель. Цыплята породы плимутрок к этому вирусу высокорезистентны, а белый леггорн линии 15 — высоковосприимчивы. Наиболее изучен штамм R вируса эритробластоза.

К вирусу лимфоматоза наиболее восприимчивы цыплята 1—2-дневного возраста. В дальнейшем восприимчивость постепенно падает. Инкубационный период развития висцерального лимфоматоза составляет приблизительно 100 дней. Наиболее восприимчивы птицы сублинии 51-1 породы белый леггорн. При введении вируса лимфоматоза у птицы может развиваться несколько типов неоплазмы (эритробластоз, висцеральный лимфоматоз, остеопароз). При висцеральном лимфоматозе в процесс почти всегда вовлекаются селезенка и костный мозг, часто почки и яичники.

К вирусу саркомы Рауса восприимчивы практически все линии и породы кур, но в разной степени. Наиболее чувствительными оказались цыплята и эмбрионы линии 15 белого леггорна и коричневого леггорна эдинбургской линии.

Исследованиями А. Т. Кравченко и сотр. (1967) установлено, что наиболее пригодны для работы в условиях лаборатории эмбрионы кур отечественной породы бурый леггорн, русская белая и японской линии М белого леггорна. Изучение чувствительности эмбрионов различных линий и пород кур важно потому, что по такому простому тесту, как реакции хорионаллантоисных оболочек на введение вируса саркомы Рауса, можно судить о степени восприимчивости птицы к лейкозу. Поэтому путем подбора кур, несущих только резистентные эмбрионы к вирусу саркомы Рауса, можно вывести породу, в достаточной степени невосприимчивую к неопластическим заболеваниям.

Культивирование вирусов лейкозов в лабораторных условиях. Вирус саркомы Рауса можно культивировать на цыплятах породы белый леггорн. Суспензию вируса вводят в перепонку крыла цыпленка в объеме 0,1—0,2 мл. Через 8—12 дней после инокуляции вируса в перепонках крыльев появляются опухоли. Последние извлекают, тщательно растирают в ступке со стеклянным порошком и готовят 30%-ную суспензию на среде 199 или лактальбумина с добавлением 10% нормальной сыворотки крупного рогатого скота и по 1000 ЕД пенициллина и стрептомицина на 1 мл. Суспензию центрифугируют при 3000 об/мин, надосадочную жидкость отсасывают и сохраняют при минус 30°. Суспензия вируса служит материалом для экспериментальных исследований. Вирус саркомы Рауса титруют на 10—14-дневных цыплятах инъекцией в перепонку крыла 0,1 мл каждого десятикратного разведения. Титр рассчитывают по Риду и Менчу. Помимо того, вирус саркомы Рауса можно культивировать на куриных эмбрионах 6—12-дневного возраста при заражении внутривенно, на хорионаллантоисную мембрану, в амнион, в культуре фибробластов куриного эмбриона. Этот вирус вызывает образование опухолей у цыплят, бляшек на хорионаллантоисной оболочке, очагов маллигнизации в культуре ткани.

На рисунке 1 представлены фокусы на хориаллантоисных оболочках, возникшие под действием четырех штаммов вируса саркомы Рауса. Наиболее крупные пятна образовал штамм RSV-B (группа А по Фогту), остальные штаммы RSV-S-R (группа В), RSV-C (группа С) и RSV-RS (группа D) индуцируют на мембране лишь мелкие пятна. На рисунке 2, *а*, *б*, *в* показаны очаги маллигнизации в культуре ткани куриных фибробластов, индуцированные штаммом Бриан (RSV-B) вируса саркомы Рауса.

Для культивирования вируса лимфоматоза (штаммы RPL-12) заражают суточных цыплят, за которыми наблюдают в течение 3—6 месяцев, затем убивают и проводят гистологическое исследование органов. Вирус лимфоматоза размножается в культуре ткани куриных фибробластов, не вызывая цитопатических изменений и в куриных эмбрионах при заражении в желточный мешок.

Положительные результаты были получены при внутривенном заражении 11-дневных куриных эмбрионов плазмой и клеточной суспензией из тканей больных миелобластозом птиц. При дозе $1{,}3\times10^6$ и выше инфекционных единиц вируса у 100% вылупившихся из зараженных яиц цыплят развивается лейкоз, главным образом миелобластоз.

Вируссодержащие миелобласты, выделенные из крови больной птицы, можно длительно культивировать in vitro, при этом вирус миелобластоза переходит в среду. Освобождение вируса из клетки в культуральную жидкость не нарушает жизнедеятельности клетки. Количество жизнеспособных клеток в культуре длительно сохраняется на уровне 95%. Размножение клеток в культуре ткани продолжается неопределенно долго без каких-либо выраженных морфологических изменений. Клетки делятся через каждые $3^1/_2$ дня.

Условием для поддержания культуры миелобластов является очень высокая концентрация фолиевой кислоты в питательной среде. Для приготовления культуры миелобласты отмывают и помещают во флаконы в дозе $2{,}5\times10^7$ на 1 мл среды. Среда состоит из 50% куриной сыворотки (от здоровой курицы) и среды 199, в которой концентрация витаминов В выравнивается до концентрации их в среде Игла, за исключением фолиевой кислоты, содержание которой доводится до 0,4 мг на 1 л окончательной среды, и глюкозы, которая берется в концентрации 0,5%. Суспензию миелобластов в среде разливают по 5 мл в 50-миллилитровые колбы Эрленмейера. Культивируют, постепенно помешивая,

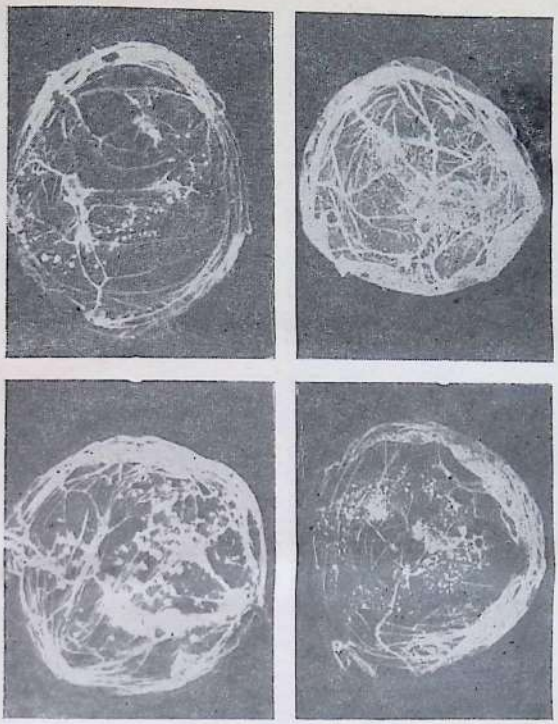


Рис. 1. Поражения хориаллантоисной оболочки куриного эмбриона, вызванные вирусом саркомы Рауса (штамм Брион).

при 37°. Каждый третий день сменяют среду. Для этого клетки осаждают центрифугированием при малой скорости и ресуспендируют в свежей среде. Можно культивировать, добавляя к среде 199 не все витамины группы B_1, а только фолиевую кислоту в концентрации 0,5 мг на 1 л среды. В такой культуре миелобласты практически размножаются неограниченно долго без каких-либо изменений морфологии. Культуральные жидкости в зависимости от титра вируса также вызывают у птиц весь спектр неоплазм, свойственных вирусу миелобластоза (В. А. Парнес, 1966).

Вирусом эритробластоза (вируссодержащий материал костного мозга больных птиц) удается заразить 10—11-суточные куриные эмбрионы, инокулируя материал на хориоаллантоисную оболочку. К 20-му дню инкубации у $^1/_3$ зараженных эмбрионов развивается типичный эритробластоз. Далее можно последовательно пассировать этот вирус на хориоаллантоисной оболочке куриных эмбрионов.

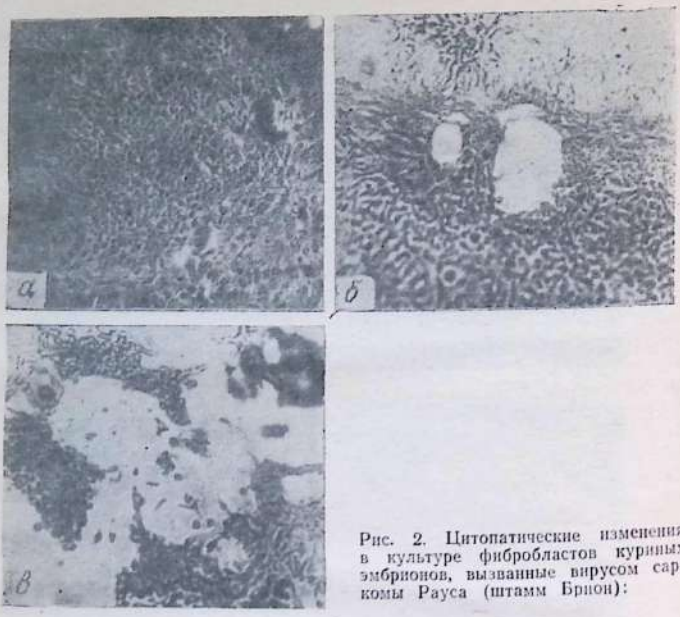


Рис. 2. Цитопатические изменения в культуре фибробластов куриных эмбрионов, вызванные вирусом саркомы Рауса (штамм Бриан):

Вирус эритробластоза также удается культивировать in vitro в культуре нормальных куриных фибробластов, нормального и эритробластического костного мозга. При синтезе вируса эритробластоза складываются иные взаимоотношения между клеткой и вирусом, чем при миелобластозе. Инфицированные эритробласты в культуре ткани относительно быстро изменяются (вакуолизация протоплазмы, скучивание хроматина ядра). С 90-го дня культивирования происходит быстрая гибель клеток (рис. 2).

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Прижизненно диагностировать лейкоз трудно. Общая слабость больных кур, анемия, желтушность или цианоз гребешка, видимых слизистых оболочек — симптомы, свойственные многим болезням. Кроме того, у кур, больных эритробластозом и миелобластозом, бывают периоды ремиссий, характеризующиеся временным отсутствием изменений в циркулирующей крови.

Обычно лейкоз диагностируют на основании вскрытия и гистологических исследований у птицы разных возрастных групп. Методически правильнее вести патоморфологический анализ по птице 1—2 птичников. Главным при этом является вскрытие трупов павшей и тушек вынужденно убитой птицы 6—10-месячного возраста. Петухи заболевают лейкозом в 10—15 раз реже.

Помимо клинических и патологоанатомических данных, лабораторный диагноз на лейкоз кур может быть поставлен на основании: парентерального введения исследуемого материала здоровой птице (биопроба); определение фактора резистентности (RIF), реакции связывания комплемента и реакции нейтрализации.

Работа с вирусами лимфоматоза, миело- и эритробластоза при проведении этих исследований весьма затруднительна ввиду методических трудностей. Гораздо легче работать с вирусом саркомы. Его проще хранить, пассировать и титровать. Поэтому в настоящее время большинство исследователей для решения ряда вопросов, связанных с проблемой лейкоза птиц, используют вирус саркомы Рауса, главным образом штаммы «Бриан» и RSV-RAV-1.

ВЫДЕЛЕНИЕ ВИРУСА

Вирус саркомы Рауса выделяют от цыплят или кур с опухолями. Опухоль извлекают, измельчают и клеточную суспензию вводят в головной мозг или перепонку крыла 1—7-суточным цыплятам. После возникновения опухолей из них готовят бесклеточную 30%-ную суспензию и вводят вновь 1—7-суточным цыплятам.

Вирус лимфоматоза выделяют из крови в стадии виремии (возбудитель циркулирует в крови до одного года, если эмбрион был заражен конгенитально). Кровь вводят суточным цыплятам, полученным из безлейкозного хозяйства, и наблюдают за ними в течение 3—6 месяцев с последующим изучением их органов. Другой путь — заражение культуры ткани куриных фибробластов патологическим материалом с последующими тремя перевивками и исследованиями культуры ткани в РСК и RIF-тесте. Аналогичным образом выделяют и вирусы эритро- и миелобластоза.

Биопроба (парентеральное введение исследуемого материала здоровой птице) — дорогостоящий метод, зависит от чувствительности реципиента, требует от исследователя тщательной подготовки и специальных навыков. Кроме того, из-за длительности он не может быть применен в широкой практике. Например, если для выявления вируса эритробластоза на цыплятах достаточно 9—15 дней, то для выявления вируса саркомы Рауса необходимо 2—3 недели, а вируса миелобластоза — $3^1/_2$—8 недель, вируса лимфоидного лейкоза — от 4 до 11 месяцев. Для грамотной постановки биопробы и правильной интерпретации полученных результатов необходим точный выбор экспериментального объекта.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСА

Определение фактора резистентности (РИФ-проба). Как уже указывалось выше, вирус RIF интерферирует в субкультуре фибробластов куриного эмбриона с вирусом Рауса, пре-

дотвращая его трансформирующее действие. Основанный на этом принципе метод индикации латентных лейкозных вирусов получил название RIF-теста или пробы Рубина. В США данный метод рекомендован для контроля вакцин на отсутствие вируса RIF (возбудителей лимфоматоза, эритробластоза и миелобластоза).

RIF-тест используется для индивидуальной проверки куриных эмбрионов на отсутствие контаминации вирусами лейкоза — саркомной группы. Методически этот тест ставят следующим образом. Из исследуемых эмбрионов готовят культуру фибробластов общепринятым методом. Поддерживающая среда включает: 40% среды 199, 50% среды Игла, 5% триптозофосфатного бульона «Дифко» и сыворотки крупного рогатого скота с добавлением по 100 ЕД/мл стрептомицина и пенициллина.

Клетки выращивают во флаконах Карреля. Делают три последовательные генерации культуры общепринятым методом. Если испытуемый эмбрион инфицирован вирусом лейкоза птиц, то при перевивках идет его накопление в достаточно высоких титрах. Затем третью генерацию монослойной культуры фибробластов заражают вирусом саркомы Рауса* в определенных разведениях. На 10—11-й день в зараженной культуре учитывают очаги трансформации (маллигнизации) при помощи проекционного оптического трихинеллоскопа, специально переоборудованного для подсчета очагов трансформации непосредственно на экране (В. П. Зеленский, 1969). В контрольных пробирках происходит маллигнизация (превращение нормальных клеток в раковые) фибробластов, в то время как в опытах при наличии вируса лейкоза это явление отсутствует вследствие интерференции между вирусом лейкоза птиц и RSV. Если исследуемые эмбрионы не заражены вирусами лейкоза, то приготовленная из них культура фибробластов оказывается в такой же мере, как и контрольная, чувствительной к вирусу саркомы Рауса.

Однако РИФ-проба — метод несовершенный, так как интерференцию можно наблюдать лишь в тех случаях, когда вирус лейкоза антигенно родствен штамму вируса саркомы Рауса, который наносится на культуру ткани. При антигенном различии их РИФ-проба не воспроизводится.

Реакция связывания комплемента (COFAL-тест). В 1964 г. Хьюбнер с сотрудниками установили, что вся группа птичьих вирусов лейкоза, в том числе и вирус саркомы Рауса, обладает комплементфиксирующим антигеном, который легко обнаружить в РСК с сыворотками сирийских хомячков, несущих вирус саркомы

* Для RIF-теста Рубина используют четыре штамма саркомы Рауса — KSV-RAV-1 (подгруппа А), RAV-2-(штамм «Шмидт-Руппин» (подгруппа В); штамм «Карр-Зильбер» (подгруппа С) и штамм «Бриан» стандартный (промежуточная подгруппа А—Б). Штаммы поддерживают пассажами на 7-дневных цыплятах породы белый леггорн. Вируссодержащим материалом для заражения их служит 30%-ный экстракт опухоли цыпленка в среде 199, сохраняемый при минус 40°.

Рауса. При РСК проводят прямую индикацию вирусов лейкоза птиц в куриных, перепелиных, утиных эмбрионах и печени кур.

Невозможно определить, какой из вирусов, вызывающих лейкоз кур, находится в исследуемом материале, однако можно твердо сказать, есть этот возбудитель или его нет.

Вначале хомячковый антиген получают путем инъекции 30%-ной суспензии вируса саркомы Рауса (штаммы «Карр» или «Шмидт-Руппин») под кожу новорожденным сирийским хомячкам (в возрасте 12—24 часа). Через три недели у хомячков появляются опухоли, которые извлекают, готовят из них 10%-ную клеточную суспензию на физиологическом растворе pH 7,0 и вводят ее подкожно взрослым хомякам в объеме 0,2—0,3 мл. Через 30 дней у хомяков возникают прогрессивно растущие опухоли. Однако сыворотку необходимо получать при максимальной величине опухоли, т. е. на 50—60-й день после заражения животных вирусом саркомы Рауса.

Более доступный способ получения сыворотки для РСК предложил Ватанаба (1966). Для этого используют голубей, которым в грудную мышцу инокулируют вирус саркомы Рауса, штамм «Шмидт-Руппин». Через 8—10 дней у зараженной птицы появляются медленно растущие саркомы. Через $1^1/_2$—2 месяца после инокуляции вируса голубей обескровливают.

Постановка реакции. Материалы: 1) испытуемые экстракты клеток или эмбрионов центрифугируют при 3000 об/мин 10 минут; надосадочную жидкость используют в РСК цельной до разведения 1 : 4; 2) положительный антиген — 20%-ный бесклеточный экстракт саркомы Рауса, полученный из опухолей 12—16-дневных куриных, утиных, перепелиных эмбрионов или из печени кур. Экстракт готовят на физиологическом растворе pH 7,2; 3) отрицательный антиген — 20%-ный экстракт из мышцы перепелки или перепелиного эмбриона; 4) стандартная сыворотка хомяка к групповому комплементфиксирующему антигену вирусов группы лейкозов птиц, полученная от хомяков, несущих саркому Рауса (штаммы «Шмидт-Руппин» и «Карр»); сыворотку используют в концентрации, соответствующей 4—8 комплементфиксирующим единицам; 5) нормальная сыворотка хомяков или сыворотка хомяка с опухолью нераусного происхождения (аденовирус, SV-40 и другие) берется в разведении 1 : 10; 6) комплемент (сыворотка) морской свинки; 7) гемолитическая антибаранья сыворотка используется в тройном титре; 8) 3%-ная взвесь эритроцитов барана; 9) физиологический раствор. РСК ставят по общепринятой методике в объеме 0,5 мл (все ингредиенты по 0,1 мл).

Предварительное титрование комплемента в присутствии ингредиентов проводят в день постановки главного опыта (фаза связывания — 1 час при 37°). В главном опыте используют $1^1/_2$—2 точные дозы комплемента. Фазу связывания проводят при 4° в течение ночи. Гемолитическую систему для предварительного и главного опыта готовят из идентичных ингредиентов, смешиваемых за

30 минут до использования. Реакцию учитывают не ранее чем через 30 минут после добавления гемолитической системы. Положительной реакцией считают задержку гемолиза на три креста и выше.

Результаты реакции считали достоверными, если: доза комплемента выбрана правильно; стандартный положительный антиген реагирует с иммунной сывороткой на четыре креста и не реагирует с нормальной сывороткой; нормальный антиген не реагирует с сыворотками; антиген из ткани, заведомо зараженной вирусом саркомы Рауса, реагирует с иммунной, но не с нормальной сывороткой до разведения 1 : 2—1 : 4; антиген из заведомо незараженной ткани не реагирует с сыворотками.

Если антиген из клеток не реагирует с иммунной сывороткой, этот образец считают свободным в отношении вируса лейкоза птиц. Положительная реакция не менее чем на три креста, до разведения антигена 1 : 2, указывает на контаминацию образца. Если испытуемый антиген реагировал на три креста только в неразведенном состоянии, результат считают сомнительным, и поэтому антиген должен быть тестирован повторно. При испытании антигена из контрольных тканевых культур результаты опытов интерпретируются аналогичным образом. Статистическую обработку результатов проводят по Фишеру (1958).

Реакцию нейтрализации можно применять для идентификации выделенного штамма вируса при помощи заведомо позитивных сывороток и обнаружения у птицы специфических антител в РН с заведомо известным вирусом лейкоза (вирус саркомы Рауса).

Если РН применяют для идентификации вируса, необходимо иметь гипериммунные сыворотки против некоторых штаммов вируса саркомы Рауса, а также эритробластоза и миелобластоза. Иммунную сыворотку против вируса саркомы Рауса получают от взрослых кур, желательно петухов, иммунизированных введением в перепонку крыла 0,1 мл 30%-ной суспензии, содержащей вирус саркомы Рауса (подгрупп A, B, C, D на каждую подгруппу по 2—3 петуха). Через 2—3 недели у птицы появляются опухоли. Через 10—12 дней у некоторых петухов опухоли рассасываются. После полного исчезновения сарком необходимо вновь ввести 30%-ную вируссодержащую суспензию в объеме 0,5—1 мл. Через три недели петухов обескровливают. Сыворотки титруют и используют в перекрестной реакции нейтрализации с выделенным вирусом.

Наиболее подходящим антигеном для получения гипериммунной сыворотки против лимфоидного лейкоза является штамм R вируса эритробластоза. Однако сыворотки, полученные на этот штамм R и RPL-12, не способны нейтрализовать вирус миелобластоза.

Для получения антигена вирус эритробластоза (штамм R) размножают в организме 2—3-месячных цыплят, заражая их вируссодержащей плазмой в дозе по 1 мл. От заболевших эритробластозом цыплят получают цитрированную плазму, 1 мл которой содер-

жит 10^9—10^{10} вирионов. Вирус сорбируют на эритроцитах кролика.

Получение сыворотки против лимфоидного лейкоза и эритробластоза*. Кроликов породы шеншилла иммунизируют 2—4 месяца элюатом с эритроцитов в дозе 5—10 мл с интервалом в 6 дней и 2—3 интервалами по 10—15 дней между курсами иммунизации (В. П. Зеленский, 1969). На седьмой день после окончания иммунизации кроликов обескровливают, получают сыворотку, которую истощают тканью здоровых кур.

Во втором случае при помощи этой же реакции можно точно и в течение короткого времени (через 2—3 недели) определить наличие или отсутствие возбудителя лейкоза в том или ином хозяйстве. Установлено, что наиболее широко в природе циркулирует возбудитель лейкоза (лимфоматоза), антигенно родственный представителю серогруппы А штамму «Бриан». Степень зараженности хозяйств определяют по наличию антител к этому штамму и проценту положительных сывороток. Исследования, проведенные Е. С. Ворониным и др. (1968) в пяти хозяйствах Московской и Саратовской областей, показали, что около 50% образцов исследованных сывороток содержат в значительном титре антитела к штамму «Бриан».

Постановка реакции. Иммунные куриные сыворотки исследуют в разведении 1 : 10, остальные сыворотки, кроме сыворотки хомяка (ее использовали в РСК в концентрации, соответствующей 4—8 комплементфиксирующим единицам),— в разведении 1 : 2; 0,3 мл указанных разведений сывороток смешивают с 0,3 мл исследованных десятикратных разведений вируса. В контрольные смеси вместе с иммунной сывороткой включают физиологический раствор. Сыворотки разводят также на физиологическом растворе, pH 7,0—7,2. После $1^1/_2$-часовой инкубации при 18—20° смеси по 0,1 мл вводят цыплятам 2—4-недельного возраста в перепонку крыла (по 4—5 крыльев на смесь). За цыплятами наблюдают в течение трех недель. Полученные результаты сравнивают с результатами контрольного титрования соответствующего штамма вируса саркомы Рауса. Титр вируса в смеси с сывороткой и в контроле вычисляют по методу Рида и Менча и выражают в $ОД_{50}$ (50%-ная онкогенная доза).

Положительными считают сыворотки, имеющие индекс нейтрализации

$$\frac{ОД_{50}\ (\text{контроль})}{ОД_{50}\ (\text{испытуемые сыворотки})} \geqslant 32\,(\lg 1{,}5)\,.$$

* Сотрудниками Государственного контрольного института им. Тарасевича предложен другой способ получения сыворотки против всех известных серотипов возбудителей лейкоза птиц. Для этого на бойне берут кровь от 1000 и более старых кур ($1^1/_2$—2-летнего возраста). Полученную сыворотку титруют в отношении штаммов вируса саркомы Рауса всех четырех серогрупп, разливают по 0,5 мл в ампулы и высушивают. Такая сыворотка, полученная от естественно иммунных кур, служит в качестве стандартной.

Реакцию нейтрализации также ставят на 11-дневных куриных эмбрионах аналогичным методом. Контрольные и подопытные эмбрионы вскрывают на 7—8-й день после заражения. Положительными считают сыворотки, имеющие индекс нейтрализации

$$\frac{\text{ПОЕ (контроль)}}{\text{ПОЕ (испытуемая сыворотка)}} \geqslant 3\ (\lg 0{,}5).$$

Реакция непрямой гемагглютинации основана на том, что антигены, присутствующие в солевых экстрактах неоплазм лейкозной печени кур, сорбируются оболочкой эритроцитов петухов-доноров. Сенсибилизированные эритроциты соединяют с антивирусной глобулиновой фракцией сыворотки. Реакцию ставят капельным методом на стекле. Данная реакция еще окончательно не изучена и не рекомендована в качестве лабораторного метода.

Иммунофлуоресценция. О достоинствах метода судить пока трудно, так как немногочисленные зарубежные сообщения часто неполны и противоречивы. По данным В. А. Парнес и Д. М. Левиной (1966) и И. Ф. Муртазина (1967), метод флуоресцирующих антител можно с успехом использовать в экспериментальной работе для выявления вируса миелобластоза в гетерологических и гомологических клеточных системах. Преимущество метода иммунофлуоресценции перед COFAL и RIF-тестами состоит в том, что он позволяет выявить не только наличие антигена, но и определить его локализацию в клетках. Меченые сыворотки против подгрупп A, B, C, D смешивают и используют в прямом методе. Для этого исследуемый материал наносят на культуру ткани куриных фибробластов (пробирки со стеклышками) и культивируют при 38° в течение 7—8 дней. Затем стеклышки извлекают, красят поливалентной сывороткой и просматривают под микроскопом МЛ-2. Если есть вирус, происходит свечение фибробластов.

Е. С. Воронин (1969) предложил новый метод индикации вирусов группы лейкозов птиц. Он установил, что штаммы вируса саркомы Рауса группы В при инокуляции японским перепелкам индуцируют опухоли, не содержащие активный вирус. Если на культуру клеток из таких опухолей нанести заведомо инфицированный вирусами лейкоза материал, сделать две перевивки ткани с последующим введением цыплятам бесклеточной суспензии, то у последних образуются саркомы, содержащие активный вирус. Вероятно, в клетках перепелки ввиду их генетической резистентности вирус — помощник вируса саркомы Рауса не способен размножаться, и «основной» возбудитель саркомы Рауса находится в неполноценной форме (лишен протеиновой оболочки). Добавление к «безвирусным» клеткам возбудителей лейкоза (любой вирус лейкоза может играть роль вируса-помощника) способствует «одеванию» вирусной РНК в оболочку и репликации полноценного вируса саркомы Рауса. Около 50% образцов аллантоисных жидкостей, которые были получены от обычных 12—14-дневных куриных эмбрионов и исследованы этим методом, содержали возбу-

дителей лейкоза птиц. Полученные данные подтверждены в COFAL-тесте, который был проведен параллельно с этими опытами. Предложенный метод нуждается в дальнейшем изучении.

Из описанных выше современных методов индикации вирусов лейкоза птиц наиболее прост и приемлем в условиях бактериологической ветеринарной лаборатории РН вируса саркомы Рауса (штамм «Бриан») с испытуемыми сыворотками кур и РСК. Применяя эти методы, можно обследовать птицеводческие хозяйства на распространенность вирусов группы лейкозов птиц и подбирать кур, свободных от этих возбудителей.

Как показали исследования Е. С. Воронина и сотр. (1971), в сыворотках кур чаще регистрировались антитела к штамму RSV-RAV-1 (подгруппа А), реже — к штаммам «Шмидт-Руппин» (подгруппа В) и «Карр» (подгруппа С). В сыворотках цесарок и диких голубей установлены антитела лишь к вирусам подгруппы А. Авторы показали, что каждый четвертый куриный эмбрион и свыше 30% образцов печени кур содержат вирус лейкоза. Все исследованные перепелиные и утиные эмбрионы не были контаминированы опухолеродными вирусами птиц. Это свидетельствует о широкой циркуляции всех известных серотипов вирусов лейкоза птиц. Наиболее распространены вирусы подгруппы А.

Штамм вируса саркомы Рауса RSV-RAV-1 антигенно родствен классическому вирусу лимфоидного лейкоза. Наличие антител к этому штамму в сыворотках диких голубей свидетельствует о циркуляции среди этого вида птиц вируса лимфоидного лейкоза.

При прямой индикации вирусов лейкоза птиц в куриных эмбрионах и печени кур при помощи РСК старые куры оказались свободны от этих возбудителей. Испытание сывороток от этих кур в РН показало, что свыше 70% их были высокоактивны к штамму RSV-RAV-1. Вероятно, отсутствие контаминации вирусами лейкоза среди этих кур можно объяснить наличием у них иммунитета или их генетической резистентностью (Е. С. Воронин и сотр., 1971).

Большое значение в системе мер борьбы с лейкозом имеет использование переярых кур-несушек для получения инкубационного яйца. По данным ряда зарубежных исследователей (Зигман, 1966; Карр, 1953, и др.), низкий процент лейкоза в птицеводческих хозяйствах обусловлен разведением потомства из яиц кур-несушек 2-летнего возраста и старше.

Создать безлейкозные фермы можно импортом кур линии 15 породы белый леггорн и подбором птицы отечественных пород. Можно использовать кур породы московская. При отборе кур для безлейкозных ферм необходимо руководствоваться следующими методическими тестами:

1) оценка чувствительности хорионаллантоисных оболочек 10—12-дневных куриных эмбрионов, полученных от одной и той же курицы к вирусу саркомы Рауса (штамму «Бриан» или RSV-RAV-1);

2) определение наличия нейтрализующих антител в сыворотке крови кур к вирусу саркомы Рауса (штамму «Бриан» или RSV-RAV-1);

3) обнаружение комплементсвязывающего антигена вирусов групп лейкозов птиц в эмбрионах и эмбриональной ткани куриных фибробластов.

По чувствительности или резистентности куриных эмбрионов к вирусу саркомы Рауса можно судить о восприимчивости той или иной породы кур к лейкозу птиц вообще, поэтому использование первого теста необходимо.

БОЛЕЗНЬ МАРЕКА
(NEURITIS IN CHICKEN)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Болезнь Марека (энзоотический паралич кур, нейролимфоматоз) — инфекционная болезнь, преимущественно кур. У больных кур отмечают параличи, сероватое окрашивание радужной оболочки, деформацию зрачка и образование опухолей во внутренних органах. В зависимости от преимущественного поражения тканей и органов принято условно выделять три формы болезни Марека: невральную, окулярную (глазную) и висцеральную. Возникают они отдельно, но часто диагностируются в различном сочетании друг с другом у одной и той же больной курицы (И. И. Касьяненко, В. П. Иванов, 1969).

В естественных условиях болеют куры и индейки. Имеются данные о заболеваемости фазанов, уток, лебедей и куропаток (Биггс, 1966).

До 1935 г. болезнь Марека считали самостоятельной нозологической формой. С 1942 г. американские исследователи объединили лейкоз, болезнь Марека, остеопетроз, миелоцитоз, фибросаркоматоз и эндотелиоз в группу лейкозного комплекса птиц. К собирательному понятию лимфоматоз они отнесли лимфоидный лейкоз, все формы болезни Марека (невральную, окулярную и висцеральную) и остеопетроз.

Экономический ущерб, причиняемый этой инфекцией промышленному птицеводству, значительный. Известны случаи, когда смертность в неблагополучном стаде достигала 50%.

Источником инфекции являются больные птицы. Экспериментальная инфекция удается путем внутрибрюшинного, внутримышечного, внутривенного и подкожного методов заражения цыплят суточного возраста. Эффективность заражения и степень развития патологического процесса зависят от возраста, пола и генетического характера (линии, породы) заражаемой птицы, а также от наличия «пассивного» иммунитета, передаваемого трансовариально с желтком. К заражению наиболее восприимчивы цыплята 2-недельного возраста, причем курочки более чувствительны, чем петушки. Выделение вируса экспериментально зараженной птицей происходит через 7—21 день после инфицирования.

У птицы, имеющей клинические признаки болезни, вирус постоянно обнаруживается в крови. Из организма он выделяется через органы дыхания и пищеварения, а атакже через перьевые фолликулы. Аэрогенный путь распространения инфекции является основным. Клеточно-связанный вирус, выделяемый в окружающую среду до 8 месяцев, сохраняет свою инфицирующую активность. Помет и подстилка, на которой содержались больные цыплята, остаются инфицированными до четырех месяцев. Являясь клеточно-связанным, вирус болезни Марека сохраняет свою биологическую активность при условии структурной целостности вируссодержащих клеток.

Вирусоносительство наблюдается в период инкубации до клинического проявления болезни, а также в течение 16—24 месяцев после переболевания, т. е. практически пожизненно, причем вакцинация птицы живыми ослабленными вакцинами не предотвращает носительства вирулентного вируса клинически здоровой птицей.

Невральная форма характеризуется двигательными расстройствами: беспорядочным перемещением больных, резким поднятием и неуверенным опусканием конечностей, шатающейся походкой и хромотой при быстром беге. В даль-

нейшем хромота усиливается, возникают парезы и параличи органов, нервы которых подвергаются поражению. При окулярной (глазной) форме болезни Марека (серый глаз, стеклянный глаз, рыбий глаз, слепота, иритис, эпидемическая слепота) происходит расстройство зрения, вплоть до полной его потери. Поражения глаз проявляются изменением цвета радужной оболочки и формы зрачка. В норме глаза взрослых кур имеют оранжево-желтую или оранжево-карюю радужную оболочку и круглый зрачок. У цыплят радужная оболочка окрашена в темно-серо-голубоватый цвет. При окулярной форме болезни Марека радужная оболочка приобретает серовато-голубую или беловато-серую окраску. Изменение цвета радужной оболочки начинается с образования в ней вокруг зрачка беловато-серых пятен или концентрических участков различной формы и величины, которые в дальнейшем сливаются между собой и распространяются по всей ее поверхности, в результате чего возникает «сероглазие» (пораженный глаз приобретает стеклянный вид). Деформируется зрачок: из круглого он становится звездчатым, многоугольным, грушевидным или щелевидным, постепенно уменьшается в размере, а нередко исчезает совсем. В передней камере глаза при осложнении процесса скапливается мутный экссудат, который приводит к выпуклости роговой оболочки подобно глаукоме. Иногда в начальной стадии развития указанных изменений можно наблюдать кратковременное расширение зрачка, слезотечение, постепенное накопление фибринозного экссудата на покрасневшей и набухшей конъюнктиве.

Окулярная форма болезни Марека чаще протекает хронически. Вначале поражается один глаз, а затем второй. Реже в патологический процесс вовлекаются одновременно оба глаза. Иногда у больной птицы наблюдаются поносы, нервные расстройства, угнетенное состояние, шаткость походки, скручивание пальцев, тремор головы и ног. Постепенно куры худеют, яйценоскость снижается.

При висцеральной (лимфо-грануломатозной) форме клинические признаки выражены неясно. В зависимости от степени поражения внутренних органов отмечается анемия или цианоз, иногда желтушность гребешка, бородок, сережек и видимых слизистых оболочек. Больная птица теряет аппетит, худеет, нередко наблюдаются поносы. При значительном поражении брыжейки и печени развивается водянка грудобрюшной полости, область живота при этом несколько отвисает, количество эритроцитов снижается до 2,1 млн., а гемоглобин до 7,4%.

В неблагополучных по данной болезни хозяйствах указанные формы болезни Марека встречаются в различной комбинации; в разном сочетании выявляются поражения в нервной системе, глазах и во внутренних органах.

Патологоанатомические изменения при невральной форме болезни Марека разнообразны. Пораженные участки в головном и спинном мозге отечны и размягчены, гиперемированы, с кровоизлияниями, иногда желтовато-серого цвета. Яйцевидное студневидное тело в поясничном утолщении спинного мозга превращается в бесформенную, вязкую массу. Специфические изменения во внутренних органах характеризуются пролиферативно-воспалительными процессами — образованием в том или ином органе инфильтратов или опухолевидных разрастаний.

При окулярной форме болезни слезная железа не поражается. Если болезнь осложняется конъюнктивитом, конъюнктива гиперемирована, с кровоизлияниями, отечна, железистый эпителий дегенерирован. Наблюдается фибринозный конъюнктивит. Патогистологические изменения выявляются в головном мозге непосредственно в зрительных буграх (гиперемия сосудов, кровоизлияния, периваскулярные и перицеллюлярные отеки, сморщивания ганглиозных клеток, пролиферация глиозных и лимфоидных клеток).

Патологоанатомические изменения при висцеральной форме болезни в общих чертах аналогичны поражениям, наблюдаемым при лимфоидном лейкозе. В процесс вовлекается один или несколько органов. Чаще поражается яичник, яйцевод (83%), а у петухов — семенники. Макроскопически яичник диффузно увеличен в объеме, неправильной формы, плотной консистенции, беловато-серого цвета. Иногда в нем выявляются аналогичного вида опухолеподобные узлы разной величины. Кроме органов половой системы, поражаются селезенка, почки, сердце, легкие, печень и желудочно-кишечный тракт.

Таким образом, поражения при различных формах болезни Марека характеризуются признаками, типичными для воспалительной реакции. В развитии ее можно выделить три фазы (И. И. Касьяненко, В. П. Иванов, 1969). В первой фазе преобладают сосудистые расстройства, дистрофические и некротические изменения в паренхиматозных элементах органов и нервных волокнах. Затем возникает пролиферация клеток ретикуло-эндотелиальной группы. Во второй фазе воспалительной реакции наблюдается выраженная лимфоидная инфильтрация стромы и дистрофированной паренхимы. Третья фаза характеризуется разрастанием соединительной ткани, которая замещает атрофированные, дегенерированные и омертвевшие паренхиматозные элементы.

Выше описаны три клинические формы болезни Марека: невральная, окулярная (глазная) и висцеральная. В настоящее время принята несколько иная форма классификации этой инфекции: классическая и острая. При классической форме инкубационный период продолжается от 14 до 90 дней; клинические признаки болезни относительно постоянны и проявляются главным образом поражением периферической и центральной нервной системы. Поскольку при болезни Марека может поражаться любой нерв, то и симптомы болезни могут быть разнообразными: атаксия; парезы; паралич ног, крыльев, шеи; сужение зрачка и изменение цвета радужной оболочки («сероглазие»), результатом чего является частичная или полная потеря зрения. Гибель больных цыплят при классической форме происходит, как правило, в 3—5-месячном и реже в более старшем возрасте. Однако при этих формах болезни не всегда птица погибает быстро. Могут быть периоды временного улучшения. Летальность среди кур колеблется от единичных случаев до 30%, но чаще она бывает в пределах 2—5%.

Острая форма болезни Марека наблюдается у птиц преимущественно в возрасте 4—22 недель. Она характеризуется внезапным проявлением, очень быстрым течением, высокой заболеваемостью, смертностью птицы. В начальной стадии болезни появляются массовые, быстро проходящие нервные явления, так называемые «транзитные параличи». За 5—7 дней с признаками нервных явлений могут переболеть почти все цыплята неблагополучного стада.

ВИРУС

В 1963 г. Биггс и Пине выделили вирус нейролимфоматоза (болезни Марека) — HPRS (штамм B-14), не имеющий отношения к вирусам лейкозов птиц. В последующие годы были получены более вирулентные штаммы вирусов HPRS (штаммы 16, 18, 19), вызывающие исключительно болезнь Марека.

В 1967 г. Гордон, Биггс и Черчилл сообщили, что возбудитель болезни Марека относится к группе В вирусов герпеса.

В последние годы выделены и изучены многие штаммы вируса как класси-, ческой (HPRS-B13,14 NL-11; GF, HPRS-B17, Cal-1), так и острой (JM, HPRS-B16, 18, 19) форм болезни.

Вирус болезни Марека ДНК-содержащий, размер его 90—100 ммк, капсид вириона содержит 162 капсомера, в составе его выявлено несколько ядерных и цитоплазматических антигенов. Отдельные штаммы возбудителя различаются по способности образовывать бляшки разной морфологии и величины, активности репродукции в культур[illegible] и синтеза внутри клеточного и свободного инфекционного вируса. П[illegible] бляшек штаммы дифференцируют по вирулентности, которая в[illegible]оких пределах. В последние годы некоторым исследователям [illegible]ть вирус, свободный от клетки.

Локализация [illegible] Вирус болезни Марека обнаружен в цельной крови, плазм[illegible]нях, пораженных нервах и экскрементах больной птицы. В[illegible] он находится в трех состояниях: в тесной ассоциации с кле[illegible]гками крови и другими клетками организма, когда не[illegible]зрелого вируса. В клетках опухоли и нервах, когда [illegible]м вируса и могут быть найдены отдельные ви[illegible]люоресцентный антиген, вирус, однако, также н[illegible]с клетками. И наконец, в перьевых фолликулах инфи[illegible]..., так как вирус размножается в эпи-

телиальных клетках герминативного слоя, созревает и выделяется в виде свободных вирионов. В этом случае вирус формирует внутриядерные включения, выходит в цитоплазму, образует там также включения и, наконец, попадает в экстрацеллюлярное пространство. В клеточной культуре вирус проходит неполный цикл репликации, когда он накапливается только в ядре и редко выходит в цитоплазму (Е. И. Скалинский, 1971).

Устойчивость вируса к физико-химическим воздействиям не изучена. Известно, что вирус инактивируется при многократном замораживании и оттаивании, а также при 37° в течение 48 часов.

Культивирование. Вирус размножается с развитием цитопатических изменений в культурах клеток почек кур и нерегулярно в фибробластах эмбрионов уток. Штаммы JM в культуре клеток почек цыплят на 4—5-й день вызывают появление очагов круглых клеток, которые затем увеличиваются в размерах.

Для получения максимального числа очагов почечная ткань должна контактировать с вируссодержащими клетками опухоли не менее 48 часов, а с зараженными культуральными клетками — не менее 24 часов. Инфекционный процесс в ткани развивается при 32—41°; очаги дегенерации появляются только при температуре 35—40°. Распространение вируса идет из клеток в клетку, минуя среду (Калнек и Мэдин, 1969). Наибольшей патогенностью обладает патологический материал, содержащий клетки.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагноз на болезнь Марека ставят на основании симптомов болезни, эпизоотологических данных, патологоанатомических и гистологических изменений и результатов вирусологических исследований. Характерными клиническими симптомами являются парезы и параличи ног, крыльев, хвоста, шеи и зоба, нарушения функции желудочно-кишечного тракта, потеря в весе, прекращение яйцекладки, поражение глаз, гибель от истощения.

Гематологическим, гистологическим и цитологическим методами исследования установлены отличительные особенности болезни Марека от лимфоидного лейкоза. По данным И. И. Касьяненко и В. П. Иванова (1969), при всех трех формах болезни Марека (невральный, окулярный, висцеральный) обнаружены однотипные морфологические изменения, характеризующиеся воспалением, которое имеет вышеописанные три фазы развития.

Для первичного выделения вируса из патологического материала предпочтительнее использовать культуру клеток почки или фибробластов куриных эмбрионов. Для подтверждения болезни рекомендуется проводить пробу с культуральным вирусом на суточных цыплятах или 4-дневных куриных эмбрионах.

Ретроспективную и экспресс-диагностику болезни Марека проводят при помощи реакций непрямой гемагглютинации, диффузионной преципитации в агаровом геле и иммунофлуоресценции. Они позволяют проводить индикацию возбудителя в нативном и культуральном материале.

Болезнь Марека необходимо отличать от лимфоидного лейкоза, псевдочумы птиц, инфекционного энцефаломиелита (эпизоотического тремора) птиц, стафилококкоза, токсоплазмоза, пастереллеза, листериоза, туберкулеза, ботулизма, инфекционного ларин-

готрахеита, пуллороза, авитаминозов В, Е, D и других болезней. Это удается сделать, применяя методы, относящиеся к диагностике каждой из указанных болезней.

Наиболее затруднительна дифференциальная диагностика острой формы болезни Марека и лимфоидного лейкоза. В этих случаях следует руководствоваться следующими дифференциальными признаками. При острой форме болезни Марека поражается главным образом молодая птица, тогда как от лимфоидного лейкоза чаще погибает птица в возрасте 6—12 месяцев. Болезнь Марека высококонтагиозна, характеризуется нервными явлениями. Гибель и вынужденный убой птицы достигает 10—30%, а иногда 50—80%. Лимфоидный лейкоз малоконтагиозен, протекает хронически и бессимптомно. Падеж среди больной птицы обычно не превышает 3—5% от общего поголовья птицы неблагополучного стада. При острой форме болезни Марека лимфоидные опухоли внешне сходны с таковыми при лимфоидном лейкозе. Однако в первом случае обычно поражаются все внутренние органы и поперечнополосатая мускулатура и кожа (перьевые фолликулы). При лейкозе нет поражений периферической нервной системы и кожи.

При гистологическом исследовании характерным для болезни Марека является наличие диффузных или очаговых клеточных инфильтратов в паренхиматозных органах, центральной и периферической нервной системе, поперечнополосатой мускулатуре и коже. При лимфоидном лейкозе в клеточных инфильтратах преобладают лимфобласты, обнаруживается небольшое количество больших и малых лимфоцитов, образующих скопления.

Наконец, при дифференциации болезни Марека и лейкоза необходимо учитывать характеристику возбудителей, относящихся к разным таксономическим группам и имеющих различные биологические свойства.

Иммунитет. «Пассивные», трансовариальные антитела у цыплят, полученных от иммунных кур, выявляются в крови цыплят в течение 10—20 дней их жизни (Банковский и сотр., 1970). Считают, что трансовариальные антитела могут задерживать первоначальное проявление болезни и отрицательно влиять на исход экспериментального заражения цыплят вирусом.

О значении поствакцинальных антител в сыворотке привитой птицы мнения расходятся. Так, Лугинбул (1970) считает, что гуморальные антитела предупреждают развитие болезни, тогда как Банковский и сотр. (1970) не придают им существенной роли в развитии процесса и не находят прямой связи между наличием их в крови больной птицы и циркуляцией вируса, поэтому они допускают наличие еще каких-то других иммунологических механизмов защиты цыплят от вторичного воздействия вирулентного вируса, кроме гуморальных антител.

Специфическая профилактика. Болезнь Марека неизлечима. Меры борьбы и профилактики ее основаны на строгом соблюдении ветеринарно-санитарных и зоогигиенических правил по содержанию птицы, специфической профилактики и использовании линий птицы, резистентных к заболеванию.

Специфическая профилактика осуществляется штаммом HPRS-B16, аттенуированным в культуре клеток почки куриных эмбрионов, или полевым ослабленным вирусом, изолированным от индеек.

Перспективно выведение тест-линий, резистентных к болезни Марека.

ОСПА ПТИЦ
(VARIOLA AVIUM)

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О БОЛЕЗНИ

Оспа птиц (типун, ложно-перепончатая ангина, эпизоотический дифтерит, кожная бугорчатка, крупп, заразный моллюск птиц и др.) — инфекционная контагиозная болезнь, проявляющаяся в двух клинических формах: оспенной (кожная) и дифтеритической с поражением слизистой оболочки ротовой полости, гортани и глаз. Не редко отмечают смешанную форму болезни. Значительно реже оспа протекает в чисто септицемической и в так называемой «стертой» формах. При последней обычно нет характерных поражений, но птица постепенно худеет и гибнет.

К оспе восприимчивы птицы подотряда собственно куриных, отряда голубиных, воробьиных, отряда попугаевых, а также птицы отряда дневных хищников. Противоречивы данные о восприимчивости к оспе птиц, уток и гусей. Более восприимчивы к оспе птицы декоративных пород. Патогенность вируса оспы птиц для млекопитающих в естественных условиях большинством исследователей отрицается. Описаны отдельные случаи заражения вирулентными штаммами вируса оспы кур, подсвинков, телят, кроликов.

Болезнь встречается повсеместно во все времена года, но чаще весной и осенью. Тяжелее болеют молодняк, за исключением цыплят раннего возраста.

Распространена оспа повсеместно.

Источником инфекции служат больные птицы. Переносчиками вируса могут быть мухи-жигалки, комары, персидские клещи, клопы, москиты и др.

Инкубационный период продолжается 15—20 дней, при экспериментальном заражении — 10—14 дней. Общее состояние больной птицы ухудшается, аппетит исчезает, появляется вялость; у кур-несушек резко снижается яйценоскость. В дальнейшем на коже гребня, бородок, углов рта, век, иногда на оперенных частях головы, шеи, затылка, живота, конечностей, окружности клоаки, появляются бледно-желтоватые пятнышки. Вскоре оспинки покрываются желто-серым или красно-бурым кровянистым струпом, становятся очерченными и твердыми. Рядом расположенные оспины соединяются друг с другом, образуя небольшие бугры — бородавки. Процесс высыхания и образования струпа длится 2—3 недели. Больные куры часто склевывают друг у друга оспинки, способствуя распространению инфекции.

Дифтеритическая форма проявляется поражением слизистых оболочек ротовой полости, подглазничной ямки и носовой полости. На слизистой оболочке ротовой полости вначале возникают мелкие, ясно очерченные округлые желтовато-белые возвышающиеся пятна величиной от чечевицы до гривенника. Затем пятна, разрастаясь, сливаются и превращаются в ложные перепонки — мягкие, иногда кашицеобразные (особенно у голубей), легко снимающиеся, или сухие плотные творожистые, трудно снимающиеся. Дифтеритические пленки появляются главным образом под языком или по краям его, на щеках, в углах рта, вдоль небной щели, в зеве, окружности гортани и даже трахее. Для пленок оспенного характера типично глубокое врастание их в слизистую оболочку.

Гортань поражается наиболее часто. Дыхание сильно затруднено, больные птицы вытягивают шею, дышат с открытым клювом. Прием пищи затруднен, рот часто открыт. При распространении дифтеритического процесса на носовую полость появляется насморк. Из ноздрей и вытекает серозная или слизистая, впо-

Рис. 1. Оспенные поражения лицевой части головы и гребня.

Рис. 2. Поражение глаз при оспе птиц.

следствии гнойная жидкость грязно-желтого цвета, которая, подсыхая, заклеивает носовые ходы. При поражении носоглотки в процесс вовлекаются слезный канал и подглазничная ямка. Последняя заполняется воспалительным экссудатом и выпячивается под глазом в виде горячей болезненной припухлости плотной консистенции величиной с лесной и даже волошский орех.

Часто отмечается дифтеритическое поражение глаз. Появляется светобоязнь, слезотечение, покраснение и отечность век. Слизисто-гнойный экссудат высыхает у краев век и склеивает их. При искусственном раскрывании глазной щели из нее вытекает гнойно-творожистое отделяемое, а в более поздних стадиях процесса обнаруживается засохший беловатый гной. Чаще поражаются оба глаза, так что иногда вместо глаз выпячиваются два шара («совиная голова»). Воспаление может распространиться на склеру и роговицу (рис. 1, 2).

Течение болезни преимущественно хроническое. Оспа, протекающая без осложнений, заканчивается в течение 5—6 недель. Кожная форма чаще протекает доброкачественно. Нередко отмечают стертые формы оспы. Переболевшие куры часто делаются кахектичными, многие из них остаются слепыми на один или оба глаза. Летальность среди взрослых кур достигает 10—20, среди молодняка, особенно в холодное время года, 50—70%. Прогноз при дифтеритической форме в общем неблагоприятный.

При кожной форме оспы обычно обнаруживают бородавчатые образования, покрытые бурым кровянистым струпом, чаще на гребне, бородках, сережках, у основания клюва, на щеках, иногда на коже по всему туловищу.

Дифтеритическая форма оспы характеризуется крупозным и дифтеритическим воспалением слизистых оболочек ротовой полости, глотки, носа и придаточных полостей его, гортани, трахеи, бронхов и иногда кишечника.

ВИРУС

Оспу птиц вызы[вают] ДНК-содержащих вируса: вирус оспы кур, ви[рион] канареек. Размеры вирионов оспы кур в отпеч[атках] голубей — 480×420 ммк, канареек — 300×180—14[0] ммк. Представляют собой кирпичеобразные с округленными кра[ями] (рис. 3, в, г).

Устойчивость к [физическим воздействиям. Вирус, выделенный из клет[ок] обладает стоек к действию физических и химических факторов. На[ходясь] в струпах тканей, сохраняет жизнеспособность сравнительно долго[: оспенные корочки при минус 15°] содержат активный вирус [в те]чение; при 0° — до 1½ лет; при 22° —

около месяца, при 37° — около 8 дней; при 60° — до 3 часов. В лиофилизированном виде при хранении под вакуумом оспенный материал вирулентен до 8 лет; 1%-ный раствор едкой щелочи обезвреживает вирус в течение 5 минут, 1—2%-ный раствор фенола — за 1½ часа, солнечные лучи — за 7 дней. Как и другие вирусы группы оспы, возбудители оспы птиц чувствительны к 20%-ному раствору эфира, хлороформа и кислой среде (pH 3,0—3,6), но в отличие от некоторых других вирусов переносят нагревание в воде в течение 30 минут при 50°.

Хранение и консервирование вируссодержащего материала. Вируссодержащие оспенные корочки можно хранить в замороженном виде при минус 15—20° в течение 2 лет и более, в 50%-ном растворе глицерина — при 4—6° в течение 8—10 месяцев. Вируссодержащие хориоаллантоисные мембраны лучше сохранять при температуре 0° в течение 3 месяцев, а в смеси буфера с глицерином до 1½ лет.

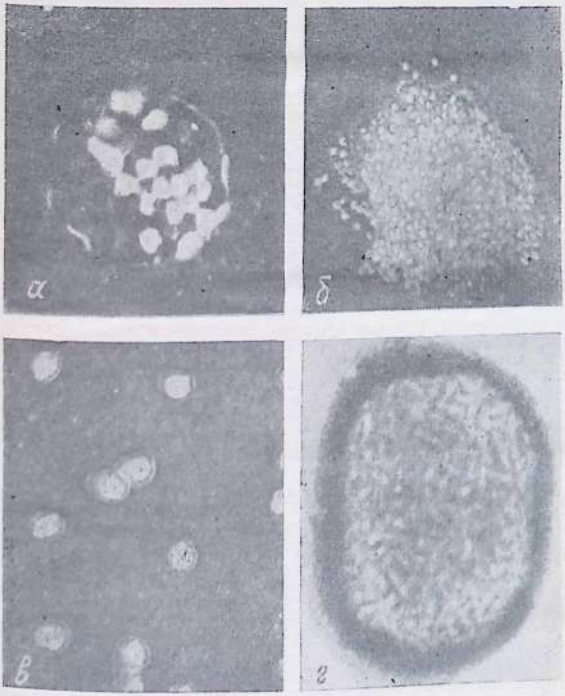


Рис. 3. Электроннограммы вариантов оспы кур:
а — выделенное из пораженной эпителиальной клетки пузырьковидное включение; *б* — включение типа тельца Боллингера со множеством вариантов; *в* — зрелые вирионы; *г* — поверхность вириона имеет трубчатые полые филаменты (по Е. И. Скалинскому, Л. С. Агеевой) (× 25 000).

Локализация в организме. Оспенный процесс носит генерализованный характер. В экспериментальных условиях вирус обнаруживается в крови, печени, почках, яичниках, головном мозге и других органах. Однако наиболее часто поражаются лицевая часть головы и слизистая оболочка ротовой полости и гортани.

Разновидности возбудителя оспы птиц. Большинство выделяемых штаммов вируса оспы кур патогенны для кур и непатогенны для голубей, канареек, чижей, коноплянок, воробьев, скворцов и горных дроздов. У голубей некоторые штаммы вируса оспы кур могут вызывать оспенный фолликулит обычно без дифтеритических поражений. После заражения голубей вирусом оспы кур и, наоборот, кур вирусом оспы голубей развитие включений сопровождается неспецифической клеточной лимфоцитарной и псевдоэозинофильной инфильтрацией кожи.

Вирус оспы голубей инфекционен для голубей и ворон, экспериментально прививается курам и индейкам с последующим образованием у них некоторой устойчивости к вирусам оспы голубей и кур. Гуси и утки невосприимчивы к обеим разновидностям оспы птиц.

Вирус оспы канареек инфекционен для канареек, воробьев, зябликов, рисовых вьюрков, кур и голубей. После заражения воробьев в грудь и лапку вирусом оспы канареек они через 10 дней обычно погибают. После заражения вирусом оспы канареек у кур развивается фолликулит, но они обычно выздоравливают и иммунитета против оспы кур не приобретают. После внутрикожного заражения голубей вирусом оспы канареек у них развивается фолликулит и отечность кожи, но через 2—3 недели голуби выздоравливают.

В природе встречаются не только моно-, но и би- и трипатогенные штаммы. Имеются сообщения, что при пассировании возбудителя оспы кур на индейках вирус изменяет свои свойства. Такие штаммы вируса легко прививаются голубям и после нескольких пассажей через них ослабляют свою вирулентность для кур и индеек.

Самым широким спектром патогенности при экспериментальном заражении обладает вирус оспавакцины, затем вирусы оспы канареек, кур и голубей.

Антигенные свойства. Установлена идентичность антигена у возбудителей оспы птиц, миксоматоза кроликов, эктромелии и оспы коров. Общий оспенный нуклеопротеидный антиген локализуется во включениях типа В и не содержится во включениях типа А.

Гемагглютинирующие свойства. Вирусы оспы птиц обладают гемагглютинирующими свойствами. Помимо того, они имеют термостабильные и термолабильные гемагглютинины, которые агглютинируются специфической антисывороткой.

Культивирование. Поддерживать и пассировать вирусы оспы птиц можно на восприимчивых к ним птицах, куриных эмбрионах и культурах клеток. Вирусом оспы кур удается легко вызвать специфический оспенный процесс на гребне, бородах, голени (фолликулит). Вирусом оспы голубей аналогичный оспенный процесс воспроизводится у голубей.

В настоящее время в большинстве стран вирусы оспы кур и голубей поддерживаются периодическими пассажами на куриных эмбрионах при заражении последних на хориоаллантоисную оболочку. Через 3—6 дней после заражения хориоаллантоис становится диффузно-отечным, на эктодермальной поверхности его появляются плоские сероватые, часто сливающиеся между собой оспины. Вирус оспы голубей вызывает образование пуговчатых оспин с белым валиком по периферии и темным центром.

По отношению к эмбрионам вирус оспы кур более патогенен, чем вирус оспы голубей. Предельные титры инфекционности для эмбрионов кур у штаммов вируса оспы голубей обычно колеблются от 10^{-5} до 10^{-6}, а у штаммов вируса оспы кур от 10^{-6} до $10^{-7,5}$. Штаммы вируса оспы голубей «имеют тенденцию» к локальной репродукции на мембране главным образом в пределах инокулируемой части ее. В отличие от него вирус оспы кур проникает во все органы и ткани зараженного эмбриона. По активности «эмбриональный» вирус превосходит «корочковый».

При репродукции вируса оспы кур в монослое фибробластов куриных эмбрионов возникает цитопатогенный эффект в виде набухания, увеличения и округления пораженных клеток, агрегации их, отслоения и сползания в питательную среду. Для этой культуры наибольшей вирулентностью обладает вирус оспы канареек, затем вирус оспы кур и наименьшей — вирус оспы голубей. Установлена бляшкообразующая способность вируса оспы птиц в культуре ткани. Оптимальный срок развития негативных колоний — 11 дней.

ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

Диагноз на оспу ставят по симптомам болезни, патологоанатомическим изменениям и данным лабораторного исследования.

Если имеются типичные оспенные поражения кожи, гребня, сережек и лицевой части головы, диагноз поставить нетрудно. Если же поражения локализуются только в ротовой и носовой полостях, диагностировать болезнь труднее. В сомнительных случаях делают мазки из пораженных тканей и ставят биологическую пробу.

Вирусоскопия. Готовят мазки из воспаленных фолликул голени экспериментально зараженных кур или голубей или же свежих оспенных бородавок естественно больной птицы. Фолликулы осторожно срезают лезвием безопасной бритвы (не допуская кровотечения) и местом среза осторожно проводят по чистому предметному стеклу. Мазки подсушивают на воздухе, перед окраской выдерживают 10—15 минут в дистиллированной воде, далее окрашивают методом серебрения по Морозову. Окрашивать мазки на присутствие элементарных телец можно также по методу Герцберга или Пашена.

Окраска по методу Герцберга. Красящим раствором служит 3%-ный раствор victoria blau 4R. Во время приготовления краску прогревают в водяной бане 30 минут при 60°, фильтруют и дают созреть в течение 14 дней. Свежеприготовленные или фиксированные 10%-ным формалином мазки окрашивают 15 минут, дважды промывают дистиллированной водой, высушивают и заключают в бальзам. Элементарные тельца окрашиваются в ярко-синий цвет.

Окраска по методу Пашена. Фиксированные мазки окрашивают синькой Леффлера при прогревании до появления паров, промывают дистиллированной водой и окрашивают при подогревании неразведенным раствором фуксина Циля 1—3 минуты *. Снова промывают водой, дифференцируют абсолютным спиртом или 50%-ным раствором танина 3—5 минут. Высушенные препараты просматривают под микроскопом в иммерсионной системе. Элементарные тельца окрашиваются в красновато-розовый цвет.

---

* Приготовление фуксина Циля: 1 г фуксина, 10 мл абсолютного спирта и 100 мл 5%-ной карболовой воды. Приготовление синьки Леффлера: 30 мл насыщенного спиртового раствора мителенового синего и 100 мл 0,01%-ного раствора едкого калия. Раствор поместить в термостат при 37° на месяц для созревания. Обе краски перед употреблением фильтруют.

Биопробу на птице ставят с материалом, полученным от естественно больной птицы, или с суспензией хориоаллантоисной оболочки.

В том и в другом случаях испытуемый материал гомогенизируют в физиологическом растворе (1 : 20) и осторожно втирают стеклянной палочкой или зубной щеткой в скарифицированную поверхность гребня, бородок, а также освобожденные от перьев фолликулы голени. При наличии в испытуемом материале вируса оспы на месте втирания материала развиваются оспенные поражения: припухание и покраснение фолликул, появление на поверхности их гнойных пробочек, затем струпьев, которые в дальнейшем, сливаясь, дают общий струп коричневого цвета.

Специфичность оспенных поражений у экспериментально зараженной птицы в каждом случае может быть подтверждена при помощи вирусоскопии мазков.

При дифференциальной диагностике необходимо исключить аспергиллез, респираторный микоплазмоз, ларинготрахеит, авитаминоз, паршу и кандидамикоз.

Ларинготрахеит характеризуется воспалительными процессами (серозным, геморрагическим, казеозным или фибринозным) в гортани, верхней части трахеи, бронхах и поражением глаз. При биопробе не развивается оспенной экзантемы или фолликулита.

Кандидамикоз, вызываемый плесневым грибом Candida albicans, характеризуется появлением на слизистой оболочке ротовой полости, гортани, глотки, зоба, иногда желудка и тонких кишок наложений. При микроскопическом исследовании наложений в них обнаруживаются лейкоциты, эпителий, мицелий и споры гриба.

В отличие от оспы основные изменения при аспергиллезе локализуются в легких и воздухоносных мешках. При микроскопическом исследовании патологического материала обнаруживают Aspergillus fumigatus. Парша вызывается Achorion gallinae, легко обнаруживаемым при микроскопии неокрашенного препарата (видны нити мицелия и споры).

При авитаминозе А птица становится вялой, малоподвижной, сидит, нахохлившись; наблюдается водянистое или слизистое истечение из носа; в ротовой полости, гортани и пищеводе желтовато-белые, иногда пустуллезного характера, творожистые очажки величиной с просяное зерно. При вскрытии устанавливают повышенное содержание мочевой кислоты в мочеточниках и почках, отложение ее под эпикардом, под капсулой печени, на серозных покровах грудобрюшной полости. Биопроба при авитаминозе отрицательна.

Ретроспективная диагностика на основании серологических реакций не разработана.

Поствакцинальная оценка иммунитета. Длительность и напряженность иммунитета при оспе птиц зависит от иммуногенности штамма и возраста переболевшей птицы. Естественно переболевшие куры иммунны в течение $2^1/_2$—3 лет.

Для профилактики оспы кур в СССР используют вирус оспы голубей. Применять этот препарат рекомендуют для кур с 1—1½-месячного возраста. Голубей можно иммунизировать с месячного возраста. Иммунитет у привитых кур наступает через три недели и сохраняется около трех месяцев. Иммуногенность вакцины из голубиного вируса оспы зависит от штамма и метода его поддержания в условиях производственного учреждения. В настоящее время в изготовлении оспенной вакцины применяется голубиный вирус оспы, штамм «Нью-Джерси».

Натуральный вирус оспы кур в качестве вакцины в СССР не применяется.

Серологическая оценка поствакцинального иммунитета не разрабатывается, так как гетеровирулентный вирус оспы голубей не индуцирует образование специфических антител в организме привитых кур в таком титре, чтобы его можно было оценить при помощи серологических реакций.

СОДЕРЖАНИЕ

Предисловие 3
Ящур. *В. Н. Сюрин, Ю. В. Фомин* 5
Бешенство. *В. Н. Сюрин, Ю. В. Фомин* 54
Везикулярный стоматит. *Е. А. Краснобаев* 70
Болезнь Ауески. *Е. А. Краснобаев* 81
Чума крупного рогатого скота. *Г. А. Иванова, В. Н. Сюрин* 91
Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота. *Г. А. Иванова, Ю. В. Фомин* 101
Вирусная диарея крупного рогатого скота. *Е. А. Краснобаев* 107
Парагрипп крупного рогатого скота. *В. Н. Сюрин* 118
Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота. *В. Н. Сюрин* . . . 131
Африканская чума однокопытных. *В. Н. Сюрин, Ю. В. Фомин* . . . 152
Ринопневмония лошадей. *Е. А. Краснобаев* 164
Грипп лошадей. *Г. А. Иванова* 175
Оспа лошадей. *В. Н. Сюрин* 179
Оспа верблюдов. *В. Н. Сюрин* 181
Чума свиней. *Ю. В. Фомин, В. Н. Сюрин* 184
Африканская чума свиней. *В. Н. Сюрин* 194
Болезнь Тешена. *Е. А. Краснобаев* 206
Инфекционный гастроэнтерит свиней. *Е. А. Краснобаев* 223
Грипп свиней. *Г. А. Иванова* 239
Оспа свиней. *Ю. В. Фомин, В. Н. Сюрин* 254
Энзоотическая пневмония свиней. *В. Н. Сюрин* 258
Катаральная лихорадка овец *В. Н. Сюрин* 266
Лихорадка долины Рифт. *Е. А. Краснобаев* 276
Болезнь Найроби. *Е. А. Краснобаев* 284
Контагиозная эктима овец и коз. *В. Н. Сюрин* 287
Вирусный аборт овец. *Ю. В. Фомин, В. Н. Сюрин* 297
Оспа овец и коз. *В. Н. Сюрин, Ю. В. Фомин* 313
Инфекционный гепатит собак. *В. Н. Сюрин* 319
Болезнь Ньюкасла. *Г. А. Иванова* 328
Грипп птиц. *В. Н. Сюрин, Г. А. Иванова* 337
Классическая чума птиц. *Г. А. Иванова* 340
Грипп уток. *Г. А. Иванова* 352
Инфекционный ларинготрахеит кур. *В. Н. Сюрин* 357
Инфекционный бронхит кур. *В. Н. Сюрин* 364
Вирусный гепатит утят. *В. Н. Сюрин, Ю. В. Фомин* 379
Лейкоз птиц. *В. Н. Сюрин, Г. А. Иванова* 388
Болезнь Марека. *Г. А. Иванова, В. Н. Сюрин* 404
Оспа птиц. *Г. А. Иванова, В. Н. Сюрин* 409