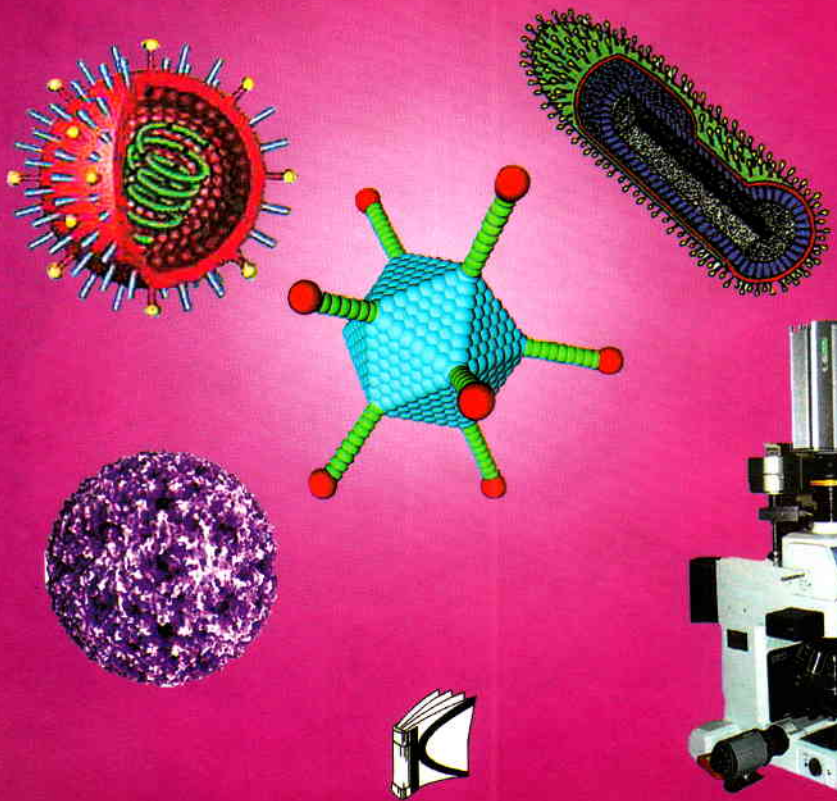
619:578/075
Б198

УЧЕБНИК

Р. В. БЕЛОУСОВА, Э. А. ПРЕОБРАЖЕНСКАЯ,
И. В. ТРЕТЬЯКОВА

ВЕТЕРИНАРНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ



«КолосС»

УДК 619 : 616.98: 578(075.8)
ББК 48я73
Б19

Редактор *В. Н. Сайтаниди*

Рецензенты: заслуженный деятель науки РФ, академик МААО, профессор кафедры эпизоотологии и вирусологии ФГОУ ВПО Воронежского государственного аграрного университета им. К. Д. Глинки **Б. Т. Артемов** и доцент кафедры **Т. Е. Соловьева;** зав. кафедрой микробиологии, вирусологии и фармакологии ФГОУ ВПО Вятской государственной сельскохозяйственной академии, профессор, доктор медицинских наук **В. Е. Романов** и доцент кафедры **Т. А. Тимошенко**

Научна... ...тека
МОС... ...я
ВЕТЕР... ...рная
АКАДЕМИЯ

Белоусова Р. В., Преображенская Э. А., Третьякова И. В.
Б19 Ветеринарная вирусология / Под ред. проф. Р. В. Белоусовой. — М.: КолосС, 2007. — 424 с., [12]л. ил.: ил. — (Учебники и учеб. пособия для высш. учеб. заведений).
ISBN 978—5—9532—0416—3

Рассмотрены вопросы общей и частной вирусологии. Дана характеристика вирусов, наиболее часто вызывающих инфекции у животных разных видов. Приведены сведения о клиническом и патологоанатомическом проявлении болезней, характеристики возбудителей, указаны методы диагностики.

Для студентов вузов по специальности «Ветеринария».

УДК 619 : 616.98 : 578(075.8)
ББК 48я73

ISBN 978—5—9532—0416—3

© Издательство «КолосС», 2007

СОКРАЩЕНИЯ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ТЕКСТЕ

АГ — антиген
АТ — антитело
АЧС — африканская чума свиней
анти-ГА — антигемагглютинины
БОЕ — бляшкообразующая единица
ВБА — вирус болезни Ауески
ВНА — вируснейтрализующие антитела
ВНК-21 — перевиваемая культура клеток почки сирийского хомячка
ГАЕ — гемагглютинирующая единица
ГЛА — гидролизат лактальбумина
ГЗТ — гиперчувствительность замедленного типа
Д — дальтон
ВИЭОФ — встречный иммуноэлектроосмофорез
ИФА — иммуноферментный анализ
ИФ — иммунофлуоресценция
ИФН — интерферон
ИЭМ — иммуноэлектронная микроскопия
kb — килобаза (тысяча оснований)
kbp — тысяча парооснований
КЭ — куриный эмбрион
КК — культура клеток
КСА — комплементсвязывающие антитела
монАТ — моноклональные антитела
НСК — нормальная сыворотка кролика
НРИФ — непрямая реакция иммунофлуоресценции
ПААГ — полиакриламидный гель
ПА — преципитирующие антитела
ПЦР — полимеразная цепная реакция
РИА — радиоиммунный анализ
РИД — радиальная иммунодиффузия
РНК — рибонуклеиновая кислота
РДП — реакция диффузионной преципитации
РН — реакция нейтрализации
РТНА — реакция торможения нейроминидазной активности
РТГА — реакция торможения гемагглютинации
РТГАд — реакция торможения гемадсорбции
РГА — реакция гемагглютинации
РНГА — реакция непрямой гемагглютинации
РИФ — реакция иммунофлуоресценции
РСВ — респираторно-синцитиальный вирус
РКВС — респираторный коронавирус свиней
РРГ — реакция радиального гемолиза
СМФ — система мононуклеарных фагоцитов
$ТЦД_{50}$ — 50%-ная тканевая цитопатическая доза
ТФИФА — твердофазный иммуноферментный анализ
ТГС — трансмиссивный гастроэнтерит свиней
ФБР — фосфатный буферный раствор
ФИТЦ — флуоресцеин изотиоцианат
ФКЭ (ФЭК) — культура клеток фибробластов куриного эмбриона
ХАО — хорионаллантоисная оболочка
ЦПА — цитопатическая активность
ЦПД — цитопатическое действие
ЦПИ — цитопатические изменения
ЭФ — электрофорез
$ЭЛД_{50}$ — 50%-ная эмбриональная летальная доза
ЭМК — энцефаломиокардит
$ЭИД_{50}$ — эмбриональная инфекционная доза
$ЭЛД_{50}$ — эмбриональная летальная доза

ИСТОРИЯ НАУКИ О ВИРУСАХ

Заболевания растений, животных и человека, вирусная природа которых в настоящее время установлена, в течение многих столетий наносили ущерб сельскому хозяйству и вред здоровью человека. Многие из них были описаны очень давно, но попытки установить их причину и обнаружить возбудителя оставались безуспешными. Первую вакцину для предупреждения вирусной инфекции — оспы предложил английский врач Э. Дженнер в 1796 г., почти за сто лет до открытия вирусов. Он впервые осуществил мечту человечества: обуздать одну из самых страшных болезней человека — натуральную оспу с помощью вакцинации — искусственной прививки возбудителя коровьей оспы. Вторая вакцина — против бешенства была предложена основателем микробиологии Л. Пастером в 1885 г., за семь лет до открытия вирусов.

Открытие вирусов принадлежит русскому ученому-ботанику — Д. И. Ивановскому (1864—1920).

На примере мозаичной болезни табака он доказал существование нового типа возбудителя болезни. Изучая эту болезнь, Д. И. Ивановский приходит к выводу, что возбудитель имеет необычную природу: фильтруется через бактериальные фильтры, сохраняет инфекционные свойства, невидим под микроскопом и неспособен расти на искусственных средах. Он назвал новый тип возбудителя «фильтрующиеся бактерии».

В феврале 1892 г. на заседании Российской академии наук Д. И. Ивановский сообщает, что возбудителем мозаичной болезни табака является фильтрующийся вирус. Эту дату считают днем рождения вирусологии, а Д. И. Ивановского — ее основоположником.



Д. И. Ивановский (1864—1920)

В 1897 г. Ф. Леффлер и П. Фрош, используя принцип фильтруемости, примененный Д. И. Ивановским, показали, что возбудитель ящура животных — вирус. Затем последовало открытие возбудителей чумы крупного рогатого скота (Николь и Адиль-Бей, 1902), чумы собак (А. Карре, 1905), саркомы Роуса (Ф. П. Роус, 1911) и других болезней животных. В 1915 г. Ф. Туорт и в 1917 г. Ф. д'Эрелль открыли вирусы бактерий — бактериофаги. Появлялись многочисленные сообщения о вирусной природе кори, полиомиелита, гриппа, энцефалита и т. д.

После открытия и развития представлений о фильтрующихся возбудителях их стали называть «ультравирусами», позже — «фильтрующимися вирусами» и, наконец, с начала 1940-х годов — просто «вирусами». Таким образом, уже во втором десятилетии XX в. стали известны вирусы растений, животных, бактерий и человека.

В потоке новостей о вирусах были и затишья, продолжавшиеся до тех пор, пока не появились новые методы их выделения, культивирования и идентификации. В 30—40-х годах XX в. основной экспериментальной моделью были лабораторные животные, чувствительные к ограниченному количеству вирусов. В 40-е годы в вирусологию в качестве экспериментальной модели входят развивающиеся куриные эмбрионы, которые позволили открыть и культивировать много новых вирусов: кори, инфекционного ларинготрахеита птиц, оспы птиц, ньюкаслской болезни и др. Использование этой модели стало возможным благодаря исследованиям австралийского вирусолога и иммунолога Ф. М. Бернета и американского вирусолога А. Херши.

Подлинное революционное событие в вирусологии — открытие возможности культивировать клетки в искусственных условиях. В 1952 г. Д. Эндерс, Т. Уэллер, Ф. Роббинс получили Нобелевскую премию за разработку метода культуры клеток. Использование культуры клеток является эффективным методом для выделения многочисленных новых вирусов, их идентификации, клонирования, изучения их взаимодействия с клеткой.

По мере достижения успехов в создании новых методов исследования расширялось представление о мире вирусов, их природе, характере взаимодействия с чувствительными клетками организма, особенностях противовирусного иммунитета, экологии ряда вирусов, их роли в онкогенных процессах и эволюции ряда вирусных болезней человека и животных.

Со времени открытия вирусов по настоящее время представления о природе вирусов претерпели значительные изменения. По мере изучения природы вирусов в первые 50 лет после их открытия формировались представления о вирусах как о мельчайших организмах на основании наличия у них свойств, характерных для других организмов: 1) вирусы способны к размножению; 2) они обладают наследственностью, воспроизводя себе подобных. Наследственные признаки вирусов можно учитывать по спектру поражаемых ими хозяев и симптомов заболеваний и специфичности иммунных реакций. Сумма этих признаков позволяет определить наследственные свойства вируса; 3) вирусы обладают изменчивостью; 4) как другие организмы, они характеризуются приспособляемостью к условиям внешней среды — через организм хозяина; 5) вирусы эволюционируют, и движущий силой их эволюции является естественный отбор.

На примере вируса гриппа А можно проследить эволюцию, темпы которой измеряются не миллионами и даже не тысячами

лет, а немногими годами. Незначительные изменения его антигенной структуры происходят ежегодно, а резкие смены антигенов — 1 раз в 10—15 лет. Подобных темпов естественной эволюции не знает ни одна группа других организмов.

Главным фактором естественного отбора в этом процессе является искусственный отбор, применяемый для выведения полезных пород животных и сортов растений. Классическим примером искусственного отбора являются работы Л. Пастера по получению вакцинного штамма — фикс-вируса бешенства, а также разработка живых вакцин против чумы крупного рогатого скота, чумы свиней, полиомиелита и других болезней.

На рубеже середины XX в. выход естественных наук на молекулярный уровень стимулировал дальнейшее развитие вирусологии, иммунологии, генетики. Создание электронного микроскопа сделало видным мир вирусов и макромолекулярных соединений. Использование молекулярных методов в вирусологии позволило установить строение (архитектуру) вирусных индивидуумов — вирионов (термин введен французским микробиологом А. Львовым), способы проникновения вирусов в клетку и их репродукцию. Исследования показали, что генетическое вещество вирусов — ДНК или РНК. Нуклеиновые кислоты вирусов заключены в футляр-капсид из белковых молекул, у сложных вирусов могут быть внешние оболочки (суперкапсидные), состоящие из белков, углеводов и липидов.

С развитием исследований молекулярной биологии вирусов стали накапливаться факты, противоречащие представлению о вирусах как микроорганизмах по следующим уникальным свойствам:

1) наличие в вирионах в качестве генетического материала одной из двух нуклеиновых кислот (ДНК или РНК), которые могут быть различной формы (линейные, спиральные, кольцевые, одно- и двухцепочные, фрагментированные, разобщенные);

2) отсутствие у вирусов собственных белок-синтезирующих (рибосом) и энергетических систем;

3) уровень паразитизма у вирусов иной, чем у бактерий или простейших. В отличие от внутриклеточного паразитизма последних паразитизм вирусов генетический (конкуренция вирусного и клеточных геномов). Яркий пример генетического паразитизма — способность ряда вирусов интегрировать (объединяться) с клеточным геномом. В этом случае вирусные гены обозначаются как провирус (умеренные ДНК-содержащие фаги, онкогенные ДНК-содержащие вирусы, вирус гепатита В, ретровирусы). Под влиянием различных факторов (УФЛ, обработка гормонами и т. д.) вирусная ДНК может «вырезаться» и существовать автономно, давая вирусное потомство;

4) вирусы размножаются только в живых клетках (в клетках животного, человека, в куриных эмбрионах, культурах клеток);

5) к уникальному свойству вируса относится его способ размножения, который резко отличается от размножения всех других клеток и организмов (бинарное деление, почкование и др.). Способ размножения вирусов — дисъюнктивный (разобщенный). Это подчеркивает разобщенность в пространстве (на территории клетки) и времени синтеза вирусных компонентов (нуклеиновых кислот и белков) с последующей сборкой и формирование вирионов. У вирусов нет обмена веществ.

К вирусам примыкают *вироиды-агенты,* открытые Т. О. Дайнером в 1972 г., вызывающие заболевание некоторых растений и способные передаваться как обычные инфекционные вирусы. Вироиды — это сравнительно небольшие молекулы РНК (300—400 нуклеотидов), лишенные белковой оболочки. Механизм репликации вироидов не вполне ясен.

Многие годы считали, что некоторые медленные инфекции у человека (Куру, болезнь Крейтцфельдта—Якоба, синдром Герстманна—Штрейусслера—Шейнкера и др.) и животных (энцефалопатия у крупного рогатого скота, норок и др.) вызывают вирусы. Однако оказалось, что причиной этих болезней является новый патогенный агент — прион, открытый в начале 80-х годов XX в. американским биохимиком Стенли Прузинером (см. с. 384).

Несмотря на многолетнее развитие учения о вирусах, до сих пор нет общепринятого определения их. Определение «вирусы» несколько произвольно, и в разное время было предложено много его вариантов.

Вирусы являются неклеточными формами жизни. По-видимому, вирусы можно рассматривать как биологические образования, несущие генетическую информацию, которую они реализуют только в живых клетках человека, животных и растений.

О происхождении вирусов высказывались разные предположения. Одни авторы считают, что вирусы являются результатом крайнего проявления регрессивной эволюции бактерий и других одноклеточных организмов. Эту гипотезу большинство вирусологов не разделяют.

Согласно второй гипотезы вирусы — потомки древних, доклеточных форм жизни. Эту гипотезу большинство исследователей также не разделяют.

Гипотезу эндогенного происхождения вирусов поддерживают наибольшее количество вирусологов. Она предполагает, что вирусы произошли от генетических элементов клеток («взбесившихся генов»), ставших автономными. Вероятно, вирусы возникли и эволюционировали вместе с возникновением и эволюцией клеточных форм жизни.

Значение вирусов в нашей жизни очень велико. С одной стороны, это этиологические агенты большинства инфекционных болезней человека, животных и растений; с другой — вирусы, благодаря относительной простоте их строения, являются пре-

красной биологической моделью для решения фундаментальных проблем биологии, генетики, биохимии, иммунологии, генной инженерии. «Вирусы дают нам единственный ключ к пониманию функции нуклеиновых кислот, а возможно, и к пониманию природы самой жизни» (У. Стенли, Э. Вэленс, 1964).

В 1974 г. В. М. Жданов высказал гипотезу, согласно которой вирусы — важный фактор эволюции органического мира. Преодолевая видовые барьеры, вирусы могут переносить отдельные гены или их группы, а интеграция вирусной ДНК с хромосомами клеток может приводить к тому, что вирусные гены становятся клеточными генами, выполняющими важные функции.

Почему вирусология, которая зародилась в недрах микробиологии, за последние годы достигла такого стремительного успеха, став одной из ведущих и профилирующих дисциплин медико-биологической и ветеринарных наук? Этому способствовал ряд обстоятельств.

Во-первых, по мере сокращения роли бактерий, простейших и грибов в инфекционной патологии человека и животных, для лечения и профилактики которых имеются надежные биологические и химиотерапевтические препараты, роль вирусов возросла. Против многих вирусных болезней ни медицинская, ни ветеринарная наука еще не создала подобных препаратов. Так, до сих пор не решены проблемы с такими болезнями, как грипп, бешенство, ящур и др.

Во-вторых, возможность использования вирусов в качестве биологической модели. Таким образом, многие фундаментальные открытия в области биологии были сделаны благодаря вирусам (механизм репликации ДНК, механизм синтеза белка и др.).

В-третьих, установлено, что в широко распространенных респираторно-кишечных болезнях молодняка, наносящих огромный экономический ущерб, большую роль играют вирусы из различных таксономических групп (адено-, рота-, корона-, парамиксовирусы, вирусы диареи и др.). Оказалось, что при появлении вспышек этих заболеваний тесно взаимодействуют различные вирусы, бактерии, хламидии и стрессовые факторы.

В-четвертых, отдельные виды патологии (врожденные уродства, пороки развития и пр.), где роль вирусов даже не подозревалась, оказались вирусологическими. В медицине известно, что вирусы являются одной из причин внутриутробной патологии человека (вирус краснухи, гриппа, аденовирусы и др.). К сожалению, в ветеринарной вирусологии эта проблема не привлекла должного внимания. Хотя тератогенное действие вирусов наблюдается и в инфекционной патологии животных: вирус чумы свиней часто вызывает мертворождение и мумификацию плодов; вирус диареи крупного рогатого скота — гипоплазию мозжечка новорожденных телят; вирус инфекционного бронхита кур — патологическую форму яиц; вирус инфекционного ринотрахеита — пороки развития, слепоту у телят.

Установлена роль вирусов в возникновении некоторых хронических заболеваний. Накапливаются сведения о роли вирусов при острых сердечно-сосудистых заболеваниях, заболеваниях почек, поджелудочной железы, глаз и т. д. Только разносторонние исследования могут служить основой для суждения о роли вирусов в болезнях с неясной этиологией, которые до сих пор изучают врачи-неинфекционисты.

Очень важен как с эпидемиологической, так и эпизоотологической точки зрения факт миграции человеческих штаммов вируса гриппа в животный мир. Вирусы гриппа ускользают от действия иммунной системы организма за счет быстрого изменения своих антигенных детерминант. Это затрудняет проведение своевременных эффективных специфических методов профилактики. К сожалению, проблема гриппа до сих пор остается очень актуальной.

И наконец, накопились неоспоримые доказательства того, что многие опухолевые болезни вызывают вирусы (лейкоз птиц, крупного рогатого скота, болезнь Марека и др.). Выяснение причин возникновения злокачественных заболеваний человека, от которых во всем мире ежедневно погибают миллионы людей, остается одной из важнейших проблем современной биологии и медицины.

Контрольные вопросы

1. Какова история открытия вирусов? 2. Что такое вирус и его основные отличия от других агентов: бактерий, грибов и т. д.? 3. Каково происхождение вирусов и какова их роль в эволюции органического мира? 4. Какова роль вирусов в инфекционной патологии животных?

Глава 1
ОБЩАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ

●

1.1. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ФИЗИЧЕСКАЯ СТРУКТУРА ВИРИОНОВ

Простые (безоболочечные) вирусы состоят из нуклеиновой кислоты и белка и представляют собой нуклеопротеиды или нуклеокапсиды. Сложные (оболочечные) вирусы кроме нуклеиновой кислоты и белка содержат также липиды и углеводы.

Нуклеиновые кислоты. Клетки всех живых организмов содержат два типа нуклеиновых кислот — ДНК и РНК. Их структура относительно однообразна: ДНК представляет собой двуспиральную молекулу, РНК — односпиральную молекулу. Функция ДНК заключается в хранении и репликации наследственной информации, таким образом, она является клеточным геномом. РНК представлена в клетке в трех формах: информационной (иРНК), рибосомальной (рРНК) и транспортной (тРНК). Каждая из них выполняет определенную функцию: иРНК образуется в результате транскрипции генома и передает информацию с генома на белоксинтезирующий аппарат клетки, рРНК является структурным компонентом рибосом, тРНК доставляет аминокислоты белоксинтезирующему аппарату клетки.

В отличие от клетки вирусы содержат один тип нуклеиновой кислоты — или ДНК, или РНК. Каждая из них выполняет функцию вирусного генома. Структура нуклеиновых кислот у разных вирусов весьма разнообразная. По количеству цепей они бывают одно- и двуспиральными, по форме — линейными и кольцевыми (циркулярными), а также непрерывными и фрагментированными (рис. 1).

Содержание нуклеиновой кислоты в вирионе различных вирусов составляет от 1 % у ортомикso- и парамиксовирусов до 32 % у парвовирусов и не коррелирует ни с систематическим положением вируса, ни со степенью сложности его организации.

Вирусные ДНК. Молекулярная масса ДНК различных вирусов варьирует в широких пределах: от 2 МД у цирко- и парвовирусов до 375 МД у поксвирусов. Самые большие геномы содержат до нескольких сотен генов, самые маленькие — несколько генов. По структуре молекулы ДНК бывают одно- и двуспиральными, линейными и кольцевыми. У вирусов с двуспиральными ДНК информация обычно закодирована на обеих спиралях, что говорит о максимальной экономии генетического материала. Большинство

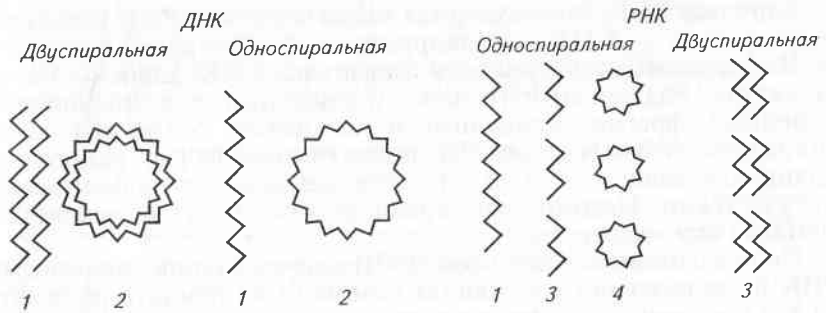


Рис. 1. Типы и формы вирусных нуклеиновых кислот:

1 — линейная непрерывная; *2* — кольцевая; *3* — фрагментированная линейная; *4* — фрагментированная кольцевая

нуклеотидных последовательностей в молекуле ДНК встречается однократно. Однако в концевом фрагменте линейных ДНК возможно наличие ее начального участка в виде повтора, который бывает прямым или инвертируемым. Благодаря таким повторам молекулы ДНК могут приобретать циркулярную форму, которая обеспечивает их устойчивость к эндонуклеазам. Кроме того, стадия образования циркулярной формы обязательна для интеграции вирусной ДНК с геномом клетки.

Односпиральные молекулы ДНК обычно одной полярности. Исключение составляют аденоассоциированные вирусы (парвовирусы). Их вирионы содержат ДНК или одной полярности (условно называемой «плюс»), или противоположной (условно — «минус»). Инфекционную активность эти вирусы проявляют только в том случае, когда в клетку проникают вирионы, содержащие ДНК обеих полярностей.

В таблице 1 приведены известные семейства ДНК-вирусов позвоночных.

1. Структура и размер генома ДНК-вирусов позвоночных

Семейство	Структура ДНК	Размер генома (kbp или kb)
Poxviridae	Двуспиральная линейная с ковалентно-связанными концами	130—375
Asfaviridae	Двуспиральная кольцевая	170—190
Iridoviridae	Двуспиральная линейная	140—383
Herpesviridae	То же	125—240
Adenoviridae	»	28—45
Polyomaviridae	Двуспиральная кольцевая	5
Papillomaviridae	То же	7—8
Circoviridae	Односпиральная кольцевая	2
Parvoviridae	Односпиральная линейная	4—6
Hepadnoviridae	Частично двуспиральная кольцевая	3

Вирусные РНК. Молекулярная масса вирусных РНК варьирует в пределах от 4—5 МД у нодавирусов до 32 МД у реовирусов.

Инфекционная активность молекулы РНК зависит от ее структуры. Различают РНК одно- и двуспиральные, по форме — линейные, фрагментированные и кольцевые. Молекулы односпиральных РНК (гаплоидный геном) имеют форму одиночной полинуклеотидной цепи со спирализованными комплементарными участками. Некомплементарные участки могут образовывать «шипы», или «выступы».

По предложению Балтимора (1971) вирусы с односпиральными РНК из-за различий в функциях генома было принято разделять на две подгруппы. У вирусов первой подгруппы вирусный геном обладает функциями иРНК и их условно обозначают как плюс-нитевые вирусы, или вирусы с позитивным геномом. У вирусов второй группы РНК не обладает функцией иРНК. На ней, как на матрице, синтезируется комплементарная молекула. Это происходит только в присутствии вирусного белка — фермента транскриптаза, который обязательно находится в структуре минус-нитевых вирусов (в клетках — ее аналога нет).

Между двумя группами РНК-вирусов есть и структурные различия. РНК «плюс-нитевых» вирусов выполняет функцию иРНК и имеет на 5′- и 3′-концах молекулы специфические структурные особенности, которых нет у минус-нитевых вирусов. Так, 5′-конец вирусных плюс-нитевых РНК, как и клеточных, имеет структуру, называемую «шапочкой» (от англ. cap). Она представляет собой 7-метилгуанин, присоединенный через пирофосфатную связь к гуаниновому нуклеотиду. На 3′-конце «плюс-нитевых» РНК имеется до 200 и больше адениновых нуклеотидов, так называемых поли (А). Такая структурная модификация на 5′- и 3′-концах иРНК очень важна для их функционирования: так, «шапочка» нужна для специфического узнавания иРНК рибосомами, а функция поли(А) заключается, по-видимому, в стабилизации молекул РНК. Исключение составляет 5′-конец РНК вируса полиомиелита. РНК этого вируса не содержит «шапочку»; вместо нее на 5′-конце имеется низкомолекулярный терминальный белок, ковалентно присоединенный к остатку урацила.

РНК минус-нитевых вирусов не имеет ни «шапочки», ни поли(А) и не способна вызывать инфекционный процесс. Необходимые для транскрипции вирусных белков модифицированные 5′- и 3′-концы для иРНК синтезируются на матрице геномной РНК в присутствии транскриптазы. Вирусная РНК ретровирусов хотя и является плюс-нитевой, однако не содержит «шапочку». Ее содержит гомологичная иРНК, которая синтезируется на матрице интегрированной в геном клетки провирусной ДНК.

Существуют вирусы, которые содержат как плюс-нитевые, так и минус-нитевые РНК-гены, так называемые амбиполярные РНК.

Двуспиральные молекулы РНК впервые были обнаружены у реовирусов и были названы «диплорнавирусы».

В таблице 2 приведены известные семейства РНК-вирусов позвоночных.

2. Структура и размер генома РНК-вирусов позвоночных

Семейство, род	Структура *РНК*	Полярность	Размер генома (kbp или kb)
Picornaviridae	Односпиральная линейная	Плюс-нитевая	7—8
Caliciviridae	То же	»	7—8
Astroviridae	»	»	7—8
Nodaviridae	»	»	4—5
Coronaviridae	»	»	27—31
Arteriviridae	»	»	13—16
Flaviviridae	»	»	10—12
Togaviridae	»	»	27—31
Bornaviridae	»	»	6
Filoviridae	»	»	19
Paramyxoviridae	»	»	15
Rhabdoviridae	»	»	11—15
Ortomyxoviridae	Односпиральная линейная фрагментированная (6—8 фрагментов)	»	10—15
Bunyaviridae	То же (2—3 фрагмента)	Амбиполярная (плюс-нитевая, минус-нитевая)	11—19
Arenoviridae	»	То же	11
Reoviridae	Двуспиральная линейная фрагментированная (10—12 фрагментов)	—	19—32
Birnaviridae	То же (2 фрагмента)	—	6
Род Deltavirus	Односпиральная кольцевая	Минус-нитевая	2
Род «Hepatitis E-like viruses» (HEV-like)	Односпиральная линейная	Плюс-нитевая	7
Retroviridae	Димерная линейная	Обратная транскрипция	7—12

Белки. Белки всех известных в настоящее время вирусов позвоночных являются основными компонентами вирионов и составляют от 57 до 90 % массы вириона. По аминокислотному составу вирусные белки принципиально не отличаются от состава белков животных.

В геноме вирусов кодируются две группы белков: структурные, которые входят в состав вирионов потомства, и неструктурные, участвующие в репродукции вируса на разных этапах, но не входящие в состав вирионов.

Структурные белки в составе вириона варьируют в широких пределах, что зависит от сложности организации вириона.

Простые вирусы животных содержат 3—4 белка, сложные, например вирусы оспы, — более 30. Среди структурных белков различают две группы — *капсидные* и *пепломеры*. Первая группа включает белки, которые формируют капсид (от греч. capsa — вместилище), окружающий нуклеиновую кислоту, а также геномные белки и ферменты; вторая группа — белки суперкапсидной оболочки, называемой пеплос (от греч. peplos — покров, мантия). Простые вирусы содержат только капсидные белки, сложные — и капсидные, и пепломеры.

Белки в составе вирусного капсида называются капсомерами. Основной их функцией является защита вирусного генома от неблагоприятных воздействий внешней среды. Они представляют собой идентичные полипептидные цепи (белковые субъединицы), которые обладают способностью к самосборке. Сборка капсида из субъединиц запрограммирована в первичной структуре белка и происходит самопроизвольно или при взаимодействии с нуклеиновой кислотой. Принцип субъединичности в строении капсида — уникальное свойство капсидных белков, благодаря которому достигается огромная экономия генетического материала. Кроме того, в механизме самосборки заложена возможность контроля за белковыми субъединицами: дефектные и чужеродные белковые цепи не включаются в капсид. Принцип самосборки характерен только для простых вирусов. Сложные вирусы сборку осуществляют по более сложному многоступенчатому механизму. Однако отдельные ее этапы (формирование капсидов и нуклеокапсидов) основаны на самосборке.

Некоторые капсидные белки обладают ферментативной активностью и участвуют в транскрипции и репликации вирусного генома. Так, в вирионах всех «минус-нитевых» РНК-вирусов обнаружена РНК-зависимая РНК-полимераза (транскриптаза); в вирионах ретровирусов — РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза, ревертаза) и другие ферменты. Наибольшее количество ферментов (более 10) обнаружено в составе вирусов оспы. Некоторые капсидные белки ковалентно связаны с концевой частью вирусного генома (геномные белки) и являются терминальными. Их функции неразрывно связаны с функциями генома и их регуляцией. Ферменты и геномные белки представлены единичными молекулами, тогда как капсомеры — множественными.

Суперкапсидные белки (пепломеры) находятся в липопротеидной оболочке сложных вирусов. Они либо пронизывают липидный бислой вириона, либо не доходят до его внутренней поверхности. Являясь типичными внутримембранными белками, они, как правило, гликозилированы (гликопротеиды), т. е. к молекуле белка в определенных местах прикреплены углеводные цепи. Гликозилирование осуществляют клеточные ферменты, поэтому один и тот же вирус, но реплицирующийся в разных клетках, может

иметь разные углеводные остатки по составу углеводов, длине углеводной цепи, месту прикрепления к белку.

У большинства сложных вирусов гликопротеиды формируют на поверхности вириона выступы — «шипы» длиной 7—10 нм. В их состав входит несколько молекул одного и того же белка. Вирусы гриппа (ортомиксовирусы) имеют два типа «шипов», один из которых построен из гемагглютинина, другой — из нейраминидазы. У парамиксовирусов также два типа «шипов» из двух гликопротеидов — HN и F. Рабдовирусы имеют только один тип «шипов» из одного гликопротеида.

Молекула гликопротеида имеет внешний гидрофильный конец, несущий аминогруппу (N-конец), и внутренний гидрофобный конец, несущий гидроксильную группу (С-конец) и погруженный в липидный бислой. С-концом гликопротеид «заякоривается» (фиксируется) в липидном бислое, N-концом распознает чувствительную клетку хозяина и адсорбируется на ней. Такая функция вирусных белков получила название «адресная функция». Она выработалась у вирусов в процессе эволюции, когда среди огромного числа нечувствительных клеток вирусная частица узнает специфический рецептор на клетке хозяина за счет специфических белков на своей поверхности. Другой функцией гликопротеидов является участие в слиянии вирусной и клеточной мембран, ведущее к проникновению вирусных частиц в клетку (белки слияния). Вирусные белки слияния ответственны за такие процессы, как гемолиз и слияние плазматических мембран соседних клеток, приводящее к образованию гигантских клеток — синцитиев или симпластов.

Неструктурные белки менее изучены. Существуют определенные трудности в их выделении из зараженных клеток и очистки от клеточных белков. К ним относятся: предшественники вирусных белков, которые существуют в зараженной клетке очень непродолжительное время, а затем нарезаются; ферменты синтеза РНК и ДНК — полимеразы; регуляторы стадий репродукции вирусов; ферменты, модифицирующие вирусные белки — протеиназы и протеинкиназы.

Липиды и углеводы. В состав вирионов всех сложных (оболочечных) вирусов позвоночных кроме нуклеиновой кислоты и белков входят липиды и углеводы.

Состав липидов вирионов сходен с липидным составом клетки хозяина: примерно 50—60 % составляют фосфолипиды и 20—30 % — холестерин. У отдельных представителей липидов содержится до 20—35 % от массы вириона (ортомиксо-, ретро-, буньявирусы). Липиды обнаружены только в суперкапсидной оболочке вирионов и имеют клеточное происхождение. Это связано с тем, что оболочечные вирусы формируются путем почкования на плазматической мембране клеток. Поэтому суперкапсидная оболочка вирионов представляет собой мембрану клетки-хозяина, модифициро-

ванную за счет встроенных в нее вирусных белков — пепломеров. Липидный компонент стабилизирует структуру вирусных частиц, поэтому их обработка детергентами или липазами приводит к потере инфекционности.

Исключение составляют вирусы оспы. У них липиды не образуют дифференцированной оболочки. Обработка вирусов оспавакцины жирорастворителями не приводит к потере инфекционной активности или каким-либо другим структурным изменениям вириона.

Углеводы находятся в вирионах в виде гликопротеинов, встроенных в суперкапсидный слой, а также гликолипидов и имеют клеточное происхождение. У отдельных представителей вирусов позвоночных содержание углеводов доходит до 7—8 % от массы вириона (ортомиксо-, тогавирусы). Химический состав их полностью определяется клеточными ферментами, которые обеспечивают перенос и присоединение сахарных остатков. В вирионах в основном обнаруживают фруктозу, сахарозу, маннозу, галактозу, нейраминовую кислоту, глюкозамин. Углеводы являются каркасом для локальных участков гликопротеидов, обеспечивают сохранение конформации белковых молекул и защищают от действия протеаз.

Компоненты клетки-хозяина. В составе вирионов могут обнаруживаться некоторые компоненты клетки-хозяина. Это могут быть белки или цельные клеточные структуры. Например, в составе некоторых оболочечных вирусов находится белок цитоскелета актин, в составе папиллома- и полиомавирусов содержатся клеточные гистоны, у ареновирусов обнаружены рибосомы. Клеточные компоненты могут включаться в вирион случайно или закономерно. Во втором случае они могут играть существенную роль в репродукции вирусов, как, например, гистоны для папиллома- и полиомавирусов.

Структурная организация вирионов. Вирионы (вирусные частицы) по архитектуре подразделяются на два типа (рис. 2, 3): имеющие внешнюю липопротеидную оболочку (сложные, или оболочечные, вирусы) и не имеющие такой оболочки (простые, или безоболочечные, вирусы).

Методами электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа детально изучено строение многих вирусов. Показано, что обязательный структурный компонент обоих типов — капсид (белковый чехол), окружающий вирусную нуклеиновую кислоту. Капсид состоит из большого числа регулярно расположенных полипептидных молекул (субъединиц), которые называют капсомерами, или морфологическими единицами. На поверхности суперкапсидной оболочки также имеются морфологические субъединицы, которые называются пепломерами. Каждый капсомер (пепломер) состоит из структурных единиц, построенных из одной или нескольких гомологичных или гетерологичных поли-

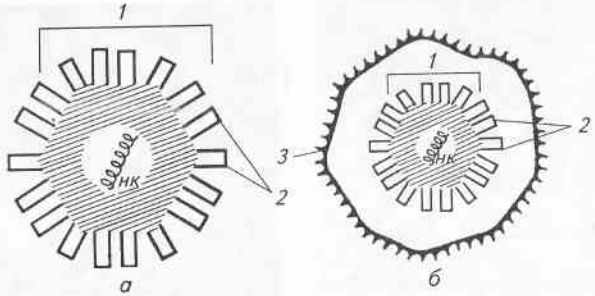


Рис. 2. Структура вирусов:

а — простых (безоболочечных); *б* — сложных (оболочечных); НК — нуклеиновая кислота; *1* — капсид; *2* — капсомеры; *3* — внешняя оболочка (суперкапсид)

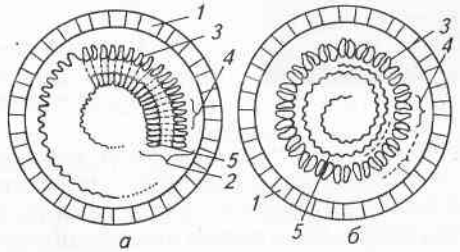


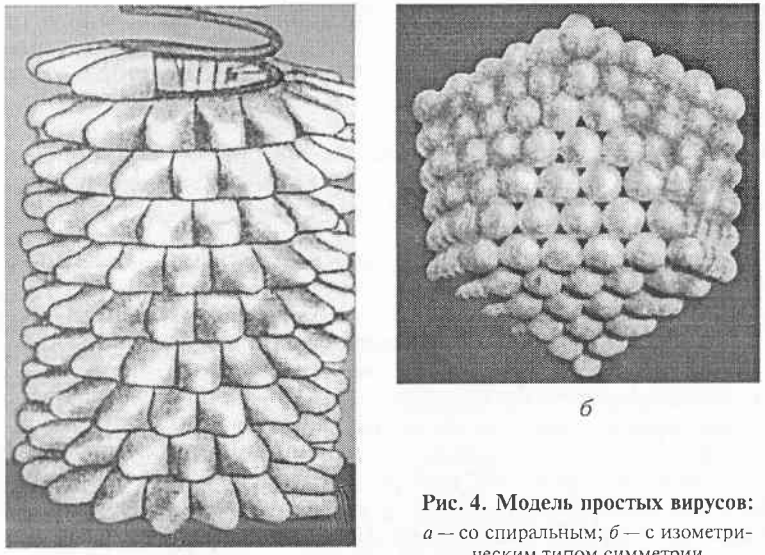
Рис. 3. Структура сложных вирусов
(*по Д. Каспару и А. Клагу, 1962*):

а — со спиральным; *б* — с изометрическим типом симметрии; *1* — суперкапсид; *2* — капсид; *3* — структурная субъединица (полимерная цепь); *4* — морфологическая субъединица (капсомер); *5* — нуклеиновая кислота

пептидных цепей и обычно соединенных друг с другом дисульфидной связью. Отдельную структурную единицу называют химической единицей или белковой субъединицей. Структурные единицы в составе капсида удерживаются нековалентными связями (водородными, ионными, гидрофобными). Капсид с заключенной в нем нуклеиновой кислотой называется нуклеокапсидом. У безоболочечных вирусов термины «нуклеокапсид» и «вирион» тождественны.

Капсомеры соединяются друг с другом строго определенным образом и образуют только два типа капсидов: спиральный и изометрический (квазиметрический). Только такие способы укладки капсомеров вокруг нуклеиновой кислоты (типы симметрии) обеспечивают формирование энергетически экономичных структур с минимумом свободной энергии (рис. 4).

Научная библиотека
МОСКОВСКАЯ
ВЕТЕРИНАРНАЯ
АКАДЕМИЯ



а *б*

Рис. 4. Модель простых вирусов:
а — со спиральным; *б* — с изометрическим типом симметрии

Спиральный тип характерен для вирусов, у которых капсомеры ассоциируются (соединяются) с геномом и образуют спиралевидную или винтообразную структуру. Такой способ укладки капсомеров называется спиральным типом симметрии. Он характеризуется длиной, диаметром, шагом спирали и числом капсомеров на один оборот спирали. Так, у вируса Сендай (парамиксовирус) нуклеокапсид представляет собой спираль длиной около 1 мкм, диаметром 20 нм и шагом спирали 5 нм (рис. 5). Он состоит примерно из 2400 структурных единиц, каждая из которых является белком с молекулярной массой 60 кД. На каждый винт спирали приходится 11—13 субъединиц. Белковые молекулы присоединяются к РНК под углом 60°, в связи с чем нуклеокапсид на электронной микрофотографии имеет вид «елочки».

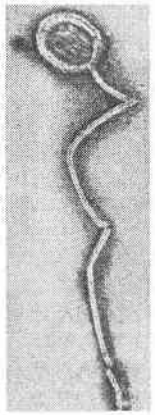
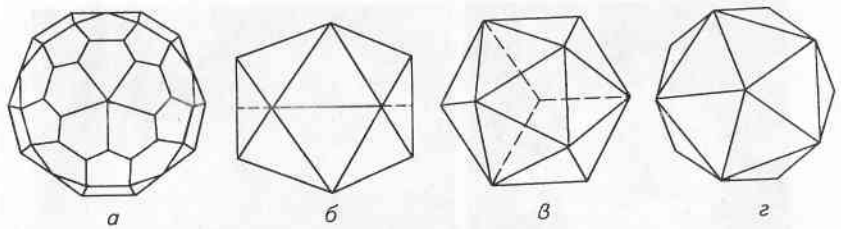


Рис. 5. Электронно-микроскопическое изображение вириона вируса Сендай с частично высвобожденным нуклеокапсидом (парамиксовирусы)

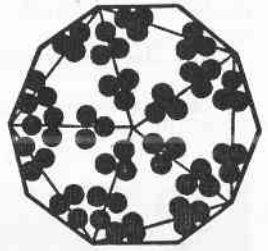
Изометрические капсиды представляют структуры, в которых капсомеры соединяются между собой в правильные многогранники, в центре которых расположен геном. Такой способ укладки капсомеров называется кубическим типом симметрии, а многогранник — икосаэдром (рис. 6). Это означает, что он симметричен в трех взаимно перпендикулярных направлениях и его линейные размеры вдоль



а *б* *в* *г*

Рис. 6. Строение икосаэдра (*по Д. Каспару и А. Клагу, 1962*):
оси симметрии показаны стрелками: *а* — три оси симметрии икосаэдра, одна из них проходит перпендикулярно к плоскости рисунка через вершину, окруженную пятью капсомерами; *б* — икосаэдр со стороны оси симметрии второго порядка; *в* — третьего порядка; *г* — пятого порядка

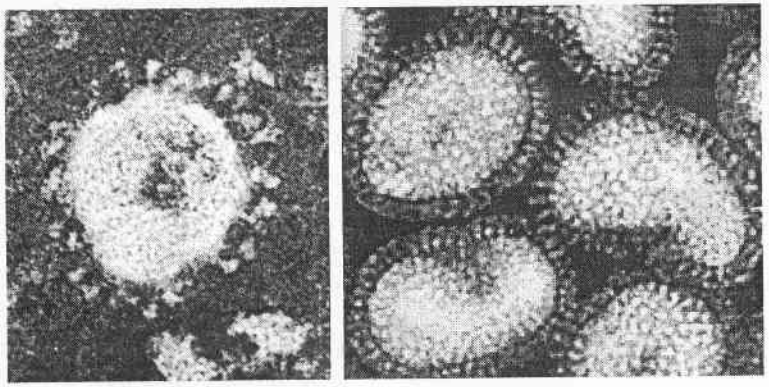
Рис. 7. Группирование капсомеров по икосаэдрическому типу симметрии (*по Б. Филдсу, Д. Найпу, 1989*):
капсид вируса полиомиелита — 20 тримеров



прямоугольных осей идентичны. Обычно изометрические капсиды состоят из 60 (или кратных 60) геометрически идентичных элементов, которые имеют 12 вершин, 20 граней и 20 ребер (рис. 7). Так, капсид вируса полиомиелита образован 60 белковыми структурными единицами, каждая из которых состоит из четырех полипептидных цепей (химических единиц) — vp1, vp2, vp3, vp4 (virion protein).

У оболочечных вирусов суперкапсид состоит из двойного слоя клеточных липидов и встроенных в него гликопротеидов. Они являются интрамембранными белками и формируют морфологические субъединицы — пепломеры, которые в электронном микроскопе выглядят в виде выступов (отростков) или «шипов» разной формы (рис. 8). Так, например, у тогавирусов они имеют палочкообразную форму; у парамиксовирусов (РС-вирус) — форму бутылки; у коронавирусов — форму короны. У ортомиксовирусов (вирусы гриппа) гемагглютинин образует шипы палочкообразной формы, нейроминидаза — в форме барабанной палочки. Изнутри липидного бислоя расположен внутренний белковый слой, образованный так называемым мембранным белком. Его еще называют внутренней белковой мембраной. Его функция заключается в дополнительной защите и стабилизации нуклеокапсида, который у оболочечных вирусов часто обозначают термином «сердцевина» (cor).

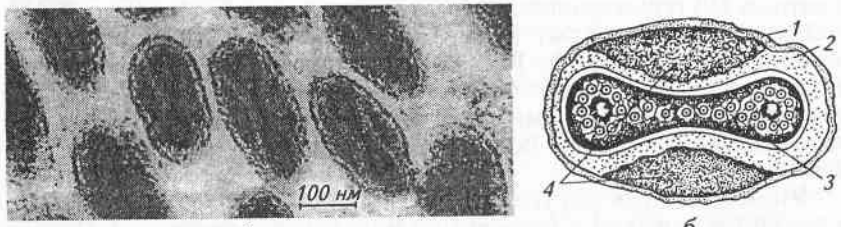
Наиболее сложно структурно организованы вирусы оспы (рис. 9). Их сердцевина (нуклеоид), содержащая вирусную ДНК в составе нуклеотида, имеет форму двояковогнутого кольца и окру-



а *б*

Рис. 8. Электронно-микроскопическое изображение некоторых вирионов вирусов животных:

а — вирионы вируса инфекционного бронхита птиц (коронавирусы); *б* — вирионы вируса гриппа А (ортомиксовирусы)



а *б*

Рис. 9. Электронно-микроскопическое изображение (*а*) и структура (*б*) вирионов вируса оспы:

1 — внешняя оболочка; *2* — сердцевина (нуклеоид); *3* — ДНК; *4* — латеральные тела

жена двумя линзообразными латеральными тельцами. Капсид окружен дополнительными внутренними белковыми структурами — вирусным матриксом. По архитектуре вирусы оспы отличаются от всех других вирусов позвоночных и их принято называть вирусами со сложным типом симметрии.

Морфогенез вирусов. При репродукции вирусов внутри клетки формируются определенные структуры, в которых синтезируются и собираются компоненты дочерних вирионов. Эти структуры появляются в результате корпоративных взаимодействий структур клетки и вируса, где главенствующая роль принадлежит клетке, и их принято называть включения, «фабрики», клеточные матрик-

сы, виропласты. В составе включений (матриксов) обнаруживаются клеточные структуры и компоненты вирионов, причем их соотношение меняется по ходу репродукции вирусов. Так, в начале в них преимущественно обнаруживаются скопления элементов клетки — рибосом, (полисом), мембран, микротрубочек, осмофильных волокон. Позднее появляются компоненты вирионов (субвирусные компоненты) — вирусные белки, нуклеопротеиды. На завершающих этапах репродукции в матриксах обнаруживается большое скопление вирионов, которые формируют кристаллоподобные колонии.

Локализация включений в клетке также связана с местом репродукции вирусов. Так, для ДНК-вирусов (реовирусы, аденовирусы, папилломавирусы, полиомавирусы), у которых репродукция проходит преимущественно в ядрах клеток, включения обнаруживаются вблизи ядерной мембраны. При окрашивании таких клеток можно увидеть так называемые внутриядерные включения. У РНК-вирусов репродукция вирионов проходит в цитоплазме клеток вблизи мембран эндоплазматической сети, аппарата Гольджи и других структур, где они образуют включения типа «тяжей» (парамиксовирусы), а затем транспортируются к плазматической мембране клеток. У сложных вирусов, таких, как вирусы оспы, включения образуются в цитоплазме, где они и репродуцируются. Сначала во включениях преобладают многочисленные вирусные белки нуклеоида. Позднее в них обнаруживаются пузырчатые субвирусные компоненты, а затем уже колонии вирионов.

Морфогенез оболочечных ДНК-вирусов проходит сложнее, чем безоболочечных. Так, изометрические нуклеокапсиды вируса герпеса формируются в ядрах, затем путем почкования через ядерную мембрану транспортируются в цитоплазму к аппарату Гольджи, после чего вирионы проходят через эндоплазматическую сеть аппарата Гольджи и захватывают ее мембрану. В результате вирионы имеют две оболочки: одну — ядерную и другую — цитоплазматическую. При морфогенезе оболочечных РНК-вирусов сначала в плазматическую мембрану клетки встраиваются трансмембранные гликопротеиды, а с внутренней стороны — матриксный белок. К таким модифицированным участкам плазматической мембраны транспортируются нуклеопротеиды. Свертываясь в плотные «клубки», они проходят через эти участки мембраны и покрываются ею, приобретая тем самым внешнюю оболочку (суперкапсид). Такой способ формирования вирионов и выхода их из клетки называется почкованием. Выход из клетки сложных вирионов оспы может проходить либо путем почкования через мембраны во внутриклеточные вакуоли, либо при разрушении клеток, т. е. путем «взрыва».

Контрольные вопросы

1. Чем отличаются клеточные и вирусные нуклеиновые кислоты? 2. В чем различие плюс-нитевых и минус-нитевых РНК-вирусов? 3. В чем состоит разнообразие нуклеиновых кислот у РНК-вирусов? 4. Какие белки содержат вирусы? 5. Каковы функции структурных белков вирусов? 6. Для чего вирусам нужны неструктурные белки? 7. Какова структурная организация вирионов? 8. Как происходит морфогенез вирусов?

1.2. УСТОЙЧИВОСТЬ ВИРУСОВ К ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИМ ВОЗДЕЙСТВИЯМ

Вирусы, относящиеся к разным семействам, обладают неодинаковой устойчивостью к окружающей среде. Наиболее устойчивы безоболочечные вирусы с изометрической морфологией вириона. К ним относятся, например, адено-, рео-, пикорнавирусы, которые сохраняют свою инфекционную активность в течение нескольких дней, тогда как оболочечные вирусы с плеоморфной морфологией, такие как орто- и парамиксовирусы, инактивируются на поверхностях за несколько часов. Однако имеются и исключения. Например, оболочечные вирусы оспы устойчивы к высыханию и сохраняются в экскретах многие недели и месяцы; вирус гепатита В (оболочечные гепадновирусы) устойчив к действию неблагоприятных факторов среды и сохраняет активность в сыворотке при кратковременном кипячении.

Чувствительность вирусов к разным видам излучения (УФ, рентгеновскому) зависит преимущественно от размеров генома. Так, самые крупные размеры геномов у покс-, асфа-, иридо- и герпесвирусов (от 125 до 383 kb — килобаз). Для их инактивации требуется рентгеновское облучение в дозе $5 \cdot 10^4$ рад, тогда как для папилломавирусов (7 kb) требуется уже $4 \cdot 10^5$ рад.

Чувствительность вирусов к растворителям (эфиру, ацетону, хлороформу, формальдегиду и т. д.) и другим химическим веществам зависит от целого ряда свойств, к которым относится наличие или отсутствие суперкапсидной оболочки, плотность упаковки нуклеиновой кислоты в капсид, размеры генома. Оболочечные вирусы преимущественно сферической и плеоморфной морфологии чувствительны к растворителям и детергентам, тогда как безоболочечные изометрические и бациллоформные вирусы устойчивы к их действию.

Важным свойством вирусов является их чувствительность к pH среды. В ходе эволюции у вирусов сложилась специфическая особенность репродуцироваться в клетках хозяина, находящихся в среде с определенным кислотно-щелочным соотношением. Так, рео-, корона-, пикорнавирусы, проникающие в организм хозяина алиментарным путем и вызывающие кишечные инфекции, устойчивы к низким значениям pH (2,2—3,0), однако большинство вирусов инактивируются при кислых и щелочных значениях pH.

Контрольные вопросы

1. Что понимают под архитектурой вируса? 2. Какие бывают типы симметрии вирионов? 3. Что такое внутриклеточные включения (матриксы)? 4. Каковы особенности морфогенеза оболочечных и безоболочечных вирусов? 5. Как факторы среды влияют на инфекционную активность вирусов?

1.3. КЛАССИФИКАЦИЯ И НОМЕНКЛАТУРА ВИРУСОВ

Основы классификации. Современная классификация (таксономия) вирусов, созданная Международным комитетом по таксономии вирусов (МКТВ), является Международной универсальной системой, единой для всех вирусов позвоночных, беспозвоночных, растений, грибов и бактерий. Она основана на фундаментальных свойствах вирусов, главными из которых являются признаки, характеризующие нуклеиновую кислоту, стратегию вирусного генома, а также морфологию нуклеокапсида и наличие или отсутствие липопротеидной оболочки. Все вирусы независимо от круга естественных хозяев по фундаментальным признакам занимают в классификации следующие уровни (таксоны): порядок, семейство, подсемейство, род и вид. Однако, согласно правилам МКТВ, обязательными среди них считаются таксоны: семейство, род и вид.

Основой классификации является вид вируса. Большинство видов группируются в роды, а большинство родов — в семейства. Виды, не отнесенные к роду, считаются не классифицированными внутри семейства. Роды, не отнесенные к семейству, считаются не классифицированными, или «свободными». Некоторые семейства группируются вместе в порядок. Подразделения на подсемейства проводятся только для решения сложных иерархических вопросов.

Ниже уровня вида существуют такие подразделения, как серотип, штамм, вариант, изолят. Их классификацией занимаются международные группы специалистов, которые принимают решение об отнесении того или иного изолята или группы изолятов в отдельный вид. Естественно возникающие изоляты, имеющие геном, рекомбинированный из штаммов разных видов, классифицируются как виды или подвидовые сущности. Искусственно созданные вирусы и вирусы-мутанты не включены в Международную классификацию.

Вироиды могут классифицироваться по тем же правилам, которые относятся и к вирусам.

Сателлиты, т. е. вирусы, реплицирующиеся только в присутствии вируса-помощника, и прионы не классифицируются как вирусы. Они имеют свою условную классификацию, удобную для специалистов, работающих с ними.

Характеристика таксономических уровней. Под видом понимают политетический класс вирусов, составляющих реплицирующую линию и занимающих определенную экологическую нишу. Это означает, что члены вида имеют общее происхождение (предшественника), ряд общих признаков, среди которых нет единого определяющего, что объясняет их вариабельность внутри вида и схожую биотическую среду обитания. В основе формирования вида лежат следующие критерии: феномены генетических взаимодействий; антигенные свойства; спектр естественных хозяев; клеточный тропизм; патогенность и цитопатология; пути передачи.

Род объединяет группу видов вирусов, имеющих определенные общие признаки. К ним относятся: морфология вирионов (в том числе размер, тип симметрии и число капсомеров); наличие липопротеидной оболочки; физико-химические свойства (в том числе чувствительность к растворителям, pH среды, температуре и т. д.).

Семейство объединяет группу родов, имеющих ряд наиболее постоянных общих признаков. К ним относятся: тип нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК) и ее структура (количество цепей и их форма); стратегия вирусного генома (в том числе полярность и возможность обратной транскрипции для некоторых вирусов).

Современная классификация позволила объединить все известные вирусы (имеющие таксономический статус) в три порядка, объединяющих семейства вирусов по сходной организации генома и единой стратегии репликации, 56 семейств, 9 подсемейств, 233 рода и 1550 видов. Вирусы позвоночных входят в 28 семейств,

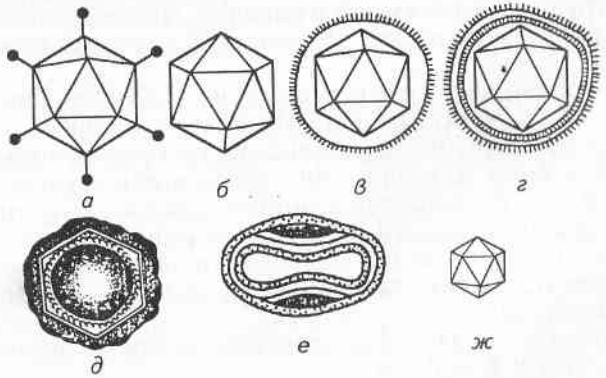


Рис. 10. Семейства ДНК-содержащих вирусов животных:

а — Adenoviridae; *б* — Papillomaviridae (55 нм), Polyomaviridae (40 нм); *в* — Hepadnoviridae; *г* — Herpesviridae; *д* — Asfaviridae (175—215 нм), Iridoviridae (125—300 нм); *е* — Poxviridae; *ж* — Parvoviridae (18—26 нм), Circoviridae (15—26 нм)

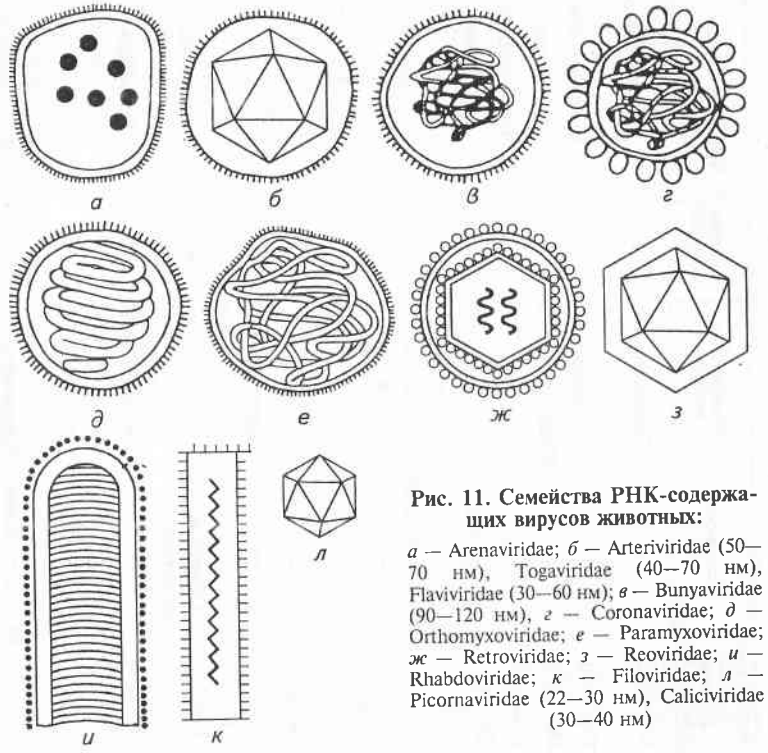


Рис. 11. Семейства РНК-содержащих вирусов животных:

а — Arenaviridae; *б* — Arteriviridae (50—70 нм), Togaviridae (40—70 нм), Flaviviridae (30—60 нм); *в* — Bunyaviridae (90—120 нм), *г* — Coronaviridae; *д* — Orthomyxoviridae; *е* — Paramyxoviridae; *ж* — Retroviridae; *з* — Reoviridae; *и* — Rhabdoviridae; *к* — Filoviridae; *л* — Picornaviridae (22—30 нм), Caliciviridae (30—40 нм)

из которых 10 ДНК-содержащие и 18 — РНК-содержащие, и в два «свободных» рода (рис. 10, 11). Некоторые из этих семейств имеют в своем составе также вирусы беспозвоночных и растений.

Исходя из того, что классификация не является раз и навсегда установленной, а предполагает периодическое внесение изменений и дополнений, то помимо ранее уже выделенных семейств вирусов позвоночных (Gepadnoviridae, Flaviviridae и Birnaviridae) в последние годы появились новые: Arteriviridae, Asfaviridae, Bornaviridae, Polyomaviridae, Papillomaviridae и два «свободных» рода: Deltavirus и «Hepatitis E- like viruses». Семейства и свободные роды вирусов приведены в таблице 3.

Некоторые вирусы обладают уникальной способностью преодолевать филогенетические барьеры и размножаться как в позвоночных, так и в беспозвоночных хозяевах (клещи, комары, москиты). Для этих вирусов членистоногие являются и естественными хозяевами, и переносчиками вирусов между позвоночными. Они составляют группу арбовирусов (вирусы позвоночных, передающихся членистоногими).

3. Подразделение семейств и свободных родов вирусов по основным таксономическим критериям

Семейство или род	Тип нуклеиновой кислоты	Структура нуклеиновой кислоты	Размер нуклеиновой кислоты (kbp или kb)	Полярность	Морфология вириона	Наличие оболочки	Чувствительность к эфиру
Poxviridae	ДНК	Двуспиральная линейная	130—375	—	Плеоморфная	+	Устойчив
Asfaviridae	ДНК	То же	170—190	—	Сферическая	+	Чувствителен
Iridoviridae	ДНК	»	140—383	—	Изометрическая	—	Устойчив
Herpesviridae	ДНК	»	125—240	—	»	+	Чувствителен
Adenoviridae	ДНК	»	28—45	—	»	—	Устойчив
Polyomaviridae	ДНК	Двуспиральная кольцевая	5	—	—	»	»
Papillomavirida	ДНК	То же	7—8	—	»	—	»
Circoviridae	ДНК	Односпиральная кольцевая	2	—	»	»	»
Parvoviridae	ДНК	То же	4—6	—	»	—	»
Hepadnaviridae	ДНК	Двуспиральная кольцевая	3	—	Сферическая	+	»
Retroviridae	РНК	Односпиральная линейная (димер)	7—12	Обратная транскрипция	»	+	Чувствителен
Reoviridae	РНК	Двуспиральная линейная фрагментированная	19—32	—	Изометрическая	—	Устойчив
Birnaviridae	РНК	То же	6	—	»	—	»
Bornaviridae	РНК	Односпиральная линейная	6	Минус-нитевая	Сферическая	+	Чувствителен
Filoviridae	РНК	Односпиральная линейная	19	То же	Бациллоформная	+	»
Paramyxoviridae	РНК	То же	15	»	Плеоморфная	+	»
Rhabdoviridae	РНК	»	11—15	»	Пулевидная	+	»
Orthomyxoviridae	РНК	Фрагментированная односпиральная линейная	10—15	»	Плеоморфная	+	»
Bunyaviridae	РНК	Фрагментированная односпиральная кольцевая	11—19	»	Сферическая	+	»
Arenaviridae	РНК	Односпиральная кольцевая	11	»	»	+	»
Deltavirus	РНК	То же	2	»	»	+	»
Picornaviridae	РНК	Односпиральная линейная	7—8	«Плюс-нитевая»	Изометрическая	—	Устойчив
Caliciviridae	РНК	То же	7—8	То же	»	—	»
«Hepatitis E-like viruses»	РНК	»	7	»	»	—	»
Astroviridae	РНК	»	7—8	»	»	—	»
Nodaviridae	РНК	»	4—5	»	»	—	»
Coronaviridae	РНК	»	27—31	»	»	+	Чувствителен
Arteriviridae	РНК	»	13—16	»	»	+	»
Flaviviridae	РНК	»	10—12	»	»	+	»
Togaviridae	РНК	»	27—31	»	»	+	»

Номенклатура вирусов. При создании названия вирусов используют специальные правила номенклатуры (от лат. nomina — наименование), сформулированные МКТВ. Так, название вида должно состоять из минимального количества слов, но не ограничиваться только словом «вирус» и названием вида хозяина. Обычно используют название болезни (вирус бешенства), а также места, где был выделен вирус (вирус болезни Тешена), или фамилию автора, описавшего инфекцию (вирус болезни Ауэски). В названиях допускаются цифры, сокращения, буквы и их сочетания.

Название рода, подсемейства, семейства и порядка обозначается одним латинизированным словом и имеет окончание: для рода — «virus», подсемейства — «virinae», семейства — «viridae», порядка — «virales». Для названия вироидов формальным окончанием в названии вида является слово «viroid», рода — окончание «viroid», подсемейства — «viroinae», семейства — «viroidae».

Контрольные вопросы

1. Какие основные критерии легли в основу современной классификации вирусов? 2. Какие таксономические уровни основные? 3. Что такое вид вируса и какие критерии лежат в его основе? 4. Какие критерии лежат в основе рода и семейства вирусов? 5. Сколько известно семейств вирусов позвоночных? 6. Какие таксономические уровни не входят в современную классификацию вирусов? 7. Какие правила существуют при создании названий основных таксономических уровней?

1.4. РЕПРОДУКЦИЯ ВИРУСОВ

Вирусы воспроизводят себе подобные частицы в таком огромном количестве и столь своеобразным способом, что это явление стали именовать репродукцией, так как здесь копируются молекулы нуклеиновых кислот и, согласно заключенной в них генетической информации, синтезируются вирусные белки.

При большом разнообразии механизмов репродукции вирусов общим для всех видов является:

во-первых, источником мономеров для синтеза нуклеиновых кислот служат нуклеотиды клетки;

во-вторых, источником мономеров для синтеза вирусных белков служат аминокислоты (аминоацил тРНК) клетки;

в-третьих, синтез белков всех вирусов осуществляется на клеточных рибосомах;

в-четвертых, источник энергии для биосинтетических процессов при репродукции всех вирусов — аденазинтрифосфорная кислота (АТФ), вырабатываемая в митохондриях клетки;

в-пятых, дисъюнктивный (разобщенный во времени и в пространстве) биосинтез структурных компонентов вирусов. Так, нуклеиновая кислота вируса может реплицироваться, например,

в ядре клетки, вирусный белок синтезируется в цитоплазме, а сборка цельных вирионов или нуклеокапсидов может происходить на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны. Наконец, сложный липопротеиновый суперкапсид может приобретаться вирусами в процессе почкования;

в-шестых, репликацию нуклеиновых кислот вирусов осуществляют ферменты — полимеразы (ДНК-полимеразы и РНК-синтетазы), которые могут быть клеточными полимеразами, присутствующими в клетке до ее заражения вирусом, либо вирусспецифическими, появляющимися после заражения клетки вирусом, так как биосинтез их закодирован в структуре нуклеиновых кислот самих вирусов или они находятся в вирионе вируса;

в-седьмых, точность копирования молекул нуклеиновых кислот при их репликации обеспечивается матричным механизмом и принципом комплементарности.

Взаимодействие вируса с клеткой хозяина — сложный и многостадийный процесс. В результате такого взаимодействия могут развиваться три основные формы клеточной инфекции: продуктивная, абортивная и интегративная.

Продуктивная форма чаще носит литический характер, т. е. заканчивается гибелью и лизисом инфицированной клетки, что происходит после полной сборки дочерней популяции инфицированных вирусных частиц. Гибель клетки могут вызвать следующие факторы: раннее подавление синтеза клеточных белков, накопление повреждающих клетку вирусных компонентов; повреждение лизосом и высвобождение их ферментов в цитоплазму. Такая форма инфекции наблюдается у многих вирусов.

Абортивная форма не завершается образованием инфекционных вирусных частиц или они образуются в гораздо меньшем количестве, чем при продуктивной инфекции. Абортивная инфекция может возникать при следующих обстоятельствах: заражение чувствительных клеток дефектным вирусом*, заражение чувствительных клеток в неразрешающих условиях, т. е. при резком изменении условий, при которых происходит инфекционный про-

* Дефектным называется такой вирус, который не способен проявить все генетические функции, необходимые для образования инфекционного потомства. Существуют дефектные вирусы и дефектные вирусные частицы. Дефектными называют такие вирусы, которые репродуцируются лишь в присутствии вируса-помощника, например аденоассоциированный вирус (семейство парвовирусов), дающий потомство только в присутствии аденовируса — помощника. Дефектные вирусные частицы лишены части генетического материала (от 10 до 90 % генома). Дефектные частицы интерферируют при репродукции с инфекционными вирусными частицами и поэтому их называют дефектными интерферирующими частицами (ДИЧ). Попадая в клетку вместе с инфекционными вирусными частицами, они конкурируют с ними за факторы репродукции и препятствуют образованию инфекционного потомства. Большое количество ДИЧ проявляется при серийном пассивировании вируса с высокой множественностью заражения.

цесс, заражение нечувствительных клеток стандартным вирусом. В результате клетка либо погибает без продукции инфекционного вируса, либо инфекция прерывается на определенном этапе.

Интегративная форма не приводит к гибели клетки. Нуклеиновая кислота вируса, встроенная в геном клетки-хозяина, функционирует как составная часть клеточного генома. Клетка может сохранить нормальные функции и при ее делении вирусные последовательности могут переходить в геном дочерних клеток. Интеграция может привести к неопластической трансформации клеток. Такие клетки приобретают способность к неограниченному делению.

Интегративная форма инфекции возможна для нескольких семейств: ретровирусов, аденовирусов, вирусов герпеса, паповавирусов и др.

Процесс репродукции вирусов может быть условно разделен на две фазы. Первая фаза охватывает события, которые ведут к адсорбции и проникновению вируса в клетку, освобождению его внутреннего компонента и модификации вируса таким образом, что он способен вызвать инфекцию. Соответственно первая фаза включает три стадии.

I. Адсорбция вируса на клетках.
II. Проникновение в клетки.
III. Раздевание вируса в клетке.

Эти стадии направлены на то, чтобы вирус был доставлен в соответствующие клеточные структуры и его внутренний компонент был освобожден от защитных оболочек. Как только эта цель достигнута, начинается вторая фаза репродукции, в течение которой происходит экспрессия вирусного генома. Эта фаза включает в себя пять стадий:

I. Транскрипция.
II. Трансляция иРНК.
III. Репликация генома.
IV. Сборка вирусных компонентов.
V. Выход вируса из клетки.

Первая фаза репродукции. **I. Адсорбция вирионов на поверхности клетки.** Прикрепление вирусных частиц к поверхности клетки-хозяина — первая стадия инфекционного процесса. Начальный контакт вируса с клеткой происходит в результате случайного столкновения по типу броуновского движения.

В основе адсорбции лежат два механизма.

Первый из них — *неспецифический*. Определяется силами электростатического взаимодействия, возникающими между разнозаряженными группами, расположенными на поверхности клетки и вируса. В этом процессе участвуют заряженные положительно аминные группы вирусного белка и кислые фосфатные, сульфатные и карбоксильные группы клеточной поверхности, имеющие отрицательный заряд.

Второй — *специфический*. Специфичность связи между вирусом и клеткой обусловлена комплементарными клеточными и вирусными рецепторами.

Процесс адсорбции возможен при наличии соответствующих рецепторов на поверхности клетки и «узнающих» их субстанций на поверхности вируса. Узнавание клеточных рецепторов вирусными белками (рецепторами), ведущее к прикреплению вирусной частицы к клетке, является *высокоспецифическим процессом*. Белки на поверхности вируса, узнающие специфические группировки на плазматической мембране клетки и обусловливающие прикрепление к ним вирусной частицы, называются прикрепительными белками (рецепторами). Рецепторы могут иметь разную химическую природу и представлять собой белки, углеводный компонент белков и липидов. Рецепторами для вирусов гриппа и парамиксовирусов является сиаловая кислота в составе гликопротеидов и гликолипидов, для рабдо- и реовирусов — также углеводный компонент в составе белков и липидов, для пикорна- и аденовирусов — белки, для некоторых вирусов — липиды. Специфические клеточные рецепторы играют роль не только в прикреплении вирусной частицы к клеточной поверхности. Они определяют дальнейшую судьбу вирусной частицы, ее внутриклеточный транспорт и доставку в определенные участки цитоплазмы и ядра, где вирус способен инициировать инфекционный процесс. Вирус может прикрепиться и к неспецифическим рецепторам и даже проникнуть в клетку, однако только прикрепление к специфическому рецептору приведет к возникновению инфекции.

Прикрепление вирусной частицы к клеточной поверхности вначале происходит путем образования единичной связи вирусной частицы с рецептором. Однако такое прикрепление непрочно, и вирусная частица может легко оторваться от клеточной поверхности (обратимая адсорбция). Для того чтобы наступила необратимая адсорбция, должны появиться множественные связи между вирусной частицей и многими молекулами рецепторов, т. е. должно произойти стабильное мультивалентное прикрепление. Количество молекул клеточных рецепторов в участках адсорбции может доходить до 3000.

Количество специфических рецепторов на поверхности клетки колеблется между 10^4 и 10^5 на одну клетку. Рецепторы ряда вирусов могут быть представлены лишь в ограниченном наборе клеток-хозяев, и этим может определяться чувствительность организма к данному вирусу. Например, вирусы полиомиелита адсорбируются только на клетках приматов. Рецепторы для других вирусов, напротив, широко представлены на поверхности клеток различных видов, как, например, рецепторы для ортомиксо- и парамиксовирусов, представляющие собой сиалилсодержащие соединения, имеют относительно широкий диапазон клеток, на которых может происходить адсорбция вирусных частиц. Рецепто-

рами для ряда тогавирусов обладают клетки широкого круга хозяев: эти вирусы могут адсорбироваться и инфицировать клетки как позвоночных, так и беспозвоночных. Вирусные ДНК и РНК обладают способностью заражать более широкий круг хозяев, чем вирусы. Максимальная скорость адсорбции вируса наблюдается лишь при определенном соотношении концентрации вируса и клеток, влиянии pH, температуры, ионного состава среды.

Адсорбция вируса на клетках происходит в широком диапазоне температур. Она протекает нормально в присутствии катионов и подавляется веществами, несущими высокий отрицательный заряд (сульфатированные полисахариды, гепарин). Для ряда оболочечных вирусов известна обратная закономерность.

Процесс адсорбции состоит из двух быстро следующих друг за другом периодов: обратимого и необратимого. Период обратимого прикрепления может закончиться десорбцией. При длительном контакте вируса с клеткой никакие воздействия не позволяют освободить адсорбированный вирус, наступает стадия необратимой адсорбции. Вирус ящура, например, адсорбируется клетками культуры почки свиней при 2—4 и 37 °С, однако при низкой температуре адсорбция вируса обратима и инфицирования клеток не происходит, так как вирус находится на поверхности клеток и легко может быть десорбирован раствором версена без нарушения целостности клеток, тогда как при 37 °С через 80—90 мин наступала полная необратимая адсорбция вируса. Количество адсорбированного вируса и число инфицированных клеток в основном зависят от множественности заражения и продолжительности адсорбции.

Адсорбированные вирусные частицы могут иметь различную судьбу: большая часть их элюируется, при этом они повреждаются, так как теряют способность к реадсорбции другими клетками и не инфицируют их; другая часть вирусных частиц проникает в клетку и подвергается дезинтеграции; небольшая часть инфекционных вирусных частиц, связанных с клеткой, остается интактной.

Прикрепительные белки могут находиться в составе уникальных органелл, таких, как структуры отростка у Т-бактериофагов или фибры у аденовирусов, которые хорошо видны в электронном микроскопе; могут формировать морфологически менее выраженные, но не менее уникальные структуры белковых субъединиц на поверхности вирусных мембран, как, например, шипы у оболочечных вирусов, «корону» у коронавирусов.

Просто организованные вирусы животных содержат прикрепительные белки в составе капсида. У сложно организованных вирусов эти белки входят в состав суперкапсида и представлены множественными молекулами. Например, у вируса леса Семлики (α-вирус) имеется 240 молекул гликопротеида в одном вирионе, у вируса гриппа — 300—450 гемагглютинирующих субъединиц, у аденовируса — 12 фибров.

Спектр чувствительности клеток к вирусам в значительной степени определяется наличием соответствующих рецепторов. Прикрепление вируса к клетке — непременное, но недостаточное условие для инфицирования, которое определяется прохождением последующих стадий репродукции вируса.

II. Проникновение вируса в клетку (рис. 12). В настоящее время известно два механизма проникновения вируса в клетку: путем рецепторного эндоцитоза и путем слияния вирусной и клеточной мембран. Оба эти механизма не исключают, а дополняют друг друга.

Рецепторный эндоцитоз происходит в специализированных участках плазматической мембраны, где имеются специальные ямки, на дне которых находятся специальные рецепторы. Ямки обеспечивают быструю инвагинацию и образование внутриклеточных вакуолей (за 1 мин образуется более 2 тыс. вакуолей), которые сливаются с цитоплазматическими вакуолями, образуя рецептосомы, а они могут сливаться с лизосомами. Эндоцитоз обеспечивает внутриклеточный транспорт вириона в составе вакуоли, освобож-

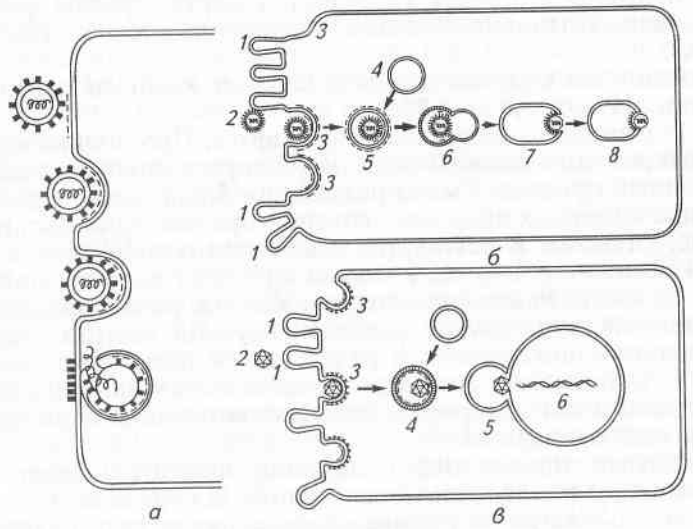


Рис. 12. Проникновение вируса в клетку:

а — проникновение вируса путем слияния оболочки с плазматической мембраной; *б* — проникновение вируса в цитоплазму путем рецепторного эндоцитоза: *1* — клеточная ворсинка; *2* — вирион; *3* — покрытая ямка, содержащая рецепторы; *4* — цитоплазматическая вакуоль; *5* — покрытая вакуоль, содержащая вирион; *6* — рецептосома, образовавшаяся в результате слияния покрытой вакуоли с цитоплазматической вакуолью; *7* — слияние вирусной оболочки со стенкой рецептосомы; *8* — выход внутреннего компонента вируса в цитоплазму; *в* — проникновение вируса в ядро посредством рецепторного эндоцитоза: *1* — клеточные ворсинки; *2* — внеклеточный вирион; *3* — адсорбция вируса на рецепторах покрытой ямки; *4* — покрытая вакуоль; *5* — образование рецептосомы и ее слияние с наружной ядерной оболочкой; *6* — высвободившаяся вирусная ДНК

дая вирусную частицу в соответствующих внутриклеточных участках. Так, например, ядерные вирусы попадают в ядро, а реовирусы — в лизосомы. Большинство вирусов животных проникает в клетку путем эндоцитоза.

Слияние вирусных и клеточных мембран. У оболочечных вирусов слияние обусловлено точечным взаимодействием вирусного белка путем слияния с липидами клеточной мембраны, в результате вирусная липопротеидная оболочка интегрирует с клеточной мембраной.

У безоболочечных вирусов один из поверхностных белков также взаимодействует с липидами клеточных мембран, в результате внутренний компонент проходит через мембрану и во внутрь клетки проникает только нуклеопротеид вириона. При данном способе проникновения функционально активный вирусный нуклеопротеид освобождается из вириона в период его прохождения внутрь клетки через плазматическую мембрану, т. е. одновременно происходит проникновение и «раздевание» вириона. Белком слияния у вирусов является один из поверхностных белков, так, у парамиксовирусов это белок (F-белок), у вируса гриппа функцию белка слияния выполняет малая гемагглютинирующая субъединица (НА2).

Большинство вирусов вызывает слияние мембран при низком значении pH — от 5,0 до 5,75.

III. Раздевание — депротеинизация вируса. Проникшие в клетку вирусные частицы должны раздеться для того, чтобы вызвать инфекционный процесс. Смысл раздевания заключается в удалении вирусных защитных оболочек, которые препятствуют экспрессии вирусного генома. В результате раздевания освобождается внутренний компонент вируса, который способен вызвать инфекционный процесс. Раздевание сопровождается рядом характерных особенностей: в результате распада вирусной частицы исчезает инфекционная активность, в ряде случаев появляется чувствительность к нуклеазам, возникает устойчивость к нейтрализующему действию антител, теряется фоточувствительность при использовании ряда препаратов.

Конечными продуктами раздевания являются сердцевины, нуклеокапсиды или нуклеиновые кислоты. Для ряда вирусов было показано, что продуктом раздевания являются не голые нуклеиновые кислоты, а связанные с внутренним вирусным белком. Например, конечный продукт раздевания пикорнавирусов — РНК, ковалентно связанная с белком VPg, конечный продукт раздевания аденовирусов, вируса полиномы и SV40 — ДНК, ковалентно связанная с одним из внутренних вирусных белков.

В ряде случаев способность вирусов вызвать инфекционный процесс определяется возможностью их раздевания в клетке данной системы. Тем самым эта стадия является одной из ограничивающих инфекцию.

Раздевание ряда вирусов происходит в специализированных участках внутри клетки (лизосомах, структурах аппарата Гольджи, околоядерном пространстве, ядерных порах на ядерной мембране). При слиянии вирусной и клеточной мембран проникновение в клетку сочетается с раздеванием.

Раздевание и внутриклеточный транспорт — взаимосвязанные процессы: при нарушении правильного внутриклеточного транспорта к местам раздевания вирусная частица попадает в лизосому и разрушается лизосомальными ферментами.

Раздевание вирусной частицы осуществляется постепенно в результате серии последовательных реакций. Например, в процессе раздевания пикорнавирусы проходят ряд стадий с образованием промежуточных субвирусных частиц с размерами от 156S до 12S. Раздевание аденовирусов происходит в цитоплазме и ядерных порах и имеет по крайней мере три стадии: 1) образование субвирусных частиц с большей плотностью, чем вирионы; 2) образование сердцевин, в которых отсутствует 3 вирусных белка; 3) образование ДНК-белкового комплекса с терминальным белком.

Вирусы оспы раздеваются в две стадии: на первой — ферменты хозяина удаляют наружное покрытие, а на второй — для освобождения вирусной ДНК из сердцевины требуется участие продуктов вирусных генов («раздевающий фермент»), синтезированных после заражения.

Вторая фаза репродукции. **I. Транскрипция.** Это переписывание информации с ДНК на РНК по законам генетического кода (цв. вкл., рис. 1). Осуществляется с помощью специального фермента (РНК-полимеразы), который связывает нуклеотиды путем образования 3′—5′-фосфодиэфирных мостиков. При инициации транскрипции РНК-полимераза связывается со специальным участком ДНК (промотором*), удвоенные спирали ДНК разъединяются и функционируют как матрицы, к которым присоединяются комплементарные нуклеотиды благодаря спариванию комплементарных оснований (аденин с тимином, урацил с аденином, гуанин с цитазином и цитазин с гуанином). Таким образом происходит постепенное удлинение (элонгация) цепи РНК (цв. вкл., рис. 2). Терминация (прекращение роста) цепи РНК происходит на специфических участках ДНК, называемых терминаторами. При этом процессе принимают участие и специальные белки ((цв. вкл., рис. 3).

Стратегия вирусного генома в отношении синтеза иРНК у разных вирусов различна. У ДНК-содержащих вирусов иРНК синте-

* Промотор — это участок молекулы ДНК, имеющий размер около 40 пар оснований и расположенный непосредственно перед участком инициации транскрипции.

зируется на матрице одной из нитей ДНК. Формула переноса генетической информации у них такая же, как и в клетке:

$$\text{ДНК} \xrightarrow{\text{транскрипция}} \text{РНК} \xrightarrow{\text{трансляция}} \text{белок}.$$

ДНК-содержащие вирусы, репродукция которых происходит в ядре, используют для транскрипции клеточную полимеразу. К этим вирусам относятся папова-, аденовирусы, вирусы герпеса. ДНК-содержащие вирусы, репродукция которых происходит в цитоплазме, не могут использовать клеточные ферменты, находящиеся в ядре. Транскрипция их генома осуществляется вирусспецифическим ферментом — ДНК-полимеразой, которая проникает в клетку в составе вириона. К этим вирусам относятся вирусы оспы и иридовирусы.

РНК-содержащие вирусы, у которых хранителем генетической информации является не ДНК, а РНК, решают эту проблему особым образом.

А. У РНК-содержащих плюс-нитевых вирусов, у которых функции иРНК выполняет сам геном, передача генетической информации осуществляется по наиболее простой формуле:

$$\text{РНК} \longrightarrow \text{белок}.$$

К этой группе вирусов относятся пикорна-, тога-, коронавирусы. У них нет необходимости в акте транскрипции для синтеза вирусспецифических белков. Поэтому транскрипцию как самостоятельный процесс у этих вирусов не выделяют.

Б. У вирусов, геном которых не может выполнять функцию иРНК (минус-нитевые вирусы). В клетке синтезируется комплементарная геному РНК, которая и является информационной. Передача генетической информации у этих вирусов осуществляется по формуле:

$$\text{РНК} \longrightarrow \text{РНК} \longrightarrow \text{белок}.$$

У этих вирусов транскрипция выделена как самостоятельный процесс в инфекционном цикле. К ним относятся две группы вирусов животных:

вирусы, геном которых представлен односпиральной РНК: ортомиксо-, парамиксо-, рабдо-, буньявирусы;

вирусы, геном которых представлен двуспиральной РНК. Среди вирусов животных к ним относятся реовирусы.

В клетке нет фермента, который может полимеризовать нуклеотиды на матрице РНК. Эту функцию выполняет вирусспецифический фермент — РНК-зависимая РНК-полимераза, или транскриптаза, которая находится в составе вирионов и вместе с ними проникает в клетку.

В. Среди РНК-содержащих вирусов животных есть семейство ретровирусов, которые имеют уникальный путь передачи генетической информации. РНК этих вирусов переписывается на ДНК, ДНК интегрирует с клеточным геномом и в его составе переписывается на РНК, которая обладает информационными функциями. Путь передачи генетической информации в этом случае осуществляется по более сложной формуле:

$$\text{РНК} \longrightarrow \text{ДНК} \longrightarrow \text{РНК} \longrightarrow \text{белок}.$$

В составе этих вирусов есть уникальный вирусспецифический фермент, который переписывает РНК на кДНК. Этот процесс называется обратной транскрипцией, а фермент — обратная транскриптаза, или ревертаза. Тот же фермент синтезирует нить ДНК на матрице ДНК. Двуспиральная ДНК после замыкания в кольцо интегрирует с клеточным геномом, и транскрипцию интегрированной ДНК в составе клеточных геномов осуществляет клеточная ДНК-зависимая РНК-полимераза.

Транскрипция вирусного генома строго регулируется на протяжении инфекционного цикла. Регуляция осуществляется как клеточными, так и вирусспецифическими механизмами. У некоторых вирусов, в основном ДНК-содержащих, существует три периода транскрипции: сверхранний, ранний и поздний. К ним относятся вирусы оспы, герпеса, папова-, адено- и иридовирусы. В результате сверхранней и ранней транскрипции избирательно считываются сверхранние и ранние гены с образованием сверхранних или ранних иРНК. При поздней транскрипции считывается другая часть вирусного генома — поздние гены с образованием поздних иРНК. Количество поздних генов обычно превышает количество ранних генов. Многие сверхранние гены являются генами для неструктурных белков (ферментов и регуляторов транскрипции) и репликации вирусного генома. Напротив, поздние гены обычно являются генами для структурных белков. Обычно при поздней транскрипции считывается весь геном, но с преобладанием транскрипции поздних генов.

Фактором регуляции транскрипции у ядерных вирусов является транспорт транскриптов из ядра в цитоплазму, к месту функционирования иРНК — полисомам.

Продуктом сверхранней транскрипции вирусов герпеса являются α-белки. Функция одного или нескольких из них необходима для транскрипции следующей группы генов, кодирующих β-белки. В свою очередь, β-белки включают транскрипцию последней группы поздних генов, кодирующих γ-белки. Такой тип регуляции получил название «каскадный».

У РНК-содержащих вирусов синтез транскриптов также строго контролируется в отношении как количества каждого класса транскриптов, так и периода инфекции, когда определенные

транскрипты синтезируются с максимальной скоростью. Синтезированные иРНК транспортируются к рибосомам.

II. Трансляция. Это — процесс перевода генетической информации, содержащейся в иРНК на специфическую последовательность аминокислот в синтезируемых вирусспецифических белках. Синтез белка в клетке происходит в результате трансляции иРНК на рибосомах. В рибосомах идет слияние потока информации (в иРНК) с потоком аминокислот, которые приносят транспортные РНК (тРНК). В клетке существует большое количество разнообразных тРНК. Для каждой аминокислоты должна быть своя тРНК.

Молекула тРНК представляет собой односпиральную РНК со сложной структурой в виде кленового листа (рис. 13).

Связывание конкретной тРНК и аминокислоты осуществляет фермент аминоацилсинтетаза. Один конец тРНК связывается с аминокислотой, а другой — с нуклеотидами иРНК, которым они комплементарны. Три нуклеотида на иРНК кодируют одну аминокислоту и называются «триплет» или «кодон», а комплементарные кодону три нуклеотида на тРНК называются «антикодоном».

Процесс транскрипции состоит из трех фаз: инициации элонгации, терминации.

Инициация трансляции — наиболее ответственный этап в процессе трансляции, основанный на узнавании рибосомой иРНК и связывании с ее особыми участками. Рибосома узнает иРНК благодаря «шапочке» (кэп) на 5′-конце и скользит к 3′-концу, пока не достигнет инициаторного кодона, с которого начинается трансляция. В эукариотической клетке инициаторными кодонами являются кодоны АУГ (аденин, урацил, гуанин), кодирующие метионин. С метионина начинается синтез всех полипептидных цепей. Специфическое узнавание рибосомой вирусной иРНК осуществляется за счет вирусспецифических инициаторных факторов.

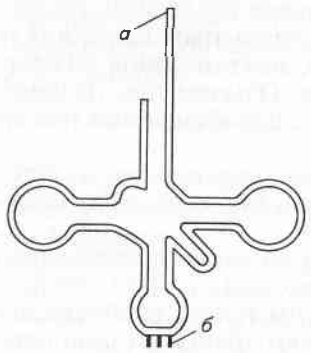


Рис. 13. Строение транспортной РНК:

а — участок связывания с аминокислотой; *б* — участок связывания с иРНК (антикодон)

Вначале с иРНК связывается малая рибосомальная субъединица. К комплексу иРНК с малой рибосомальной субъединицей присоединяются другие компоненты, необходимые для начала трансляции. Это — несколько молекул белка, которые называются «инициаторные факторы». Их, по крайней мере, три в прокариотической клетке и более девяти в эукариотической клетке. Инициаторные факторы определяют узнавание рибосомой специфических иРНК. В результате формируется комплекс, необходимый для инициации трансляции, который называется «инициаторным комплексом». В инициаторный комплекс входят: иРНК; малая рибосомальная субъединица; аминоацил-тРНК, несущая инициаторную аминокислоту; инициаторные факторы; несколько молекул ГТФ*.

В рибосоме осуществляется слияние потока информации с потоком аминокислот. Вхождение аминоацил-тРНК в А-центр большой рибосомальной субъединицы является следствием узнавания, а ее антикодон взаимодействует с кодоном иРНК, находящейся в малой рибосомальной субъединице. При продвижении иРНК на один кодон тРНК перебрасывается в пептидильный центр (П-центр), и ее аминокислота присоединяется к инициаторной аминокислоте с образованием первой пептидной связи. Свободная от аминокислоты тРНК выходит из рибосомы и может опять функционировать в транспорте специфических аминокислот. На ее место из А-центра в П-центр перебрасывается новая тРНК, и образуется новая пептидная связь. В А-центре появляется вакантный кодон иРНК, к которому немедленно присоединяется соответствующая тРНК, и происходит присоединение новых аминокислот к растущей полипептидной цепи (цв. вкл., рис. 4).

Элонгация трансляции — процесс удлинения, наращивания полипептидной цепи, основанный на присоединении новых аминокислот с помощью пептидной связи. Происходит постоянное протягивание нити иРНК через рибосому и «декодирование» заложенной в ней генетической информации. Часто иРНК функционирует одновременно на нескольких рибосомах, каждая из которых синтезирует одну и ту же полипептидную нить, кодируемую данной иРНК (цв. вкл., рис. 5).

Терминация трансляции происходит в тот момент, когда рибосома доходит до терминирующего кодона в составе иРНК (УАА, УГА, УАГ)**. Трансляция прекращается, и полипептидная цепь освобождается из полирибосомы. После окончания трансляции полирибосомы распадаются на субъединицы, которые могут войти в состав новых полирибосом.

Каждая иРНК функционирует на нескольких рибосомах. Группу рибосом, работающих на одной молекуле иРНК, называют полирибосомой или полисомой. Полисомы могут состоять от 4—6 до 20 и более рибосом.

Вирусспецифические полисомы могут быть как свободными, так и связанными с мембранами. Внутренние белки обычно син-

* ГТФ — гуанозинтрифосфат.

** Кодоны: УАА — урацил — аденин — аденин; УГА — урацил — гуанин — аденин; УАГ — урацил — аденин — гуанин.

тезируются на свободных полисомах, гликопротеиды всегда синтезируются на полисомах, связанных с мембранами.

Поскольку геном вируса животных представлен молекулой, кодирующей более чем один белок, вирусы поставлены перед необходимостью синтеза либо длинной иРНК, кодирующей один гигантский полипептид-предшественник, который затем должен быть нарезан в специфических точках на функционально активные белки, либо коротких моноцистронных иРНК, каждая из которых кодирует один белок. Таким образом, существуют два способа формирования вирусных белков:

первый — иРНК транслируется в гигантский полипептид-предшественник, который после синтеза последовательно нарезается на зрелые функционально активные белки;

второй — иРНК транслируется с образованием зрелых белков или белков, которые лишь незначительно модифицируются после синтеза.

Первый способ трансляции характерен для РНК-содержащих плюс-нитевых вирусов — пикорнавирусов и тогавирусов. Их иРНК транслируется в гигантскую полипептидную цепь, так называемый полипротеид, который сползает в виде непрерывной ленты с рибосомного «конвейера» и нарезается на индивидуальные белки нужного размера. Нарезание вирусных белков — многоступенчатый процесс, осуществляемый как вирусспецифическими, так и клеточными протеазами.

Второй способ формирования белков характерен для ДНК-содержащих вирусов и большинства РНК-содержащих вирусов. При этом способе синтезируются короткие моноцистронные иРНК в результате избирательной транскрипции одного участка генома (гена). Однако эти вирусы широко используют механизм посттрансляционного нарезания белка.

В эукариотической клетке многие белки, в том числе вирусные, подвергаются посттрансляционным модификациям, зрелые функционально активные белки часто неидентичны их вновь синтезированным предшественникам. Широко распространены такие посттрансляционные ковалентные модификации, как гликозилирование, ацилирование, метилирование, сульфирование (образование дисульфидных связей), протеолитическое нарезание и, наконец, фосфорилирование. В результате вместо 20 генетически закодированных аминокислот из различных клеток разных органов эукариотов выделено около 140 дериватов аминокислот.

Гликозилирование. В составе сложно устроенных РНК- и ДНК-содержащих вирусов имеются белки, содержащие ковалентно присоединенные боковые цепочки углеводов, — гликопротеиды. Гликопротеиды расположены в составе вирусных оболочек и находятся на поверхности вирусных частиц.

Гликозилирование полипептидов — сложный многоступенчатый процесс, первые этапы которого начинаются уже в процессе

синтеза полипептидов, и первый углеводный остаток присоединяется к полипептидной цепи, еще не сошедшей с рибосомы. Последующие этапы гликозилирования происходят путем последовательного присоединения углеводных остатков к углеводной цепочке в процессе транспорта полипептида к плазматической мембране. Углеводные остатки присоединяются по одному, и только при инициации синтеза олигосахаридной цепи переносится «блок». Окончательное формирование углеводной цепочки может завершаться на плазматической мембране перед сборкой вирусной частицы.

Гликозилирование влияет на транспорт, более того, транспорт неразрывно связан для гликопротеидов со стадийным гликозилированием. Убедительным доказательством этого служит влияние на вирусную репродукцию ингибиторов гликозилирования; они полностью подавляют транспорт полипептидов, не нарушая и не ингибируя их синтеза.

При подавлении гликозилирования соответствующими ингибиторами (аналоги сахаров типа 2-дезоксиглюкозы, антибиотик туникамицин) блокируется сборка вирионов миксо-, рабдо-, α-вирусов или образуются неинфекционные вирионы вирусов герпеса и онковирусов.

Сульфирование. Некоторые белки сложно устроенных РНК- и ДНК-содержащих вирусов сульфируются после трансляции. Чаще всего сульфированию подвергаются гликопротеиды, при этом сульфатная группа связывается с углеводными остатками гликопротеида.

Ацилирование. Ряд гликопротеидов сложно устроенных РНК-содержащих вирусов (НА2 вируса гриппа, белок G вируса везикулярного стоматита, белок HN вируса ньюкаслской болезни и др.) содержат ковалентно связанные 1—2 молекулы жирных кислот.

Нарезание. Многие вирусные белки, и в первую очередь гликопротеиды, приобретают функциональную активность лишь после того, как произойдет их нарезание в специфических точках протеолитическими ферментами. Нарезание происходит либо с образованием двух функциональных белковых субъединиц (например, большая и малая субъединицы гемагглютинина вируса гриппа, два гликопротеида (Е2 и Е3) вируса леса Семлики), либо с образованием одного функционально активного белка и неактивного фермента, например белки F и HN парамиксовирусов. Нарезание обычно осуществляется клеточными ферментами. У многих сложно устроенных вирусов животных, имеющих гликопротеиды, нарезание необходимо для формирования активных прикрепительных белков и белков слияния и, следовательно, для приобретения вирусами способности инфицировать клетку. Лишь после нарезания этих белков вирусная частица приобретает инфекционную активность. Таким образом, можно говорить о протеолити-

ческой активации ряда вирусов, осуществляемой с помощью клеточных ферментов.

Фосфорилирование. Фосфопротеиды содержатся практически в составе всех вирусов животных — РНК- и ДНК-содержащих, просто и сложно устроенных. В составе большинства вирусов обнаружены протеинкиназы, однако фосфорилирование может осуществляться как вирусными, так и клеточными ферментами. Обычно фосфорилируются белки, связанные с вирусным геномом и осуществляющие регулирующую роль в его экспрессии. С процессом фосфорилирования связан механизм активного действия интерферона.

Фосфорилирование белков играет регулирующую роль в транскрипции и трансляции вирусных иРНК, специфическом узнавании вирусных иРНК рибосомой, белок-нуклеиновом и белок-белковом узнавании на стадии сборки вирусных частиц.

III. Репликация. Это — синтез молекул нуклеиновой кислоты, гомологичных геному.

Различные вирусы имеют разные типы вирусного генома. Так, у ДНК-содержащих вирусов различают: двуспиральную линейную ДНК (адено-, герпес-, поксвирусы;), двуспиральную кольцевую ДНК (паповавирусы); односпиральная линейная ДНК (парвовирусы). У РНК-содержащих вирусов различают: двуспиральную сегментированную РНК (реовирусы); односпиральную плюсРНК (пикорна-, кальци-, тога-, флави-, коронавирусы); односпиральную минусРНК (ортомиксо-, парамиксо-, рабдо-, фило-, буньявирусы); односпиральную плюсРНК-матрицу для синтеза ДНК-провируса (ретровирусы). Особенности механизма репликации вирусов зависят от типа вирусного генома.

Репликация вирусов в двуспиральной ДНК сходна с репликацией клеточной ДНК. Репликация происходит на расплетенных участках ДНК и идет одновременно на обеих нитях от 5′-конца к 3′-концу. Репликацию осуществляют ДНК-полимеразы. Каждая вновь синтезированная молекула ДНК состоит из одной родительской и одной вновь синтезированной нити (рис. 14, 15, цв. вкл. рис. 6).

При репликации вирусов с односпиральной ДНК происходит образование двуспиральных форм, которые представляют собой промежуточные репликативные формы, на минус-нитях которых синтезируются дочерние плюс-нити ДНК.

У вирусов, геном которых представлен односпиральной РНК, ее репликация происходит по следующей схеме: на вирионной РНК синтезируется комплементарная ей РНК (образуется репликативная форма РНК), затем на комплементарной РНК синтезируется комплементарная ей, но идентичная исходной вирусная РНК (рис. 16—19).

В клетках нет ферментов, способных осуществлять репликацию РНК, поэтому ферменты, участвующие в репликации, всегда вирусспецифические.

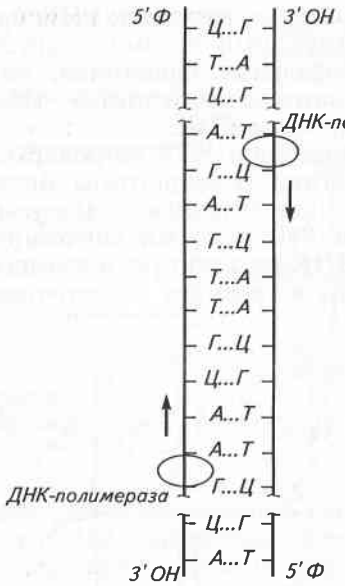


Рис. 14. Антипараллельная ориентация цепочек ДНК

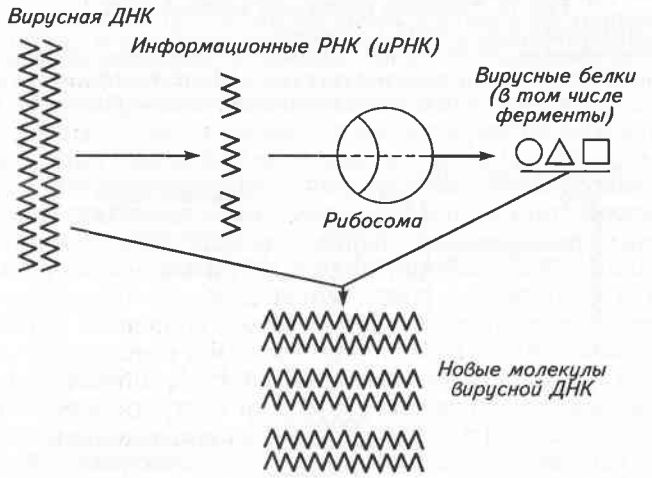


Рис. 15. Схема репликации двуспиральных молекул вирусных ДНК при передаче генетической информации в рибосомы

Репликация двуспиральных вирусных РНК происходит следующим образом: на минус-нити геномной двуспиральной РНК синтезируются односпиральные плюс-нити, которые являются иРНК и матрицей для синтеза минус-нитей, в результате образуются двуспиральные вирусные РНК.

Репликация односпиральной РНК ретровирусов происходит с участием фермента обратной транскриптазы. Вначале на вирусной РНК синтезируется комплементарная ей минус-нить ДНК, а затем (после разрушения РНК) на ней синтезируется плюс-нить ДНК. Двуспиральная ДНК интегрирует в хромосому клетки. Вирусспецифическая ДНК, встроенная в клеточный геном, транс-

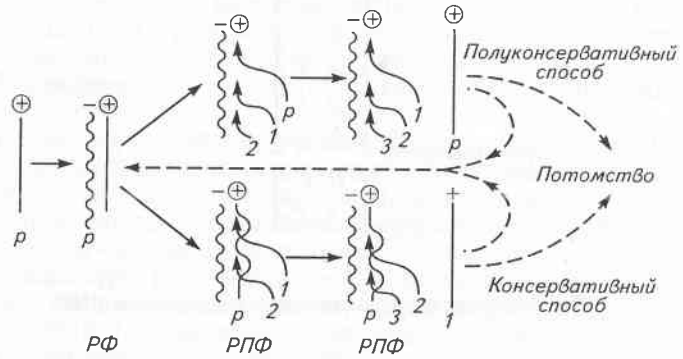


Рис. 16. Механизм репликации вирусной РНК:

изображены репликативная форма (РФ) и репликативная промежуточная форма (РПФ). Последняя является комплексом минус-цепи с одновременно синтезирующимися несколькими (вероятно, шестью) плюс-цепями. Механизм дан в двух вариантах: консервативном и полуконсервативном; *1, 2, 3* — вновь синтезированные нити РНК

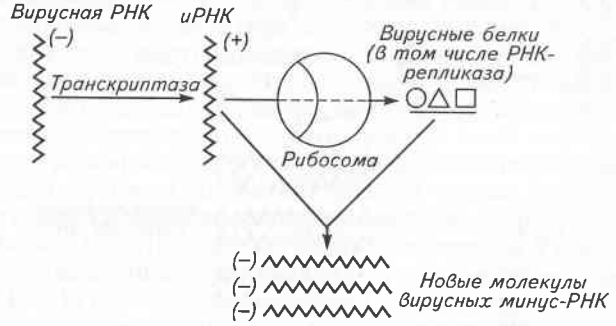


Рис. 17. Схема репликации вирусных минус-РНК и передача генетической информации в рибосомы

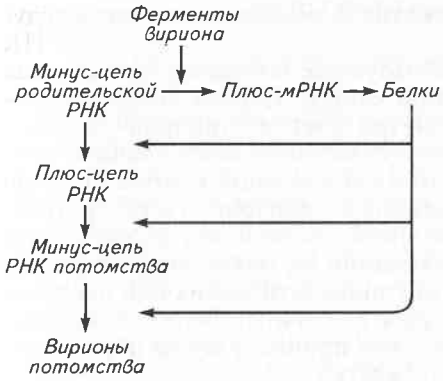


Рис. 18. Размножение орто- и парамиксовирусов

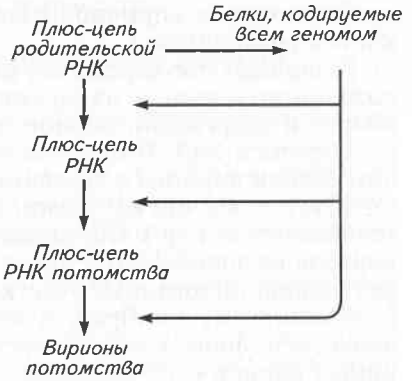


Рис. 19. Размножение пикорнавирусов

крибируется с образованием вирусной РНК, которая вначале выполняет функции иРНК, направляя синтез вирусспецифических белков, а затем соединяется с ними, формируя новое поколение вирионов.

Синтез РНК может осуществляться по одному из двух механизмов: 1) консервативному, при котором полинуклеотидные цепи, входящие в состав репликативной формы РНК, сохраняются (консервируются) и не переходят в односпиральную форму; 2) образование плюс-нитей может происходить асимметрическим полуконсервативным путем, когда вновь строящаяся плюс-нить вытесняет ранее синтезированную плюс-нить из репликативной формы РНК (см. рис. 16).

IV. Сборка вирусных частиц. Синтез компонентов (нуклеиновых кислот и белков) вирусных частиц в клетке разобщен и может протекать в разных структурах ядра и цитоплазмы (цв. вкл., рис. 7). Как только их концентрация достигнет определенного уровня, начинается сборка вирионов. При таком дисъюнктивном способе репродукции образование вирусных частиц возможно лишь при специфическом узнавании вирусных нуклеиновых кислот и белков и самопроизвольного их соединения друг с другом, т. е. вирусные компоненты способны к самосборке в результате гидрофобных, ионных, водородных связей и стерического соответствия.

Разнообразие структуры вирусов отражается на способе их формирования и выходе из клетки. У просто устроенных вирусов формируются провирионы, которые затем в результате модификаций белков превращаются в вирионы. У сложно устроенных вирусов сборка осуществляется многоступенчато — сначала формируются нуклеокапсиды, или сердцевины, с которыми взаимодействуют белки наружных оболочек. Сборка нуклеотидов, сердцевин,

провирионов и вирионов происходит в специальных структурах клетки («фабриках»).

Различают две стратегии, используемые вирусами при сборке, созревании и выходе из зараженной клетки. Первая заключается в сборке и созревании вирионов внутри клетки (пикорна-, адено-, реовирусы и др.). Вторая состоит в сочетании завершающей стадии сборки вириона с выходом его из зараженной клетки. Она используется обычно вирусами, имеющими оболочку (тога-, ретро-, герпесвирусы и др.). Образование зрелых вирионов у оболочечных вирусов осуществляется при почковании их нуклеопротеидов через модифицированные участки цитоплазматических или ядерных (герпесвирусы) мембран, в которых клеточные белки заменены вирусспецифическими. Во время этого процесса вновь образовавшийся вирион отпочковывается от клетки.

Дозревание ретровирусов происходит после отпочковывания от плазматической мембраны клетки.

Число инфицированных вирусных частиц, образуемых в одной клетке, зависит от типа вируса, вида клеток, и количество их варьирует очень широко. Считают, что на долю вирусспецифических продуктов приходится от 0,1 до 5 % массы клетки животного, а на бактериофаги — до 40 % массы клетки хозяина. В инфицированных клетках вирусные нуклеиновые кислоты и вирусспецифические белки синтезируются в значительно большем количестве, чем включаются в вирионы.

V. Выход вирусных частиц из клетки. Существует два способа выхода вирусного потомства из клетки: путем взрыва и путем почкования. Выход из клетки путем взрыва связан с деструкцией клетки, нарушением ее целостности, в результате чего находящиеся внутри клетки зрелые вирусные частицы оказываются в окружающей среде. Такой способ выхода из клетки присущ вирусам, не содержащим липопротеидной оболочки (пикорна-, рео-, парво-, папова-, аденовирусы). Однако некоторые из этих вирусов могут транспортироваться на клеточную поверхность до гибели клетки.

Выход из клетки путем почкования присущ вирусам, содержащим липопротеидную мембрану, которая является дериватом клеточных мембран. При этом способе клетка может длительное время сохранять жизнеспособность и продуцировать вирусное потомство, пока не произойдет полное истощение ее ресурсов.

Контрольные вопросы

1. Каковы особенности механизмов репродукции вирусов? 2. Какие типы взаимодействия вируса с клеткой вам известны? 3. Какие фазы и стадии выделяют при репродукции вирусов? 4. Как происходит транскрипция у ДНК-, РНК-содержащих вирусов и ретровирусов? 5. В чем состоит посттрансляционная модификация вирусных белков? 6. Каковы общие принципы сборки вирионов и способы их выхода из клетки?

1.5. ГЕНЕТИКА ВИРУСОВ

1.5.1. СТРУКТУРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ГЕНОМА ВИРУСОВ

Подобно другим инфекционным агентам вирусы содержат генетическую информацию в форме последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК), играющей роль хромосомы. Отдельные участки нуклеиновой кислоты, ответственные за синтез РНК или полипептидов, получили название *ген*; совокупность генов одного организма — *геном*.

По структуре различают *цельный* (рабдо-, пикорнавирусы) и *фрагментированный* (рео-, орто-, тогавирусы) геномы вирусов. У вирусов с фрагментированным геномом каждый фрагмент представляет собой один ген, число которых значительно варьирует. Например, простые полиомавирусы содержат от 3 до 5 генов; пикорнавирусы — 6—8 генов. У сложного вируса бактериофага Т4 более 30 генов контролируют синтез белков оболочки и не менее 15 — синтез нуклеотидных предшественников.

Геном вирусов гаплоидный, т. е. содержит одну молекулу нуклеиновой кислоты. Исключение составляют представители ретровирусов, имеющих диплоидный геном (две идентичные молекулы РНК).

Как у эукариотических организмов, фрагментированный геном вирусов имеет мозаичную структуру. Кодирующие смысловые фрагменты нуклеиновой кислоты (*экзоны*) чередуются с некодирующими (*интроны*) (рис. 20).

Процесс транскрипции (синтез молекулы РНК на матрице ДНК) находится под контролем двух основных регуляторных элементов: *промотора* — участок ДНК, с которым связывается фермент РНК-полимераза и происходит инициация транскрипции генов; *терминатора* — участок ДНК, в котором РНК-полимераза отсоединяется от цепи и прекращается транскрипция. После образования первичного транскрипта происходит удаление (*сплайсинг*) интронов и формируется функциональная иРНК.

Приведенный механизм широко распространен среди ДНК-содержащих вирусов, у которых транскрипция происходит в ядре (адено-, герпес-, паповавирусы), где находятся необходимые ферменты.

Сплайсинг первичного транскрипта и образование функциональной иРНК обнаружен и у РНК-содержащих вирусов. Например, у представителей ортомиксовирусов происходит сплайсинг транскриптов 7-го и 8-го генов, продуктами каждого являются по два уникальных белка.

При трансляции (синтез полипептидной цепи на матрице РНК) у многих вирусов молекулярная масса синтезируемых белков превышает теоретически рассчитанную. Этот феномен объясняется наличием различных механизмов, позволяющих получить

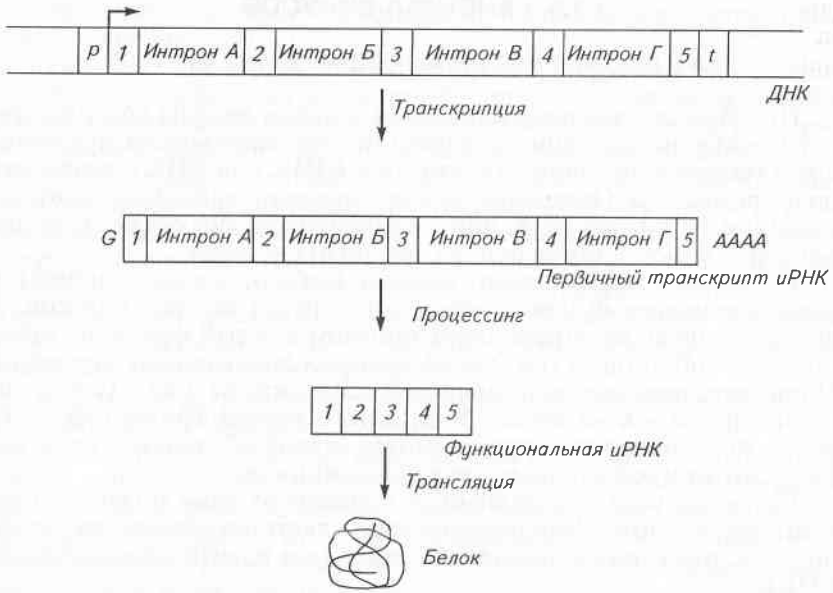


Рис. 20. Схема функционирования эукариотического гена

развернутую генетическую информацию при максимальной экономии генетического материала. Подобные механизмы выработаны в процессе эволюции вирусов как паразитов генетического уровня.

Способы увеличения генетической информации:

1) двукратное считывание одной иРНК, но с другого инициирующего кодона. В составе иРНК встречается несколько инициирующих АУГ-кодонов. Присоединяясь к матрице в области 5′-конца, малая рибосомальная субъединица продвигается по иРНК, пока не встретится с АУГ-кодоном. Специфичный инициирующий кодон узнается рибосомой благодаря окружающим его последовательностям нуклеотидов (фланкирующие последовательности). Если первый АУГ-кодон окружен неспецифическими последовательностями, то инициации трансляции может не произойти, и рибосома продвигается по цепи до следующего АУГ-кодона. Однако некоторые субъединицы начнут инициацию с первого АУГ-кодона. В этом случае одна иРНК может направить синтез двух белков разной длины. Такой механизм характерен для адено-, герпес-, бунья-, реовирусов и др.;

2) сдвиг рамки считывания при трансляции. Трансляция может происходить без сдвига рамки и со сдвигом ее. Генетический код является триплетным, т. е. три нуклеотида, составляющих кодон

(триплет), кодируют одну аминокислоту. Если сдвига рамки не происходит, триплеты сохранены и генетический код не изменился, то при трансляции с двух разных АУГ-кодонов будут синтезироваться полипептиды, представляющие собой укороченный участок первого полипептида. В случае сдвига рамки считывания на один или два нуклеотида меняется смысл всех кодонов, расположенных за местом сдвига. При этом одна молекула иРНК может транслироваться с образованием двух уникальных белков, у которых неидентичные аминокислотные последовательности. Такой механизм характерен для ортомиксо-, бунья-, адено-, папова-, парвовирусов и др. Например, при нарушении рамки считывания иРНК 7-го и 8-го генов вируса гриппа (ортомиксовирусы) образуются два полипептида: М1 и М2 (продукты 7-го гена) и NS1 и NS2 (продукты 8-го гена). Белки NS1 и NS2 содержат только первые 10 идентичных аминокислот, далее — уникальные аминокислотные последовательности;

3) сплайсинг. При нарезании полипептида-предшественника на участки разной длины, образуются разные полипептиды с перекрывающимися аминокислотными последовательностями. Подобный механизм нарезания имеет место у аденоассоциированных вирусов (парвовирусы) и у вируса SV40 (парвовирусы);

4) транскрипция с перекрывающихся областей ДНК. Таким образом, общее число триплетов в составе молекулы нуклеиновой кислоты может быть меньше суммы числа триплетов, входящих в состав всех генов.

В результате перекрывания генов и нарушения рамки считывания понятие «ген» в известном смысле утрачивает первоначальное значение как дискретный фрагмент генома и приобретает функциональное значение.

Генотип вирусов зависит от структуры генетического материала (ДНК или РНК) и является постоянным свойством, изменяющимся под действием мутаций, происходящих в геноме.

Фенотип вирусов (совокупность внешних и внутренних признаков и функции данного вируса) не является постоянным свойством и может изменяться как в результате мутаций, так и под влиянием внешних условий.

1.5.2. НАСЛЕДСТВЕННОСТЬ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ ВИРУСОВ

Наследственность — это свойство организмов обеспечивать материальную и функциональную преемственность между поколениями, а также обусловливать специфический характер индивидуального развития. Изменчивость — свойство, противоположное наследственности. Изменчивость вирусов обусловлена мутацией генов, сочетанием их при рекомбинации и различным проявлением признаков, зависящим от внешних условий (модификационная изменчивость).

Генетические признаки (маркеры) вирусов. Все признаки вирусов, информация о которых закодирована в генах, называются генетическими. При этом многие признаки обычно обусловливаются несколькими генами.

Генетические признаки (маркеры) у штаммов определяют после предварительного их клонирования. Все их условно разделяют на основные группы:

групповые и видовые: тип и морфология нуклеиновой кислоты; тип капсида и количество капсомеров; антигенная специфичность; устойчивость к органическим растворителям и детергентам; наличие фермента нейраминидазы и антигенов хозяина; гемагглютинирующие свойства; патогенность для определенного вида живых чувствительных систем;

внутриштаммовые: гемагглютинирующая активность; терморезистентность; отношение к УФ-лучам, ингибиторам; характер бляшек и др.

Для проведения генетических исследований наибольшее значение имеют внутривидовые признаки, позволяющие дифференцировать варианты (мутанты, рекомбинанты) между собой.

В большинстве исследований генетические признаки обозначаются начальными буквами латинского алфавита с добавлением знака «+» или «–», т. е. наличие или отсутствие того или иного свойства. Отдельные признаки, например нейровирулентность (N), обозначаются двумя буквами в зависимости от вида животного, на котором проявляется это свойство: нейровирулентность для обезьяны — monN, нейровирулентность для мышей — mN и т. п.

Пока еще трудно унифицировать номенклатуру генетических признаков, поэтому для каждой группы вирусов оправдана специфическая символика их. Однако ряд признаков уже может иметь общие обозначения для всех видов вирусов.

Виды мутации вирусов. Вирусы изменяют свои свойства как в естественных условиях при репродукции, так и в эксперименте. В основе наследственных изменений свойств вирусов лежат два процесса:

мутация — изменение последовательности нуклеотидов в определенном участке генома вируса, ведущее к изменению фенотипических свойства;

рекомбинация — обмен генетическим материалом между двумя близкими, но отличающимися по наследственным свойствам вирусами.

Классификация мутаций.

По механизму:

1) делеция — выпадение одного или нескольких нуклеотидов;
2) встраивание одного или нескольких нуклеотидов;
3) замена одного нуклеотида другим.

По длине измененной последовательности нуклеотидов:

1) точечная замена одного нуклеотида (РНК-содержащие вирусы) или одной пары комплементарных нуклеотидов (ДНК-содержащие вирусы). Такие мутации могут иногда восстанавливаться (ревертировать) до исходной структуры генома. Не всегда точечные мутации приводят к изменению фенотипа. Одна из основных причин, в силу которых такие мутации могут не проявляться, — это вырожденность генетического кода, т. е. кодирование одной аминокислоты несколькими триплетами. Поэтому структура белка и его биологические свойства не нарушатся. Если аминокислота кодируется только одним триплетом, то в этом случае в белок включается какая-нибудь иная аминокислота, что может привести к появлению мутантного признака;

2) аберрация — замена значительного участка генома. Аберрации у вирусов обусловлены делециями различного числа нуклеотидов: от одной пары до последовательности, которая детерминирует одну или несколько функций вируса.

По обратимости:

1) необратимые (прямые) мутации, при которых изменяется фенотип. Частота таких мутаций у вирусов колеблется в широких пределах. Это зависит от клеточной системы, в которой происходит развитие вирусной популяции. Одновременно клеточная система может являться и фактором селекции. Мутанты, возникающие в популяции, не остаются генетически чистыми линиями, а иногда могут быстро размножаться и практически полностью вытеснить остальные составляющие популяции;

2) обратимые мутации:

истинные реверсии, при которых обратная мутация происходит в месте первичного повреждения; псевдореверсии, при которых мутация происходит в другом участке дефектного гена (интрагенная супрессия мутации) или в другом гене (экстрагенная супрессия мутации). Реверсии не являются редкими событиями, так как измененные организмы обычно более приспособлены к данной клеточной системе.

По природе:

1) спонтанные мутации, которые в живой природе возникают чрезвычайно редко и под влиянием причин, трудно устанавливаемых в каждом отдельном случае. Такие изменения в популяции вирусов возникают без внешнего воздействия. Однородных популяций не бывает, поэтому в вирусной популяции в процессе ее развития спонтанные мутанты возникают с определенной вероятностью. Частота мутаций одного и того же признака может быть различной в зависимости от штамма.

Возникать спонтанные мутации могут в результате (по Уотсону и Крику, 1953):

а) таутомерного превращения (перегруппировок) оснований, входящих в состав нуклеиновой кислоты. Например, таутомерный сдвиг в положении атома водорода у аденина приводит к тому, что аденин при репликации спаривается не с тимином, а с гуанином. При спаривании оснований ошибка приводит в последующих репликациях к замене пары АТ и ГЦ.

Спонтанные мутации, возникшие в одном и том же гене, распределяются по его длине неравномерно. Одни участки гена изменяются часто («горячие» точки), другие — редко. Поэтому вероятность ошибок при спаривании оснований в различных участках гена различна. Это может быть связано с определенной конформацией нуклеиновой кислоты: отдельные нуклеотиды могут с большей степенью вероятности подвергаться таутомерному превращению, чем другие;

б) ошибок в работе ферментов: ДНК- или РНК-полимераз.

Примеры спонтанных мутаций.

1. *Природная изменчивость антигенной структуры (гемагглютинина и нейраминидазы) вирусов гриппа человека и животных (в том числе птиц), на примере штаммов типа А2.* Исходные штаммы типа А2 не различались между собой по антигенной структуре, гемагглютинирующей активности, термостабильности, способности репродукции при 40 °С и переходу в индикаторное состояние. (Индикаторный вирус — вирус, позволяющий выявить в культуре клеток другой нецитопатогенный вирус.) Позже штаммы, относящиеся к антигенным подгруппам А2/1, А2/2 и А2/3 (выделенные с 1968 по1970 г.), показали изменение антигенной структуры и других биологических свойств этого возбудителя. Вначале исчезли ингибиторорезистентные штаммы, а затем ингибиторорезистентные варианты из смешанной популяции чувствительных к ингибиторам штаммов.

2. Гемагглютинин и нейраминидаза вируса гриппа претерпевают изменения, независимые друг от друга. Например, вирус гриппа птиц, выделенный от индеек в штате Висконсин (США), содержал нейраминидазу, антигенно родственную нейраминидазе вирусов гриппа человека А2/Гонконг/68 и не схожий гемагглютинин, тогда как вирус гриппа, выделенный от свиньи на о. Тайвань, содержал антигены гемагглютинина и нейраминидазы, родственные антигенам вируса гриппа человека А2/Гонконг/68.

3. Известно 11 сероваринтов вируса ящура (сем. пикорнавирусы) у типа О, 32 сероварианта у типа А, 5 — у типа С, 7 — у типа Sat-1 и по 3 — у типов Sat-2 и Sat-3. Штаммы вируса ящура типа Азия 1 также неоднородны по антигенной структуре.

4. *Повышение или ослабление вирулентности возбудителя.* Изменения могут происходить в короткие сроки, поскольку жизненный цикл вирусов несравненно короче жизненного цикла хозяев. Известно наличие большого числа патогенных вариантов штаммов вируса болезни Ньюкасла (парамиксовирусы). При первом появлении болезнь в Европе протекала остро, с высоким процентом гибели птиц. В настоящее время все чаще регистрируются очаги с низкой летальностью и легким течением болезни. Происходит не только снижение количества очагов, но и аттенуация эпизоотических штаммов, что позволило выделить природно-ослабленные вакцинные штаммы Bl, La Sota, F, Бор/74/ВГНКИ.

5. Имеются сообщения о выделении природно-ослабленных штаммов вирусов чумы свиней (штамм Мияги), болезни Ауески (штамм Русс), миксомы кроликов и клещевого энцефалита;

2) индуцированные мутации, которые возникают при действии на вирус (вирион или вегетативную форму) различными химическими и физическими мутагенами, а также при адаптации вируса

к необычным биологическим системам (адаптационная изменчивость).

После определения наследственных единиц вируса возникла перспектива получения живых вакцинных штаммов непосредственным воздействием на них физическими или химическими мутагенами, вызывающими структурные и функциональные изменения в молекуле вирусной кислоты. Применение искусственных мутагенов имеет два преимущества:

они вызывают мутации в десятки и сотни раз эффективнее природных факторов;

действие искусственных мутагенов имеет известную направленность; можно заранее предвидеть, на какие элементы структуры нуклеиновых кислот и каким образом действует тот или иной мутаген и какие изменения в них вызовет.

Химические мутагены. По классификации Фриза (1960) химические мутагены разделяют на две основные группы:

1) мутагены, реагирующие с нуклеиновой кислотой только во время ее репликации (аналоги пуриновых и пиримидиновых оснований);

2) мутагены, реагирующие с покоящейся молекулой нуклеиновой кислоты. Однако для формирования мутаций необходимы последующие репликации молекулы (азотистая кислота, гидроксиламин, алкилирующие соединения).

Молекулярные механизмы мутагенного действия химических соединений подразделяются на две основные группы (по Е. Фризу):

1) замена основания, которая бывает двух типов: а) простая *(транзиция)*, когда на место одного пуринового основания встает другое (например, вместо аденина — гуанин) или одно пиримидиновое основание заменяется другим (цитозин — урацилом). Такие замены происходят при индукции мутаций азотистой кислотой, рядом алкилирующих соединений и гидроксиламином;

б) сложная *(трансверсия),* при которой вместо одного пуринового основания появляется пиримидиновое или пиримидиновое основание заменяется пуриновым. Трансверсии происходят при индукции мутаций этилэтансульфонатом;

2) выпадение (делеция) или вставка основания, которое ведет к более глубоким изменениям генетического кода, чем простая замена оснований. Мутационные повреждения в одном участке генома нередко приводят к изменению нескольких генетических признаков, имеющих различное фенотипическое проявление (плейотропия). В то же время основой изменения генетического признака, имеющего одно и то же фенотипическое выражение (например, способность размножаться при повышенной температуре), могут быть мутационные повреждения различных генов.

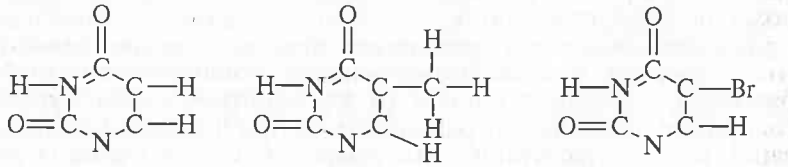
Мутагенное действие аналогов азотистых оснований (5-бромурацил, 5-фторурацил, 5-йодурацил, 2-аминопурин, 2,6-ди-аминопурин) заключается в том, что они индуциру-

ют мутации только при воздействии на реплицирующиеся молекулы ДНК и РНК. Наиболее хорошо изучены 5-бромурацил и 2-аминопурин. Тимин является урацилом, у которого атом водорода (Н) в одной из СН-групп заменен метильной группой (CH_3) — метилурацил. Однако в урациле этот атом водорода можно заменить и другим атомом, например атомом брома (Вг). В результате такой замены получается новое соединение — бромурацил, который является аналогом тимина. Структура основного кольца у обоих соединений совершенно одинакова, а различие заключается лишь в одной группе (Вг вместо CH_3), как это показано на рисунке 21.

Мутации, индуцируемые алкилирующими соединениями, проявляются простыми (транзиция) и сложными (транверсия) заменами в молекуле нуклеиновой кислоты. Из ДНК удаляются пурины (в основном гуанин), и в зависимости от того, какой нуклеотид встретится напротив бреши при репликации, либо возникает мутация типа замены, либо не возникает ее совсем. К данной группе веществ относятся алкилирующие соединения — иприт и его аналоги, этиленимин и его аналоги — этилметансульфонат и этилэтансульфонат и др. Этилметансульфонат и этилэтансульфонат вызывают алкилирование гуанина и в меньшей степени аденина. Это приводит к гидролизу связи между пуриновым основанием и сахаром и утрате пуринового основания. Мутагенное действие этих соединений было показано с вирусами болезни Ньюкасла и клещевого энцефалита.

Мутагенное действие гидроксиламина заключается в образовании простых замен оснований в молекуле нуклеиновой кислоты (направление зависит от типа нуклеиновой кислоты вируса). У ДНК-содержащих вирусов этот мутаген реагирует исключительно с цитозином. У РНК-содержащих вирусов он вступает в реакцию как с цитозином, так и с урацилом, что обусловливает замены цитозина на урацил и наоборот.

С помощью гидроксиламина были индуцированы мутации у вирусов герпеса, болезни Ньюкасла, полиомиелита. Спонтанные мутанты вируса обычного герпеса (по признаку чувствительности к ингибиторам агара) не способны ревертировать под действием гидроксиламина и, следовательно, обусловлены заменой ГЦ на АТ.



Урацил Тимин Бромурацил

Рис. 21. Формулы урацила, тимина и бромурацила

Синтезирован и изучен один из аналогов гидроксиламина — оксиметилгидроксиламин, реагирующий только с цитозином, но не с урацилом РНК, т. е. обладающий более высокой специфичностью и одной направленностью мутагенного действия.

К веществам, химически изменяющим основания в покоящейся молекуле нуклеиновой кислоты, относится также гидразин, который действует только на пиримидиновые основания.

Мутагенное действие интеркалирующих агентов заключается в способности соединений встраиваться между витками молекулы ДНК — явление интеркаляции. При внедрении акридина между основаниями ДНК изменяется расстояние между ними на 0,34—0,7 нм. Мутагенное действие акридина изучено главным образом на бактериофагах.

У вирусов человека и животных с помощью профлавина индуцированы различные типы мутаций при воздействии на внутриклеточный вирус полиомиелита, клещевого энцефалита и оспы коров. В сочетании с видимым светом красители акридинового ряда обладают выраженным летальным действием на ДНК-содержащие вирусы.

Мутагенным действием обладают нитрозосоединения (N-нитрозометилмочевина, N-нитрозоэтилмочевина, N-метил-N-1-нитро-N-нитрозогуанидин) и их производные. При щелочном pH мутагенный эффект нитрозосоединений обусловлен образующимся диазотметаном, а при кислом pH — азотистой кислотой.

Для вирусов человека и животных мутагеном является и формальдегид; были индуцированы мутанты у вируса полиомиелита и вируса западного энцефаломиелита лошадей при воздействии соответственно на очищенную РНК и внутриклеточный вирус. Механизм мутагенного действия формальдегида недостаточно изучен.

Мутагенное действие азотистой кислоты заключается в изменении оснований в покоящейся молекуле нуклеиновой кислоты. Наиболее хорошо изучены азотистая кислота (HNO_2) и гидроксиламин. Азотистая кислота как мутаген дезаминирует органические основания [отщепляет молекулы аминогруппы (NH_2)], как это показано на рисунке 22.

В результате действия азотистой кислоты аденин (А) превращается в гипоксантин (Гк), гуанин (Г) — в ксантин (К), а цитозин (Ц) — в урацил (У). У дезаминированных органических оснований возникают новые свойства.

Физические мутагены. Мутагенное действие повышенной температуры (40—50 °С) обнаружили Е. Фриз на опыте с бактериофагом Т4 и Ю. З. Гендон при обработке РНК вируса полиомиелита. Температура способствует удалению пуринов (апуринизация, преимущественно гуанина) из ДНК, как показано на рисунке 23.

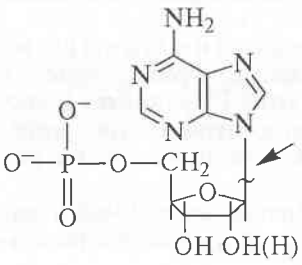
При репликации такой ДНК напротив бреши, вызванной утратой пурина, в синтезирующуюся цепь могут быть включены лю-



Рис. 22. Схема дезаминирования органических оснований под действием азотистой кислоты

бые нуклеотиды. Если включится основание, которого на этом месте ранее не было, то это означает появление мутации (транзиции или трансверсии).

Мутагенное действие ультрафиолетового излучения. Ультрафиолетовые лучи (УФ) взаимодействуют с молекулами нуклеиновых кислот и «поглощаются» органическими основаниями, особенно при длине волны 260—280 нм. Тимин (Т), урацил (У) и цитозин (Ц) более чувствительны к УФ, чем аденин (А) и гуанин (Г). При облучении структура указанных пиримидинов изменяется; две соседние молекулы тиминов соединяются друг с другом в пары, образуя так называемые тиминовые димеры (рис. 24).



Впервые мутагенное действие УФ-лучей на бактериофаги установили американский ученый Кригер (1958), затем Эльмер и Каплан (1959).

Примеры:
мутацию у внеклеточного фага Сд получил А. С. Кривиский (1961);

Рис. 23. Схема апуринизации органических оснований под действием повышенной температуры, ионизирующего излучения, изменения pH

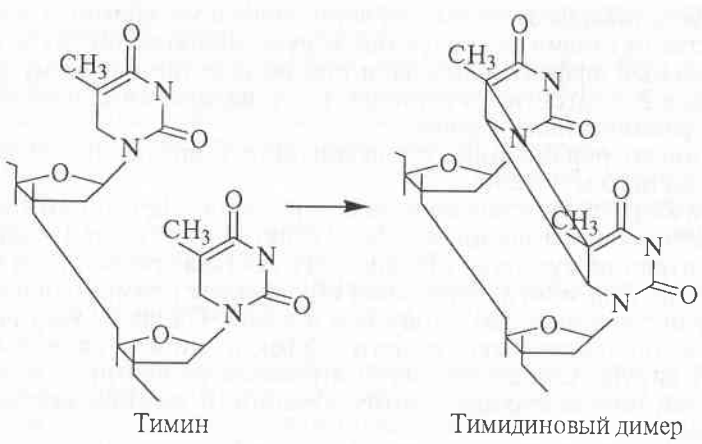


Рис. 24. Мутагенное действие УФ-лучей. Мономеры тимина (вверху) превращаются в димер тимина (внизу)

используя метод УФ-воздействия на внутриклеточный вирус, удалось получить мутанты вируса болезни Ньюкасла, отличающиеся от исходного штамма по репродукции в культуре клеток (Я. Завада, М. Розенбергова, 1963).

Под влиянием УФ-лучей получен мелкобляшечный мутант вируса западного лошадиного энцефаломиелита (WEE), обладающий стабильным S-фенотипом в культуре клеток ФКЭ (Г. Д. Засухина, А. А. Исраэлян, 1967). Установлена возможность получения мутаций при воздействии УФ-лучей на репродуцирующийся вирус и его нуклеиновую кислоту, в которой происходят структурные нарушения РНК: урацил образует димеры и гидраты.

Факторов, влияющих на эффективность и направленность мутагенеза, по крайней мере восемь:

1) природа мутагена (см. выше);

2) специфические особенности вируса. В одинаковых экспериментальных условиях один и тот же мутаген может неодинаково индуцировать мутации у разных вирусов и даже штаммов одного и того же вируса;

3) период взаимодействия вируса с клеткой. Мутации могут возникать при воздействии мутагенами на покоящуюся и вегетативную формы вируса. Во втором случае мутагенный эффект связан не только с возможностью проникновения мутагена в клетку, но и с возможностью возникновения неразрывной связи с репликацией вирусного генома.

На разных этапах репродукции различна чувствительность генетического материала вируса к действию мутагенов, что особенно ярко проявляется у РНК-содержащих вирусов с односпиральным геномом. Например, этиленимин впервые успешно применили для индукции мутаций у вирусов позвоночных при воздействии на репродуцирующуюся популяцию вируса клещевого энцефалита.

Была установлена зависимость летального и мутагенного действий вещества от стадии репродукции вируса: наибольший мутагенный и летальный эффект наблюдали при воздействии этим мутагеном в первые 2 ч латентного периода, т. е. в начальной стадии образования репликативных форм;

4) число репликаций, происходящих у вируса после воздействия на него мутагеном;

5) избирательность взаимодействия мутагена с генами вируса. Эффективность и специфичность действия мутагенов зависят от концентрации мутагена, pH, солевого состава среды и ряда других факторов. Для многих мутагенов обнаружена прямая зависимость между интенсивностью мутагенеза и дозой. Однако с увеличением дозы и усилением мутагенного эффекта снижается и выживаемость вируса. Существует математическая зависимость между величиной, определяющей частоту мутаций, и выживаемостью последнего;

6) условия обработки (pH среды, ее состав, температура);

7) тип клеточной системы;

8) условия культивирования. Индуцированный мутагенез зависит от состава питательной среды, в которой находится система «вирус — клетка». При отсутствии в среде роста тимина происходит более интенсивное включение 5-бромурацила в нуклеиновую кислоту.

Воздействие перечисленных мутагенных факторов на нативный (исходный) вирус менее эффективно, что обусловлено:

меньшей доступностью вирусной нуклеиновой кислоты воздействию мутагенов, неспособных проникать через белковую оболочку вируса;

определенным стабилизирующим действием вирусного белка, имеющего тесные внутренние связи с нуклеиновой кислотой.

Стабильность мутантов. Не все мутации, образующиеся под влиянием мутагенов, одинаково стабильны. Различия в стабильности связаны с неодинаковым молекулярным механизмом действий использованных мутагенов. Мутанты, полученные при действии повышенной температуры, кислой среды, УФ-лучей и ультразвуковых волн, дают около 20 % реверсий. Это связано с тем, что они вызывают главным образом локальные изменения вирусной нуклеиновой кислоты, ведущие к замене отдельных оснований. При воздействии профлавина все мутанты оказались полностью стабильными. Причиной мутаций являются выпадения или вставки оснований. При получении вакцинных вирусных штаммов путем воздействия на вирус мутагенами целесообразно использовать мутагены, вызывающие более глубокие изменения генетического кода — типа выпадений или вставок, так как такие мутанты обладают стабильностью наследственных свойств.

Мутации, возникающие при пассажах (адаптации) вирусов. Мутантные популяции вирусов могут возникать и в результате адаптации их к биологическим системам in vitro (культуры клеток) и in vivo (животные, куриные эмбрионы).

Мутации при пассажах на животных. При адаптации вирусов к естественно восприимчивым животным или к гетерогенным тканям экспериментально-восприимчивых животных решающее значение в работе имеют многие факторы:

свойства вируса и способ его введения. Немалое значение имеют и свойства штамма. Например, разные штаммы вируса уличного бешенства требуют различного числа пассажей для превращения их в штамм фиксированного вируса;

вид и возраст животного. Значение имеет ослабление резистентности хозяев (воздействие кортизоном, температурой, γ-облучением и т. п.).

Существует много примеров влияния используемого при пассажах вида животного на изменение биологических свойств вируса.

Примеры, которые имели положительный исход в виде получения генетически стабильных безвредных живых вакцин:

1) путем серийных пассажей вируса бешенства (штамм Флюри) через мозг однодневных цыплят и далее в куриных эмбрионах (заражение в желточный мешок) получили вакцинный штамм (virus fixe), который апатогенен для кроликов, мышей и собак (варианты Hep и Lep);

2) многократными пассажами вируса желтой лихорадки через мозг мышей значительно усилились нейротропные свойства вируса для мышей и утратились свойства патогенности для обезьян. После 258—260 пассажей адаптированный вирус с 1939 г. применяют для иммунизации людей против этой инфекции;

3) длительные пассажи вируса чумы крупного рогатого скота через организм коз привели к ослаблению его вирулентности для восприимчивых животных. В 1948 г. был получен аттенуированный вариант вируса, применяемый для вакцинации крупного рогатого скота (штамм Эдварде);

4) аналогичным образом Накамура и Миямато адаптировали к кролику вирус чумы крупного рогатого скота (штамм L), который применяют в качестве высокоэффективной живой вакцины;

5) пассажами на мышах и морских свинках удалось преобразовать висцеротропную природу вируса чумы лошадей в нейротропную и получить безвредные для лошадей вакцинные штаммы;

6) длительные пассажи вируса ящура через организм новорожденных кроликов или мышей привели со временем к аттенуации вируса в отношении крупного рогатого скота. Типовая принадлежность при этом не менялась;

7) в результате серии пассажей вируса гриппа (наиболее изменчивый как в экспериментальных, так и в естественных условиях) на мышах (интраназальное введение), он приобрел высокую патогенность для этих животных и вместе с тем утратил патогенность для человека. У адаптированных к мышам штаммов изменился и

ряд других свойств: ингибиторочувствительность, терморезистентность и др. Это свидетельствует о глубоких изменениях наследственности вируса.

Мутации при пассажах на куриных эмбрионах. Наследственная изменчивость вирусов наблюдалась и при пассажах их на куриных эмбрионах. Были получены вакцинные штаммы для профилактики инфекционного бронхита, инфекционного ларинготрахеита птиц, чумы собак, катаральной лихорадки овец (блютанга), чумы крупного рогатого скота, болезни Ньюкасла и др.

Мутации при пассажах в культурах клеток. В культурах клеток и тканей успешно выращиваются и аттенуируются многие вирусы:

после длительных пассажей в культуре переживающей ткани куриных эмбрионов вирус желтой лихорадки утратил нейротропные и висцеротропные свойства, сохранив иммуногенность. Полученный штамм 17Д успешно используют в качестве живой вакцины;

получили ряд аттенуированных штаммов вируса полиомиелита (трех типов) путем пассажа в культуре клеток почки обезьян. Вакцина, приготовленная из этих штаммов, безвредна для людей, вызывает напряженный и длительный иммунитет, обеспечивающий невосприимчивость к циркулирующим в природе диким штаммам вируса полиомиелита;

методом пассажа в сочетании с селекцией в культуре клеток вируса чумы крупного рогатого скота (штамм LIII Накамура) получили аттенуированный ареактогенный вакцинный штамм ЛТ.

Много сообщений о получении наследственно ослабленных иммуногенных штаммов вируса ящура, инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, миксоматоза кроликов и парагриппа-3 крупного рогатого скота при адаптации к различным видам культур клеток.

Причины возникновения мутаций в процессе адаптации. Изменение свойств вируса в процессе пассажей происходит ступенчато. В первых пассажах обнаруживают главным образом вирионы, изменившие какой-либо один генетический признак. С увеличением числа пассажей в популяции выявляют вирионы, изменившие два и более генетических признака; количество таких частиц постоянно возрастает, и в дальнейшем у подавляющего большинства вирусных частиц наблюдают изменение многих генетических признаков.

В основе механизма наследственной изменчивости (по Ю. З. Гендону, 1964) вирусной популяции при пассажах лежат два процесса: мутация и селекция. В том и другом процессе важную роль играет внешняя среда, которая является одновременно индуктором мутации и селективным фактором.

Если гетерогенную вирусную популяцию, которая имеет в составе измененные и исходные вирусные частицы, культивировать

в обычных условиях, то происходит ее реверсия. Например, как показали исследования с аттенуированным вирусом полиомиелита типа 3 (шт. Leon 12a, b), реверсия измененных признаков может быть связана не только с гетерогенностью вирусной популяции, но и с наличием в генетически однородной популяции частиц вируса, обладающих низкой стабильностью наследственных свойств.

Накопилось большое число фактов об изменчивости вируса, вызываемой хозяином (host-controlled variation). Изменения заключаются в том, что клетка влияет на характер синтезируемых в ней компонентов вируса. Такие модификации не затрагивают нуклеотидную последовательность генома вируса. Они описаны у ДНК-содержащих бактериофагов, вируса Сендай, болезни Ньюкасла, гриппа и др. Состав белков, закодированных в геноме вируса, может модифицироваться клеткой-хозяином. Это обусловлено наличием в клетке особых мутагенных форм тРНК с нарушенным соответствием между антикодоном и кодоном соответствующей аминокислоты.

Возможны модификации, вызванные включением в вирусную частицу компонентов клетки-хозяина (главным образом белков и липидов): миксовирусы, парамиксовирусы, оболочка которых представляет собой модифицированную клеточную мембрану. Такая мембрана содержит как клеточные липиды, так и клеточные белки хозяина. Поэтому при смене клетки-хозяина (клеточной системы или вида организмов) в структуре оболочки вируса меняются и клеточные антигены.

Антигенные варианты альфавирусов и флавивирусов связаны с условиями культивирования в различных системах хозяина. Белковые компоненты клеток-хозяев включаются в суперкапсидную оболочку вириона, вызывают изменения его антигенной характеристики.

Таким образом, клетка-хозяин может существенно влиять на фенотип вируса или блокировать (частично или полностью) его репродукцию.

Последствия мутаций:

изменение фенотипических проявлений в нормальных условиях. Например, увеличивается или уменьшается размер бляшек под агаровым гелем; увеличивается или ослабляется нейровирулентность для определенного вида животных; вирус становится более чувствительным к действию химиотерапевтического агента и т. д. Морфологические или структурные мутации могут касаться размера вириона, первичной структуры вирусных белков, изменения генов, детерминирующих ранние и поздние вирусоспецифические ферменты, обеспечивающие репродукцию вируса;

летальная мутация, при которой нарушается синтез или функция жизненно важного вирусоспецифического белка, например вирусной полимеразы;

условно-летальная мутация, при которой вирусоспецифический белок сохраняет свои функции в определенных, оптимальных для него условиях и теряет функции в неблагоприятных условиях. Примером таких мутаций являются температурно-чувствительные (от англ. temperature-sensitive) — ts-мутации, при которых вирус теряет способность размножаться при повышенных температурах (39—42 °С), сохраняя эту способность при обычных температурах выращивания (36—37 °С).

Отбор мутантов. При работе с измененными организмами важно изучить мутационную изменчивость того или иного вируса и отобрать интересующие мутанты. Для отбора определяют физико-химические и биологические свойства мутантов:

связь между изменением определенного признака (маркера) и вирулентностью (реактогенности, иммуногенности и других свойств вируса) — ковариация генетических признаков у мутантов;

природу мутантного фенотипа: способность к репродукции в той или иной системе, терморезистентность, гемагглютинирующие, гемолизирующие и другие свойства.

Поскольку в вирусологии исследуют свойства популяции в целом, то для проявления изменения наследственности вируса необходим процесс селекции, т. е. создание таких условий, при которых происходит преимущественное размножение вирусных частиц с измененной наследственностью. В результате вся вирусная популяция будет состоять из однородных генетических мутантных вирионов.

При получении генетически однородной популяции в экспериментальных исследованиях используются следующие методы селекции:

выделение клонов из одиночных пустул на хорионаллантоисной оболочке куриного эмбриона;

селекция клонов из бляшек на культуре клеток;

селекция методом предельных разведений;

селекция методом избирательной адсорбции и элюции;

селекция методом пассажей в измененных условиях культивирования.

Для генетического анализа пригодны лишь те признаки, которые легко выявляются, достаточно стабильны и контролируются единичной мутацией. У вирусов животных такие сложные признаки, как патогенность, вирулентность, антигенная структура, контролируются не одним, а многими генами.

В настоящее время отбор мутантов вирусов животных проводится на основе анализа условно-летальных мутаций. Все условно-летальные мутанты данного класса (например, все ts-мутанты) обладают одним общим признаком и фенотипически в большинстве случаев неразличимы. Одной из причин возникновения ts-чувствительности в результате мутации является изменение первичной структуры какого-либо белка, например фермента. Причем это изменение таково, что при пермиссивной температуре фермент работает, а повышение (понижение) температуры изменяет его конформацию сильнее, чем конформацию белка дикого типа, и приводит к отсутствию ферментативной активности у мутантного белка.

1.5.3. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ И НЕГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСОВ

Как при естественном инфекционном процессе, так и в экспериментальных условиях клетка может быть заражена не одним, а несколькими вирусами. Поэтому при смешанной инфекции наблюдаются две различные формы взаимодействия:

между геномами вирусов (генетические взаимодействия) — рекомбинация, множественная реактивация, пересортировка генов, кросс-реактивация, гетерозиготность;

между продуктами генов (негенетические взаимодействия) — комплементация, интерференция, фенотипическое смешивание.

Генетические взаимодействия вирусов. Рекомбинация, или обмен генами между организмами, может быть межгенная, т. е. обмен целыми генами, и внутригенная, т. е. обмен участками внутри одного гена.

Образующийся рекомбинантный вирус обладает свойствами разных родителей и характерными легко регистрируемыми признаками. Для получения рекомбинантов используют штаммы, содержащие два маркера или больше. Тест рекомбинации применяют для генетических исследований вирусов. С его помощью возможно построение генетических карт. По ним определяют, в каких участках генома вируса произошли мутации, и условные единицы измерения расстояния между разными мутациями.

Путем рекомбинации можно передавать ряд признаков: гемагглютинирующую активность; ингибиторо- и терморезистентность; патогенность для мышей; активность размножения в куриных эмбрионах; ферментативную, иммуногенную и цитопатогенную активности. Одни признаки (ингибиторорезистентность, гемагглютинирующая активность, инфекционность, иммунологическая активность) передаются регулярно, другие (терморезистентность, патогенность, ферментативная активность и ингибиторочувствительность) — нерегулярно.

Рекомбинанты вирусов позвоночных удается получить только при скрещивании близких по свойствам вирусов, принадлежащих к одному роду. Частота возникновения их широко варьирует и существенно зависит от используемой биологической системы (клетки, вирус), а также от того, какое наследственное свойство стремятся рекомбинировать. Рекомбинация с высокой частотой

наблюдается у РНК-содержащих вирусов и у ДНК-содержащих вирусов, геном которых представлен двуспиральной ДНК.

В экспериментальных условиях гибридные формы можно получить одним из четырех способов:

1) при совместном культивировании двух жизнеспособных вирусов и введении их в чувствительную систему одновременно или в разное время. Например, опыт Бернета по совместному культивированию в мозге мышей нейротропного (Nws) и пневмотропного (MEL) штаммов вируса гриппа типа А, которые отличались между собой нейровирулентностью, антигенными и другими свойствами. В результате одновременной репродукции из популяций потомства выделили методом предельных разведений гибриды, антигенно сходные с пневмотропным штаммом, но обладающие разной степенью нейровирулентности для мышей, заражаемых в мозг. Аналогичные гибридные формы возникают при одновременном культивировании этих же штаммов в куриных эмбрионах;

2) при введении в чувствительную систему живого и инактивированного (УФ-лучи, нагревание) вируса. Например, гибриды вируса гриппа совмещали признаки того и другого вируса, причем они возникали как при одновременном введении, так и при раздельном — вначале инактивированного, а через 2—3 дня живого вируса. При гибридизации инактивированного УФ-лучами вируса гриппа типа А, образующего бляшки на культуре куриных фибробластов, с инфекционным вирусом гриппа того же типа, не обладавшим такой способностью, были получены бляшкообразующие рекомбинации.

При совместном культивировании инактивированного и живого вируса передача некоторых признаков носит коррелятивный характер, т. е. приобретение одного свойства влечет за собой одновременное появление другого. Так, вместе с приобретением ингибиторорезистентности наблюдалось значительное усиление активности размножения вируса в куриных эмбрионах и патогенности для белых мышей;

3) при совместном культивировании вируса и вирусной нуклеиновой кислоты, выделенной из другого штамма;

4) в случаях одновременного введения в культуру клеток разных нуклеиновых кислот, соответствующих двум разновидностям вирусов.

Примеры рекомбинации.

1. Доказана возможность возникновения рекомбинантов между вирусами гриппа животных и человека не только в опытах in vitro, но и в организме животных, что имеет прямое отношение к объяснению причин возникновений эпидемий гриппа. Получен гибрид в результате рекомбинации между вирусами гриппа А — лошадиным 1/56 и человеческим А2. Рекомбинант содержал гемагглютинин лошадиного вируса и нейраминидазу человеческого штамма.

2. Доказана рекомбинация у вирусов полиомиелита типа 1 и ящура (между подтиповыми штаммами).

3. Гибридизация ДНК-вирусов была впервые проведена с вирусами оспы кролика и осповакцины, а также с генетически различными штаммами вируса обычного герпеса. Рекомбинанты отличались по величине очагов поражений на хорионаллантоисной оболочке и вирулентности для мышей. Гибридизация лучше удается между близкими видами и разновидностями (например, со штаммами кроличьей оспы и дермальной осповакцины), чем между далекими видами (оспы и эктромелии), и совсем не удавалось получить гибриды при скрещивании оспенных вирусов с вирусами других семейств.

4. Установлена возможность наследственной передачи вирусу истинной чумы птиц (гриппа птиц А1) резистентности к амантадину путем межвидовой рекомбинации с устойчивым к этому агенту вирусом гриппа АО.

Гибридизация (рекомбинация) свойственна всем вирусам, однако в ее обнаружении имеются определенные трудности. Условия обнаружения рекомбинации:

два родительских вируса имеют различные легко выявляемые генетические маркеры. Для этой цели используют маркеры генетические (мутации), физические (родители имеют разную плотность или радиоактивность) и маркирование с помощью модификации, индуцированной хозяином;

обязательное проникновение в клетку обоих вирусов, участвующих в рекомбинации. Для этого используют высокие множественности заражения двумя родительскими типами, которые берут обычно в равных количествах. Конкретная методика проведения рекомбинации вирусов зависит в каждом случае от их типа.

Длительность рекомбинации определяется длительностью цикла развития вируса, температурой (оптимальной температурой развития двух вирусных компонентов), выбором клеточной системы — возможностью одновременного развития в ней обоих вирусов без подавления механизмами клетки-хозяина и без влияния на потомство, что может исказить результаты рекомбинации.

Различают три вида рекомбинации.

1. *Общая рекомбинация* происходит между гомологичными последовательностями нуклеиновых кислот, обычно в процессе их синтеза. При этом цепи молекул нуклеиновых кислот расплетаются двуспиральной ДНК (или двуспиральной репликативной формой РНК); замыкаются водородные связи между комплементарными последовательностями двух цепей, принадлежащих разным молекулам. Формируется фигура рекомбинационного креста — структура Холлидея. Зона замыкания водородных связей между цепями разных молекул называется *гетеродуплексом*. У E. coli с гетеродуплексом связывается белок RecA, который является многофункциональным ферментом. RecA расплетает двойные спирали

5 — 7291

рекомбинирующих молекул и способствует спариванию оснований, раздвигая таким образом структуру Холлидея в обе стороны от места начала гетеродуплекса. В то же время АТФ-зависимая эндонуклеаза вносит односпиральные разрывы, разделяя молекулы, обменявшиеся участками. После продвижения структуры Холидея по длине молекулы другой фермент лигаза соединяет разрывы, и рекомбинировавшие молекулы расходятся. Такова модель *гомологической рекомбинации Холлидея* (рис. 25), которая реализуется у

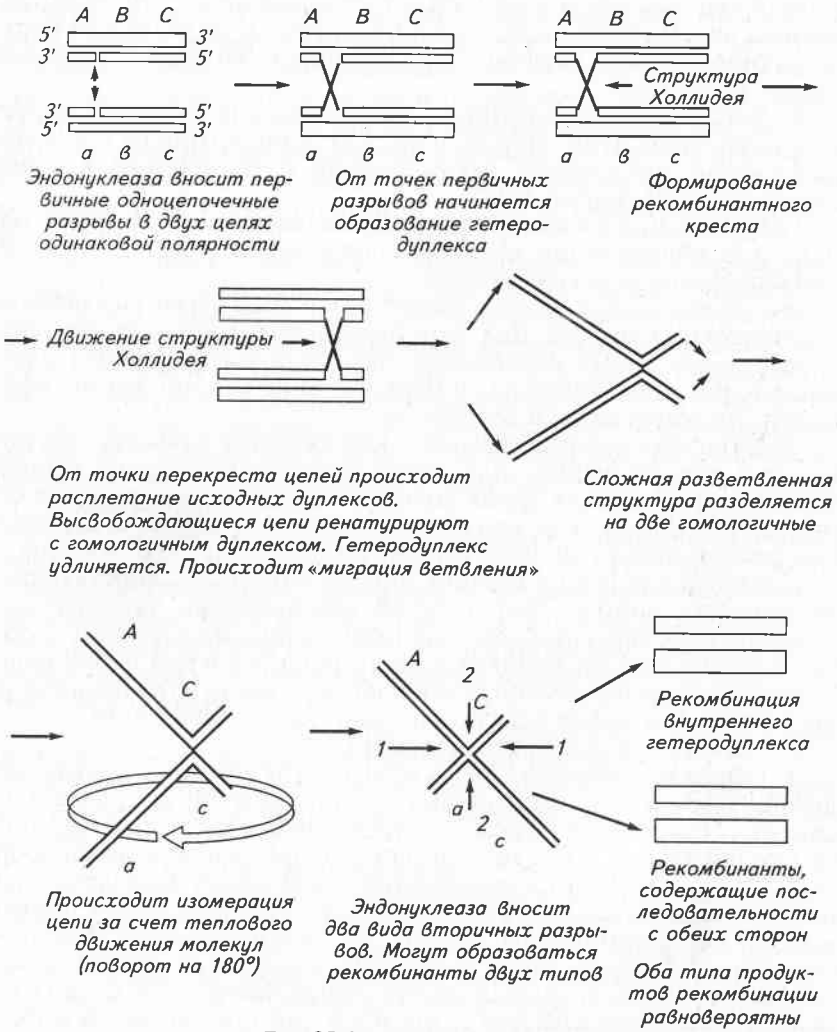


Рис. 25. Модель Холлидея:

А, Б, С, а, b, с — обозначения генов

вирусов эукариотов (если нуклеиновые кислоты репродуцируются в клеточном ядре), а также у фагов и бактерий. В этом случае происходит симметричный обмен фрагментами (например, одним и тем же геном).

Оба типа продуктов рекомбинации равновероятны.

Однако обмен может быть и несимметричным. Такой обмен называют рекомбинацией *по модели Мезельсона—Рэддинга.* Процесс начинается с внесения АТФ-зависимой эндонуклеазой односпирального разрыва в одну из рекомбинирующих молекул. Затем происходит разрыв водородных связей с 3′-конца от места разрыва, и формируется односпиральный фрагмент. 5′-конец фрагмента свободен, а 3′-конец находится в составе одной из рекомбинирующих молекул, именуемой донорской молекулой. В молекуле второго партнера по рекомбинации происходит расплетание двойной спирали с образованием двух односпиральных петель. В зоне комплементарности происходит спаривание 5′-конца цепи одной из рекомбинирующих молекул с одной из односпиральных петель другой молекулы. Далее зона замыкания водородных связей в гетеродуплексе расширяется, затем односпиральный участок донорской молекулы разрезается нуклеазой, специфичной в отношении односпиральной нуклеиновой кислоты. В результате донорская молекула утрачивает участок одной из цепей нуклеиновой кислоты, который затем восстанавливается полимеразой на матрице второй цепи. Акцепторная молекула приобретает участок «чужой» молекулы, который находится в составе двойной спирали, а соответствующий «свой» участок связан с ней в виде односпиральной петли, которая гидролизуется нуклеазами. Процесс завершают лигазы, ликвидирующие в обеих молекулах односпиральные разрывы, и система репарации, ликвидирующая неправильно спаренные нуклеотиды. В этом случае происходит асимметричный обмен фрагментами, в результате которого информация донорской молекулы входит в состав донорской и акцепторной молекулы, а информация акцепторной молекулы утрачивается. Такой механизм обнаружен пока только у эукариотических клеток и репродуцирующихся в них вирусов.

2. *Сайтспецифическая рекомбинация* происходит между молекулами нуклеиновых кислот, имеющими гомологичные последовательности только на несколько нуклеотидов (15—31 нуклеотид). Например, процессы интеграции одного генома в другой (интеграция генома ретровирусов в геном клетки, профага — в бактериальную хромосому, фага — в плазмиду, вирусного генома — в вирусный геном) можно рассматривать как частный случай рекомбинации этого типа.

Рекомбинация данного вида изучена менее подробно. Известно, что при сайтспецифической рекомбинации обмен происходит асимметрично и начинается с зоны, содержащей два коротких взаимокомплементарных участка молекулы-акцептора и молекулы-

донора. В молекуле-акцепторе эти участки непосредственно соседствуют друг с другом, а в молекуле-доноре расположены на концах передаваемого в ходе рекомбинации участка. Процесс начинается с расплетания обеих молекул. Затем замыкаются водородные связи в зоне комплементарности. В результате образуется структура, состоящая из односпиральной петли молекулы-акцептора и соединенной с ней кольцевой петли участка молекулы-донора. Эта кольцевая петля может быть ковалентно замкнутой и включать весь геном, как это имеет место у профагов. Затем в петлю внутри сайта вносится односпиральный разрыв, и участок донорской молекулы оказывается соединенным с концами разрезанной молекулы-акцептора водородными связями. Односпиральные участки молекулы-акцептора спариваются водородными связями со второй цепью, а участок акцептора на ней образует петлю. На матрице этой петли полимеразы достраивают комплементарный участок, после чего акцепторная молекула, став двуспиральной, несет информацию молекулы-донора. В отличие от случая в модели Мезельсона—Рэддинга молекула-донор не утрачивает последовательностей нуклеотидов. Однако информация, кодируемая сайтом, в который произошла встройка, может утратиться или изменить смысл.

3. *Незаконная рекомбинация* происходит между молекулами, не имеющими каких-либо сходных последовательностей нуклеотидов. Например, между геномами иридо- и поксвирусов. Незаконная рекомбинация происходит только при внесении в обе рекомбинирующие молекулы двуспиральных разрывов с последующим перекрестным замыканием этих разрывов. Можно предположить, что большую роль играют ферменты эндонуклеазы, разрезающие нуклеиновые кислоты с образованием липких концов, которые склонны к самопроизвольному замыканию путем образования водородных связей. Если замыкание произошло между липкими концами двух разных молекул, а оставшиеся односпиральные разрывы были ликвидированы лигазами, это будет означать, что произошла незаконная рекомбинация.

Во всех трех случаях под рекомбинацией понимают симметричный или асимметричный обмен участками между молекулами нуклеиновых кислот.

Множественная реактивация. Вид генетического взаимодействия, который наблюдается при заражении клетки несколькими вирионами с поврежденным геном. При этом функцию «пострадавшего» гена может выполнять вирус, у которого этот ген не поврежден. Этот феномен был вначале обнаружен на бактериофагах.

В основе множественной реактивации лежит кооперативный процесс: вирионы с поражением отдельных генов дополняют друг друга путем генетической рекомбинации, в результате репродуцируется исходный неповрежденный вирус.

Для множественной реактивации имеет значение:

расстояние внутри клетки между вирионами, геном которых поврежден;

характер используемой культуры клеток.

Эффективность процесса зависит от многих причин: степени повреждения генома вирионов, числа проникших в клетку вирионов, концентрации вирионов в определенных участках клетки, аутоинтерференции поврежденных вирионов.

Например, вирус болезни Ауески, инактивированный УФ-лучами, может быть реактивирован (активен) в первичной культуре клеток куриного эмбриона. Это связано со способностью клеток куриного эмбриона выводить индуцированные УФ-димеры тимина. В противоположность этому клетки почки кролика не дают феномена реактивации, так как не обладают элиминирующей особенностью в отношении димеров тимина.

Кросс-реактивация. Реактивация при скрещивании (или спасение маркера) — это феномен, сходный с множественной реактивацией, но отличный тем, что один из вирусов используют в нативном (неизмененном) виде, другой — инактивируют путем частичного разрушения генетического материала (действие УФ, температуры и др.). При этом наблюдаются два различных явления:

реактивация (восстановление активности) инактивированного генома неповрежденным геномом вируса, т. е. сохраняются неповрежденные участки нуклеиновой кислоты инактивированного вируса;

взаимная реактивация двух инактивированных геномов.

В результате могут возникать рекомбинанты со свойствами обоих использованных в опыте штаммов. Этот тип рекомбинации хорошо изучен в опытах с фагами. При кросс-реактивации гораздо легче получить рекомбинантные формы, чем при скрещивании двух нативных вирусов.

При кросс-реактивации используют обычно два штамма вируса с геномами, маркированными по-разному. По предложению Адаме, с начала 1960-х годов разделено значение терминов: модель Лурия называется «спасение маркера»; модель Апплеби — «кросс-реактивация»; появление полноценного потомства после заражения клетки немаркированным вирусом с частично инактивированным геномом — «множественная реактивация».

Кросс-реактивация имеет место в тех случаях, когда инактивированный геном вводится в клетку до введения неповрежденного генома вируса или при их одновременном введении. Известны примеры кросс-реактивации при введении инактивированного генома за 24—48 ч и за 56—72 ч до введения неповрежденного генома.

Пересортировка генов. Вид генетического взаимодействия, который наблюдается среди вирусов с фрагментированным геном

(рео-, арена-, бунья-, ортомиксовирусы). Образуются определенные группировки (констелляции, или созвездия) генов, которые в данной системе клеток более стойкие, и вирус более жизнеспособен. Образующиеся при этом гибридные формы вирусов называют *реассортантами.*

Чаще всего и интенсивнее пересортировка генов происходит с вирусами гриппа А (ортомиксовирусы). Гибридные формы вирусов гриппа получают при совместном культивировании вирусов с разными генами гемагглютинина и нейраминидазы, после чего из общего потомства путем нейтрализации соответствующих антигенов можно выделить интересующие варианты.

Гетерозиготность. Феномен, наблюдаемый при репродукции в клетке нескольких частиц вирусов, отличающихся наследственными признаками. В результате в клетке могут образовываться вирионы, содержащие полный геном одного родительского штамма и часть генома (или полный геном) другого вируса (диплоидные или полиплоидные вирионы). Образующиеся при этом гибридные формы вирусов называются *гетерозиготы.* В отличие от обычных гомозиготных частиц все потомство обладает одинаковыми свойствами. Феномен гетерозиготности обнаружен в опытах с вирусами гриппа и болезни Ньюкасла.

Объединение генетического материала в одной вирусной частице не наследуется, но позволяет такому вириону дать потомство, в котором будет содержаться часть вирусных частиц со свойствами одного, а часть — другого родителя.

Механизм возникновения гетерозиготных штаммов изучен на бактериофагах. Показано, что в случае нагревания ДНК при температуре, близкой к 100 °С, двойная ее спираль диссоциирует (денатурирует) на две цепочки; при последующем медленном охлаждении цепи могут вновь соединяться. Если в растворе присутствуют молекулы двух различных типов ДНК, то могут произойти взаимообмен цепочками нуклеиновых кислот и образование смешанных молекул ДНК со свойствами, которые характерны для каждого из исходных вирусов. Как образуются гетерозиготные формы у вирусов, содержащих односпиральную РНК, не ясно.

Транскапсидация. Феномен, наблюдаемый при репродукции в клетке нескольких неродственных вирусов. При этом часть чужеродного генетического материала, заключенного внутри капсида одного неродственного вируса, способна переноситься (в стабильной форме) в чувствительные к основному вирусу клетки.

Например, этот феномен наблюдается при одновременном выращивании в клетках аденовируса и вируса SV40 обезьян. В инфицированных клетках обезьян аденовирус человека вызывает синтез иРНК, вирусоспецифической ДНК и вирусоспецифического опухолевого антигена, но не способен индуцировать синтез вирусных белков, из которых построен капсид аденовируса. В силу этого дефекта полноценный инфекционный аденовирус не формируется (не завершается последняя стадия репродукции). При культивировании обоих вирусов (аденовируса и SV40) появляются вирионы, которым присущи как антигены аденовируса А7, так и SV40. Такие гибриды являются аденовирусом, в капсиде которого содержится геном вируса SV40, сцепленный с геномом аденовируса, свидетельствующий о генетическом взаимодействии разных видов вирусов.

Негенетические взаимодействия вирусов. **Фенотипическое смешивание.** Наблюдается при одновременной репродукции двух генетически различных вирусов; проявляется образованием вирионов с генотипом одного из исходных штаммов, но антигенными свойствами обоих вирусов. При данном виде взаимодействия объединяются только структурные белки вирусов, обмена информацией между их нуклеиновыми кислотами не происходит. Формы со смешанным фенотипом нейтрализуются сыворотками против обоих исходных штаммов, так как в оболочке полученных вирусов имеются структурные белки обоих родительских штаммов. Такие вирионы воспроизводят в первом поколении признаки того штамма, нуклеиновую кислоту которого они содержат.

Явление фенотипического смешивания наблюдали у бактериофагов Т2 и Т4, у вирусов животных и человека (болезни Ньюкасла, гриппа, полиомиелита, Коксаки, арбовирусов группы А).

Негенетическая реактивация. При таком виде взаимодействия инактивированный вирус А в результате денатурации структурных белков (депротеинизации) приобретает способность размножаться благодаря активности фермента другого родственного вируса Б. Катализатором может быть не только жизнеспособный вирус Б, но и вирус В, ДНК которого повреждена и не способна реплицироваться (воспроизводиться). Введение депротеинизирующего фермента в культуру клеток, которая инфицирована инактивированным вирусом, ведет к освобождению ДНК вирионов инактивированного вируса и запускает полноценный цикл репродукции.

Впервые явление негенетической реактивации наблюдали Берри и Дедрик в 1936 г. между инактивированным вирусом миксомы и живым вирусом фибромы. Наиболее широко изучен феномен у поксвирусов.

Комплементация. Наблюдается в тех случаях, когда при мутации в геноме вируса возникают повреждения, и он лишается способности самостоятельной репродукции. Если в клетку проникают два дефектных штамма, у одного из которых повреждения локализованы в гене, ответственном за синтез ранних белков (ферментов), а у другого штамма — в гене, ответственном за синтез структурных белков, то каждый из них может взаимно использовать фермент, синтез которого индуцируется другим штаммом. В результате такой кооперации два дефектных вируса, не способ-

ных репродуцироваться поодиночке, при двойной инфекции проходят полный цикл репродукции. Отличие комплементации от генетической рекомбинации заключается в отсутствии обмена генетическим материалом.

Комплементация может быть:

односторонняя, когда один вирус обеспечивает другого необходимыми для его репродукции продуктами. Стимулирующий репродукцию вирус называется «вирус-помощник», а вирус, репродуцирующийся только в присутствии помощника, — «вирус-сателлит»;

двусторонняя, когда каждый из вирусов не способен к самостоятельной репродукции.

Этот вид взаимодействия широко распространен как между родственными, так и неродственными вирусами и тесно связан с дефектностью вирусов. Поскольку в популяции помимо стандартных присутствуют дефектные неинфекционные вирусные частицы, утратившие часть генетического материала, комплементация имеет место в инфекционном цикле многих вирусов. Члены популяции снабжают друг друга продуктами генов, которые дефектны у партнеров (негенетическая реактивация).

Примеры комплементации.

1. Вирус саркомы Рауса не может индуцировать синтез структурных белков, а для строения своей оболочки использует белки вируса лейкоза птиц. В присутствии последнего из зараженной вирусом саркомы Рауса культуры клеток куриных фибробластов выделяется вирус Рауса.

2. Вирусом-сателлитом считают вирус парагриппа типа 3 по отношению к вирусу болезни Ньюкасла в культуре клеток почек обезьян, вирус Сендай — по отношению к полиовирусу в культуре фибробластов и клеток эмбрионов хомяка.

3. Комплементация встречается и у неродственных вирусов; наиболее часто у представителей аденовирусов. В одних системах аденовирусы действуют как дефектные вирусы, в других — как помощники. Например, в культуре клеток почек макак-резусов аденовирусы репродуцируются только в присутствии вируса SV40, который является в данном случае вирусом-помощником. В других системах сами аденовирусы действуют как вирусы-помощники, а вирусом-сателлитом является аденоассоциированный вирус, относящийся к парвовирусам. Репродукция этого вируса полностью зависит от действия аденовирусов.

4. Вирус гепатита В является помощником для δ-агента, который покрывается его наружным белком — HBs-антигеном. Сочетание обоих вирусов обнаружено при наиболее тяжелых формах гепатита.

Возможна не только межцистронная, но и внутрицистронная комплементация в том случае, если один ген кодирует несколько белков.

1.5.4. МЕХАНИЗМЫ РЕПАРАЦИИ ВИРУСОВ

Защитные механизмы вирусов для восстановления целостности нуклеиновой кислоты действуют на трех уровнях:

1) исправление ошибок при синтезе нуклеиновой кислоты (репликация). Репарация в данном случае обусловлена активностью ферментов полимераз. ДНК-полимераза при синтезе новой цепи ДНК «проверяет» вновь присоединяемый нуклеотид и размеры вновь образованной нуклеотидной пары. Если нуклеотид некомплементарен (не соответствует) нуклеотиду на матричной цепи, дальнейшая полимеризация цепи временно прекращается. Последний (ошибочный) нуклеотид гидролизуется (вырезается) из синтезируемой цепи этой же полимеразой за счет присущей ферменту 3′- и 5′-экзонуклеазной активности;

2) исправление ошибок сразу по окончании синтеза нуклеиновой кислоты (ошибки репликации и спонтанные мутации). Исправления на данном уровне обеспечиваются специальной системой клетки — системой рестрикции и модификации, состоящей из двух основных типов ферментов: метилаз и рестрицирующих эндонуклеаз (рестриктаз).

Вновь синтезированная ДНК некоторое время отличается от материнских цепей отсутствием модифицированных оснований. Такие основания появляются позднее и являются результатом работы метилаз. Если вновь синтезированная (неметилированная) цепь не соответствует нуклеотидам материнской (метилированной) цепи, то связь между основанием в определенном месте новой цепи гидролизуется за счет работы рестриктаз. ДНК-полимераза за счет свойств (активностей) 3′-и 5′-экзонуклеазы расширяет образовавшуюся брешь, а затем заполняет пробелы. После этого другой фермент — ДНК-лигаза ликвидирует оставшийся односпиральный разрыв;

3) выявление повреждений структуры молекулы и их ликвидация в отдаленные периоды после синтеза. Третий уровень действия механизмов репарации обеспечивается:

а) репарационной 3′- и 5′-эндонуклеазой. Этот фермент по искажению формы L-спирали ДНК узнает поврежденные нуклеотиды (например, тиминовые димеры) и расщепляет их связь с соседним неповрежденным нуклеотидом вначале со стороны 5′-конца цепи, затем — 3′-конца;

б) ДНК-N-гликозилазой. Ферменты узнают неповрежденные основания и расщепляют их связь с остатками дезоксирибозы. В результате появляется так называемый АР-сайт, т. е. нуклеотид без азотистого основания. АР-сайт узнает АР-специфическая эндонуклеаза, которая вносит односпиральный разрыв со стороны 3′-конца от поврежденного нуклеотида. Остаток дезоксирибозы с 5′-конца гидролизуется. Далее брешь обрабатывается, как описано выше. В клетке содержится целый ряд различных по специфичности

ДНК-N-гликозилаз, узнающих разные пары нуклеотидов, один из которых поврежден, и димеры тимина.

Способность изменять репаративную (восстанавливающую) активность клеток изучали О. Г. Анджапаридзе и др. Было показано, что онкогенный вирус млекопитающих ингибирует процесс вырезания тиминовых димеров, образующихся в ДНК клеток человека после УФ-облучения. Способность вирусов ингибировать или стимулировать репарацию зависит от вида вируса, его генетической характеристики, типа инфекционного процесса (хронический, латентный), особенностей мутагенного воздействия.

Контрольные вопросы

1. Каков механизм индуцированных мутаций у вирусов? 2. Какова характеристика мутагенов? 3. Какие примеры мутаций вирусов при пассажах на животных, куриных эмбрионах, культурах клеток вам известны? 4. Каковы молекулярные механизмы индуцированных мутаций? 5. Какие генетические и негенетические взаимодействия вирусов вам известны? 6. Какое значение имеют генетические признаки вирусов при конструировании живых противовирусных вакцин? 7. Каков механизм репарации у вирусов после воздействия мутагенами?

1.6. ГЕННАЯ ИНЖЕНЕРИЯ

Принцип генно-инженерного метода. *Генная инженерия (технология рекомбинантных ДНК)* представляет собой совокупность экспериментальных процедур, позволяющих осуществить перенос ДНК из одной клетки в другую (в виде функциональной молекулы) (рис. 26). При этом клетку, из которой выделяют фрагмент ДНК, принято называть донором, а клетку, в которую вносят этот фрагмент, — реципиентом, или хозяином. Сам процесс переноса ДНК из одной клетки в другую называют клонированием. *Рекомбинантными* ДНК принято считать молекулы, содержащие фрагмент (вставку) чужеродной ДНК, нехарактерной для данной клетки. Получать такие молекулы ДНК позволяет генная инженерия. Таким образом, термины «генная инженерия» и «технология рекомбинантных ДНК», по сути, являются синонимами, по отношению к ним понятие «клонирование» более узкое.

Как и когда возникла эта технология? Отсчет истории технологии рекомбинантных ДНК ведется с 1973 г., когда американские ученые С. Коэн и Г. Бойер показали, как можно перенести фрагмент ДНК в клетку E. coli и создать новую генетическую структуру, способную реплицироваться в этой клетке. Эту структуру (рекомбинантную ДНК) авторы получили из плазмид — автономно существующих в бактериальной клетке внехромосомных кольцевых генетических элементов. С. Коэн и Г. Бойер не только смогли перенести ген из одной плазмиды в другую, но и показали, что

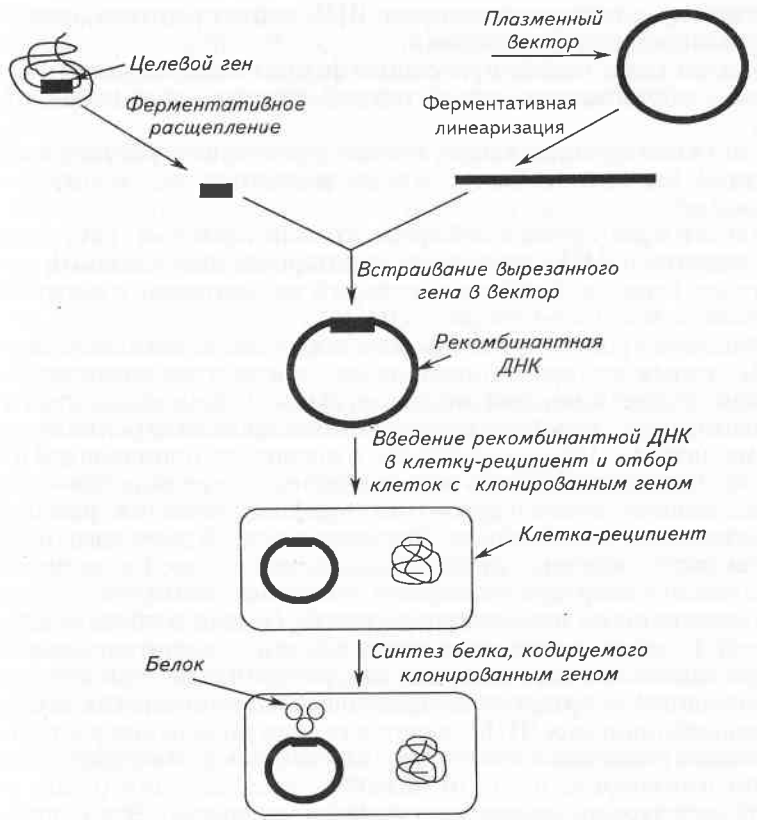


Рис. 26. Принцип генно-инженерного метода

этот ген остается биологически активным. Проиллюстрировав возможность клонирования генов, американские ученые создали экспериментальную базу для генной инженерии, показали, что плазмиды могут служить носителями и векторами клонированных генов.

Последующие работы очень скоро привели к созданию более сложных векторов и стратегий клонирования. Однако сам принцип метода не претерпел серьезных изменений. Обычно эксперименты по созданию рекомбинантных ДНК проводят по следующей схеме (см. рис. 26):

а) из организма — донора целевого гена — выделяют нативную ДНК и подвергают ферментативному расщеплению («вырезают» нужный ген);

б) вектор, с помощью которого ДНК вводят в другой организм, также расщепляют ферментами;

в) затем ген и вектор с помощью ферментов соединяют («сшивают») с образованием новой рекомбинантной кольцевой молекулы;

г) эту конструкцию вводят в клетку-реципиент (E. coli) и культивируют эти клетки (конструкция реплицируется и передается потомкам);

д) идентифицируют и отбирают колонии (клоны), несущие рекомбинантную ДНК, получают синтезированный клетками-реципиентами белковый продукт, который закодирован в перенесенном (клонированном) участке ДНК.

Белковые продукты, получаемые таким генно-инженерным методом, называют рекомбинантными, т. е. синтезированными на матрице рекомбинантной молекулы ДНК. С помощью этой технологии можно нарабатывать практически любые белки в крупных масштабах. Генная инженерия позволяет производить с помощью микроорганизмов многие ценные соединения — витамины, аминокислоты, красители, предшественники различных биополимеров, антибиотики, ферменты и др. Кроме того, открываются потенциальные перспективы создания профилактических препаратов четвертого поколения — генно-инженерных субъединичных вакцин на основе протективных белков возбудителей инфекций. Главное достоинство таких вакцин — достаточно высокая иммуногенность и в то же время отсутствие балластных белков.

Еще одним направлением практического применения технологии рекомбинантных ДНК является генная инженерия растений и животных. Растения и животные, полученные с помощью методов генной инженерии, принято называть *трансгенными* (более распространен термин *генетически модифицированные*). Это направление включает в себя перспективы создания новых высокоурожайных и устойчивых к неблагоприятным факторам сортов культурных растений, улучшение питательных качеств и сохранности сельскохозяйственных культур, а также получение новых линий декоративных растений. В области генной инженерии животных ведутся работы по созданию новых пород высокопродуктивных сельскохозяйственных животных, улучшению качества производимой ими продукции (молока, мяса, шерсти и др.).

Стоит отметить еще одну активно развивающуюся область возможного применения достижений технологии рекомбинантных ДНК — это генная терапия заболеваний человека. В настоящее время разрабатываются два основных подхода коррекции генетических дефектов: генная терапия ex vivo и генная терапия in vivo. Терапия ex vivo подразумевает получение клеток от больного, исправление генетического дефекта в изолированных клетках, наращивание и трансплантацию генетически «исправленных» клеток пациенту. Подход in vivo предусматривает доставку «терапевтического» гена непосредственно в определенные клетки человека. В рамках этих направлений также развиваются подходы к лечению раковых опухолей и медленных вирусных инфекций.

Разберем поэтапно весь комплекс генно-инженерных манипуляций.

Конструирование рекомбинантной ДНК. Для того чтобы создать рекомбинантную способную к репликации молекулу ДНК, необходимы клонирующие векторы и целый арсенал специальных ферментов — обязательных инструментов всех этапов этого процесса. Прежде всего это эндонуклеазы рестрикции и лигазы.

Эндонуклеазы рестрикции. Молекулярное клонирование стало возможным только после выделения высокоспецифичных бактериальных ферментов, которые узнают определенные последовательности оснований в двуспиральной молекуле ДНК и расщепляют обе цепи. Эти ферменты называются эндонуклеазами рестрикции (рестрицирующими эндонуклеазами, рестриктазами) типа II.

Ферменты рестрикции узнают участок ДНК, содержащий специфическую палиндромную последовательность (последовательность-перевертыш, идентичную в обеих цепях при прочтении их в направлении 5′ → 3′) из нескольких пар нуклеотидов и вносят разрыв в каждой цепи, расщепляя фосфодиэфирную связь между соседними нуклеотидами. Одни эндонуклеазы гидролизуют цепи ДНК так, что в результате образуются односпиральные концы, содержащие комплементарные нуклеотиды — липкие концы, другие же ферменты расщепляют с образованием тупых концов (табл. 4).

4. Нуклеотидные последовательности, распознаваемые некоторыми ферментами рестрикции

Фермент	Сайт узнавания	Характер образуемых концов
EcoRI	5′-G↓A—A—T—T—C-3′ 3′-C—T—T—A—A↑G-5′	Липкие концы с выступающей 5′-фосфатной группой
BamHI	5′-G↓G—A—T—C—C-3′ 3′-C—C—T—A—G↑G-5′	То же
PstI	5′-C—T—G—C—A↓G-3′ 3′-G↑A—C—G—T—C-5′	Липкие концы с выступающей 3′-гидроксильной группой
PvuII	5′-C—A—G↓C—T—G-3′ 3′-G—T—C↑G—A—C-5′	Тупые концы
HpaI	5′-G—T—T↓A—A—C-3′ 3′ÿ-C-A—A↑T—T—G-5′	То же

Одна из первых эндонуклеаз рестрикции типа II была выделена из бактерии Escherichia coli и получила название EcoRI. Этот фермент узнает специфическую палиндромную последовательность из шести пар оснований и вносит разрыв между остатками адени-

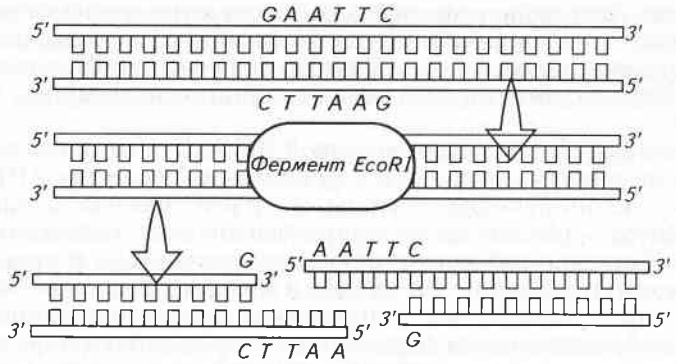


Рис. 27. Гидролиз ДНК эндонуклеазой EcoRI с образованием липких концов

на и гуанина в каждой цепи. В результате образуются односпиральные концы, содержащие по четыре комплементарных нуклеотида (липкие концы) (рис. 27).

Палиндромные последовательности, которые распознаются рестрицирующими эндонуклеазами типа II и в которых происходит расщепление молекулы ДНК, называются *сайтами узнавания*. Сайты узнавания ферментов могут содержать четыре, пять, шесть, восемь и более пар нуклеотидов. От длины сайта узнавания зависит частота его распространения в молекуле ДНК; в большинстве случаев используют эндонуклеазы рестрикции, узнающие тетра- и гексануклеотиды.

Рестрицирующие эндонуклеазы типа II играют ключевую роль при клонировании фрагментов ДНК. Когда два разных образца ДНК обрабатывают одним и тем же ферментом с образованием фрагментов с липкими концами, а затем смешивают эти образцы, то благодаря комплементарному спариванию липких концов фрагментов разных образцов могут образовываться новые комбинации генов — рекомбинантные ДНК, а также исходные молекулы (рис. 28).

Лигаза. Для осуществления молекулярного клонирования недостаточно только ферментов рестрикции. Водородные связи между теми основаниями, которые образуют липкие концы, недостаточно прочны. Чтобы удержать два объединившихся фрагмента, т. е. для восстановления связи между 3′-гидроксильной группой одной цепи и 5′-фосфатной группой другой цепи, необходим фермент для устранения разрыва в сахарофосфатном остове молекулы. Таким ферментом являются ДНК-лигазы, например ДНК-лигаза бактериофага Т4. Этот энзим катализирует образование фосфодиэфирных связей между концами полинуклеотидных це-

пей, которые уже удерживаются вместе благодаря спариванию липких концов. В результате двухцепочечная структура молекулы ДНК восстанавливается. Также ДНК-лигаза Т4 может образовывать фосфодиэфирные связи между тупыми концами, которые сближаются друг с другом после того, как объединяемые фрагменты ДНК связываются с ферментом (рис. 29).

Именно с помощью этих ферментов (эндонуклеаз и лигаз) осуществляют встраивание фрагмента ДНК в плазмидный вектор.

Плазмидные векторы. Плазмиды — это внехромосомные автономно реплицирующиеся двуспиральные кольцевые молекулы ДНК у бактерий. Каждая плазмида содержит сайт начала репликации (origin of replication, ori), без которого ее репликация в клетке была бы невозможна. Размер плазмид варьирует от 1 до 500 тыс. п. н.

Как автономно реплицирующиеся генетические элементы плазмиды обладают всеми основными свойствами, которые позволяют использовать их в качестве вектора для переноса клонируемого фрагмента ДНК (вставки). Однако высокоэффективный вектор должен обладать рядом обязательных свойств. К таким важным свойствам относятся:

а) небольшой размер, так как эффективность переноса ДНК снижается при величине плазмиды более 15 тыс. п. н.;

б) наличие уникального сайта эндонуклеазы рестрикции, по которому может быть осуществлена вставка;

в) наличие одного или более селективных генетических маркеров для распознавания клеток-реципиентов, которые содержат

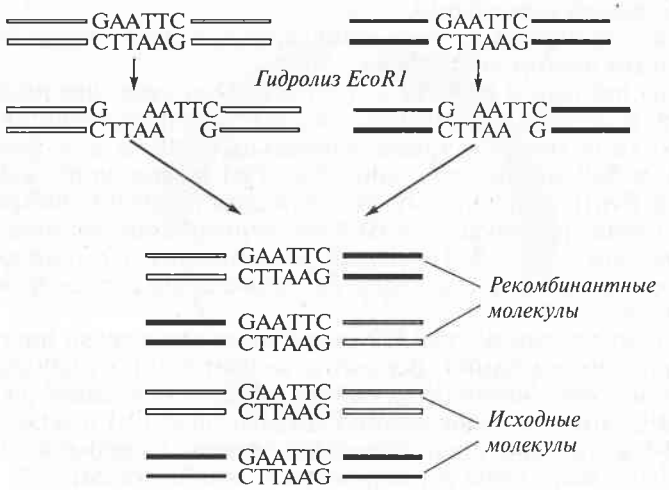


Рис. 28. Схема получения рекомбинантных ДНК с помощью эндонуклеазы EcoRI

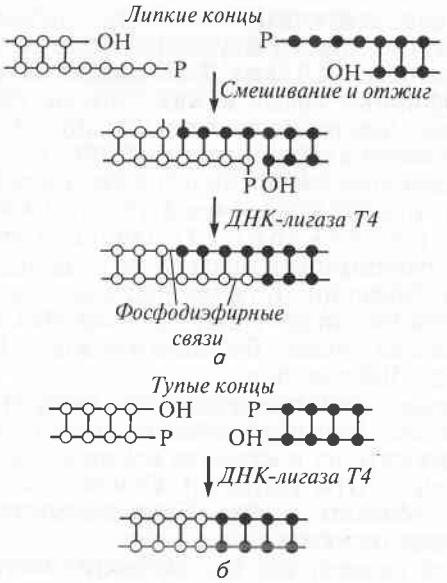


Рис. 29. ДНК-лигаза Т4 катализирует образование фосфодиэфирных связей между 5′-фосфатными и 3′-гидроксильными группами:

а — лигирование липких концов; *б* — лигирование тупых концов

вставку. Поэтому плазмидные векторы приходится создавать с помощью генной инженерии.

Одним из первых и очень популярных в 1980-е годы был универсальный вектор pBR322 (рис. 30).

Длина плазмиды pBR322 — 4361 п. н. Она несет два гена устойчивости к антибиотикам (см. рис. 30) — ампициллину (amp^R) и тетрациклину (tet^R), а также уникальные сайты для ферментов BamHI, и SalI в гене tet^R, один сайт PstI в гене amp^R, сайты для EcoRI и PvuII за пределами кодирующих последовательностей и сигнал начала репликации (ori), обеспечивающий репликацию исключительно в E. coli. Плазмида реплицируется с образованием большого числа копий, в другие бактериальные клетки переносится с трудом.

Помимо плазмиды pBR322 существует множество других векторов для клонирования. Все они отвечают двум основным требованиям: наличие нескольких сайтов для клонирования (сайты узнавания для нескольких эндонуклеаз рестрикции) и возможность достаточно простой идентификации клеток с рекомбинантными ДНК (чаще всего гены устойчивости к антибиотикам).

Как на основе плазмидного вектора можно создавать рекомбинантные молекулы ДНК?

Плазмидный вектор обрабатывают ферментом рестрикции (например, EcoRI), расщепляющим ее в единственном сайте, расположенном в одном из генов устойчивости к антибиотику (tet^R), и образуется линейная молекула с липкими концами. Такие линейные молекулы смешивают с донорной ДНК, предварительно обработанной этой же эндонуклеазой EcoRI. Поскольку липкие концы этих двух ДНК взаимно комплементарны, они спариваются с образованием гибридных молекул. Далее смесь обрабатывают ДНК-лигазой фага Т4 в присутствии АТФ, в результате чего образуются рекомбинантные молекулы ДНК, содержащие вставку внутри одного из селективных генов (tet^R) (рис. 31). Далее необходимо ввести полученную конструкцию в клетку-хозяина.

Введение рекомбинантной молекулы в реципиентные клетки и отбор. Процесс введения молекулы ДНК в клетку называется *трансформацией*. Для ее осуществления используют специальным образом подготовленные клетки — компетентные клетки, т. е. клетки, способные поглощать чужеродную ДНК из окружающей среды. Существует множество разных способов приготовления компетентных клеток, например, можно подвергнуть клетки высокотемпературному воздействию и обработать их хлоридом кальция ($CaCl_2$) или же пропустить через суспензию клеток импульс электрического тока высокого напряжения (электропорация). В любом случае выбор метода трансформации зависит от природы клеток и размера рекомбинантной молекулы.

После трансформации необходимо идентифицировать клетки, содержащие рекомбинантную ДНК. Поиск клонов, содержащих

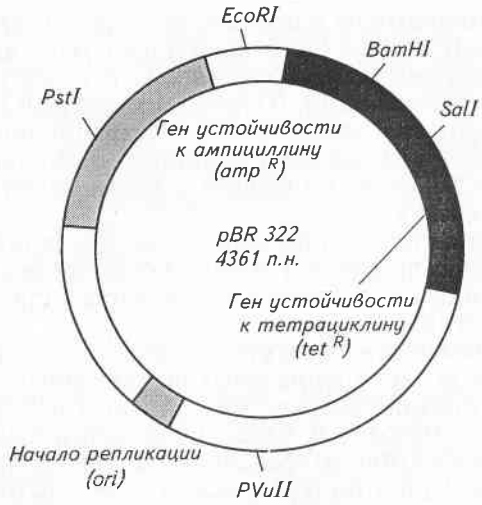


Рис. 30. Генетическая карта плазмидного вектора pBR 322

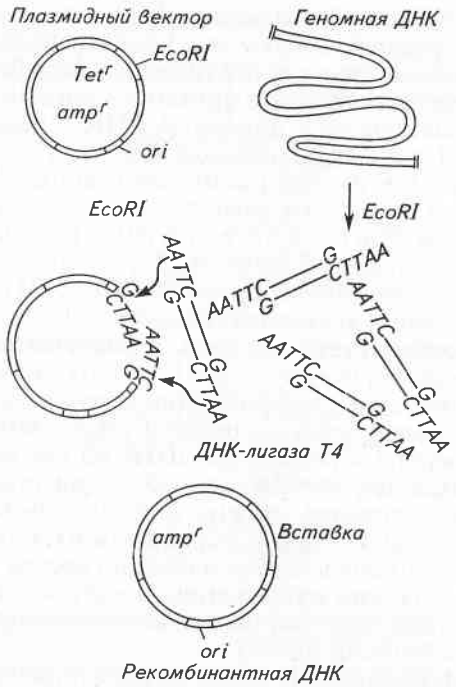


Рис. 31. Схема конструирования рекомбинантных молекул ДНК

нужную рекомбинантную плазмиду, называется *скринингом*. В самом простом случае для этого используют гены антибиотикоустойчивости, содержащиеся в плазмидах, и селективные среды с различными антибиотиками. В случае вектора pBR322, если вставку осуществляют в ген устойчивости к тетрациклину, то искомые клоны будут расти на чашках с ампициллином, так как этот ген интактен, и не вырастут на чашках с тетрациклином, поскольку ген содержит вставку.

Главной целью генно-инженерных манипуляций является получение белкового продукта. Поэтому после проведения скрининга и отбора клонов приступают к завершающей стадии — экспрессии рекомбинантной молекулы.

Получение белкового продукта. Экспрессия встроенного гена обеспечивается за счет специальных регуляторных элементов, содержащихся в плазмидном векторе. Сильный регулируемый промотор, который находится перед клонированным фрагментом, обеспечивает эффективную транскрипцию гена и синтез рекомбинантного белка. При этом очень важно, чтобы встраивание фрагмента ДНК произошло в нужной рамке считывания. В противном случае целевой продукт в клетках синтезироваться не будет.

Для того чтобы клетки-продуценты наработали рекомбинантный белок в высокой концентрации, необходимо оптимизировать экспрессию, т. е. подобрать подходящие условия для наиболее эффективного синтеза этого белка в клетках. Эффективность экспрессии оценивают в процентах целевого продукта от общего (тотального) белка клетки-продуцента.

Кроме того, обязательно исследуют физико-химические свойства рекомбинантного белка, в первую очередь, в какой форме он накапливается в клетке — растворимой или нерастворимой (в виде телец-включений).

Выделение и очистка белков — еще одна серьезная проблема генно-инженерных работ. Ведь необходимо получить максимально чистый препарат, а с другой стороны, при многоэтапной очистке может теряться большое количество белка, а также существенно снижаться его активность (если, например, это фермент). Поэтому стремятся найти эффективный способ, который позволял бы чистить рекомбинантные белки в один прием. Одним из таких решений является технология *химерных белков*. Химерные белки представляют собой конструкцию, состоящую из целевого белка и какого-либо ситабильного белка (носителя). Получение такого слитного белка программируется на уровне ДНК: в рекомбинантной ДНК гены этих белков экспрессируются вместе в одной рамке считывания. Такие химерные белки имеют ряд преимуществ:

продукт клонированного гена оказывается защищен от протеаз клетки-хозяина;

стабилизирующий белок может способствовать правильной укладке целевого белка;

химерные белки упрощают процедуру очистки;

полученные с помощью этой технологии белки можно легко иммобилизовать на твердых носителях, что бывает необходимо при разработке диагностических систем.

Способы выделения и очистки рекомбинантного белка зависят от того, где он накапливается: в культуральной среде или внутри клетки. Если белок концентрируется в цитоплазме клетки-продуцента, то необходимо сначала разрушить клеточную стенку, а затем выделять целевой продукт. Если белок секретируется в культуральную жидкость, то проводят осаждение биомассы центрифугированием, а затем выделяют белок из культуральной среды, очищают и исследуют свойства полученного продукта.

Создание вакцинных препаратов с помощью технологии рекомбинантных ДНК. Большинство современных противовирусных вакцин создают на основе убитых (инактивированных) патогенных либо живых, но невирулентных (аттенуированных) штаммов вирусов. Однако эти профилактические препараты могут иметь серьезные недостатки, в частности патогенное или аллергенное воздей-

ствие на вакцинируемых. Поэтому по-прежнему актуально создание более безопасных вариантов противовирусных вакцин.

В последнее время с развитием генной инженерии появилась возможность создавать новое поколение вакцин, которые не обладают недостатками традиционных препаратов. Для их разработки применяют технологии рекомбинантных ДНК:

из генома патогенного вируса удаляют гены, ответственные за его вирулентность. Иммуногенные свойства при этом сохраняются. Такие рекомбинантные вирусы используют для получения живых вакцин;

для вирусов, которые трудно культивировать в лабораторных условиях, клонируют и экспрессируют (например, в E. coli или дрожжах) гены вирусных белков, содержащих антигенные детерминанты, и используют их в качестве субъединичных вакцин;

на основе геномов некоторых вирусов создают векторы для переноса фрагментов ДНК, кодирующих антигенные детерминанты неродственного вируса.

Субъединичные вакцины. Субъединичные вирусные вакцины обычно являются набором протективных вирионных белков или отдельным поверхностным протективным белком. Под *протективной активностью* антигена понимается его способность обеспечить развитие устойчивости иммунизируемого организма к последующему инфицированию данным вирусом. Антигенность, или способность вызывать в организме образование антител, зависит от наличия на поверхности молекулы белка так называемых *эпитопов* (*антигенных детерминант*), образуемых обычно шестью—восемью аминокислотными остатками и обладающих наибольшим сродством к связывающей области антител. При этом каждый эпитоп в составе молекулы белка узнается определенными лимфоцитами, вырабатывающими антитела только против данного эпитопа.

Субъединичные вакцины имеют и достоинства, и недостатки. Достоинства состоят в том, что препарат, в состав которого входит очищенный иммуногенный вирусный белок, безопасен, стабилен, не содержит дополнительных балластных белков и нуклеиновых кислот, которые могли бы вызвать нежелательные побочные эффекты при вакцинации. Недостатки заключаются в том, что очистка полученного белка стоит дорого, а конформация полипептида может отличаться от той, которую он имеет в составе вирусного капсида, что может приводить к изменению его антигенных свойств. Несмотря на это, направление исследований по разработке субъединичных противовирусных вакцин — одно из наиболее перспективных в вакцинологии.

Вакцины против гриппа. В 1970-х годах было доказано, что наиболее значимыми для обеспечения защиты против гриппа антителами являются специфические антитела против поверхностных антигенов вирусов — гемагглютинина (поверхностный белок

вируса гриппа, обеспечивающий способность вируса присоединяться к клетке-хозяину) и нейраминидазы (поверхностный белок вируса гриппа, отвечающий, во-первых, за способность вирусной частицы проникать в клетку и, во-вторых, за способность вирусных частиц выходить из клетки после размножения), а не на внутренние белки вируса (нуклеопротеид). Таким образом, от вакцины, содержащей только поверхностные антигены и лишенной компонентов вируса, ожидали при равной эффективности уменьшение реактогенности (связанные с вакциной побочные эффекты, вызванные действием белков вируса и примесей невирусного происхождения).

В 1975 г. впервые было осуществлено отделение гемагглютинина и нейраминидазы от липидов мембраны вируса. Инактивация вирусов производилась детергентом триметил-цетил-аммониум-бромид (ТЦАБ). После выделения происходила самопроизвольная агрегация гемагглютинина и нейраминидазы в так называемые «розетки», структура которых наиболее благоприятна для выработки антител. «Розетки» имеют сферическую структуру, а иммунокомпетентные клетки, Т-лимфоциты и макрофаги лучше реагируют именно на сфероподобные антигены. Поэтому в случае «розеток», образованных молекулами гемагглютинина и нейраминидазы, иммунная система обеспечивает выработку антител, сравнимую с таковой при действии цельновирионных вакцин.

Первая субъединичная вакцина появилась в 1980 г. Она содержит только два поверхностных вирусных гликопротеина — гемагглютинин и нейраминидазу и максимально очищена от белков. При доказанной одинаковой иммуногенности с цельновирионными и расщепленными сплит-вакцинами субъединичные вакцины обладают меньшей реактогенностью, о чем свидетельствуют результаты проведенного анализа.

В связи с высокой эффективностью и низкой реактогенностью данная вакцина может применяться детям с 6-месячного возраста.

Вакцины против гепатита В. Для некоторых вирусов не удается подобрать условий их размножения на культурах клеток или в организме лабораторных животных, поэтому невозможно получать даже инактивированную вакцину. Ярким примером такого случая является вирус гепатита В человека, для которого не найдено культур клеток млекопитающих, обеспечивающих его наработку. Кроме человека к данному вирусу чувствительны только обезьяны шимпанзе, которые очень дороги и редки. Поэтому данный вирус одним из первых привлек внимание исследователей, работающих в области технологии рекомбинантных ДНК. Встал вопрос, можно ли методами генной инженерии создать молекулярную вакцину против заболевания гепатитом В. Многие лаборатории взялись за решение этой проблемы, что позволило добиться положительного результата.

В 1960-е годы было обнаружено, что в крови больных гепатитом В кроме вирионов диаметром 42 нм находятся небольшие сферические частицы со средним размером 22 нм в диаметре. Оказалось, что частицы диаметром 22 нм состоят из молекул белка оболочки вириона, который назван поверхностным антигеном вируса гепатита В (HBsAg), и обладают антигенными и протективными свойствами. В 1982 г. было обнаружено, что при эффективной экспрессии искусственного гена поверхностного антигена вируса гепатита В в клетках дрожжей происходит самосборка изометрических частиц диаметром 22 нм из вирусного белка. Частицы 22 нм HBsAg, полученные методом генной инженерии, по структуре и иммуногенным свойствам практически не отличаются от природных. В 1984 г. в эксперименте на добровольцах было продемонстрировано, что генно-инженерная молекулярная вакцина (22 нм-частицы) против гепатита В вызывает в организме человека эффективное образование вируснейтрализующих антител. Данная «дрожжевая» молекулярная вакцина явилась первой генно-инженерной вакциной, которая была разрешена для использования в медицине. Этот препарат обеспечивает единственный надежный способ массовой профилактики гепатита В.

Вакцины против ящура. Вирус ящура очень высоковирулентен и вызывает массовые заболевания среди КРС, МРС и свиней. Основной антигенной детерминантой возбудителя, индуцирующей образование вирус-нейтрализующих антител, является вирусный капсидный белок VP-1. Геном вируса ящура представлен односпиральной РНК. Поэтому сначала синтезировали полноразмерную двуспиральную комплементарную ДНК (кДНК), затем ее расщепили эндонуклеазами рестрикции и клонировали полученные фрагменты в экспрессионный вектор для E. coli. Белок состоит из 396 аминокислотных остатков, содержит часть молекулы репликазы бактериофага MS2 и полноразмерный белок VP-1, благодаря чему он и индуцирует выработку вируснейтрализующих антител.

Также создано еще несколько различных по составу вакцинных препаратов против ящура. Все они проходят доклинические и различные этапы клинических испытаний, прежде чем будут разрешены к применению.

Вакцина против герпеса. Герпетические инфекции относятся к категории чрезвычайно широко распространенных заболеваний и в то же время почти никак не контролируемых. Вирус простого герпеса вызывает инфекционные генерализованные или местные поражения (заболевания глаз, энцефалит, урогенитальные инфекции и др.).

Вирусы простого герпеса второго типа, родственные вирусу первого типа, но не идентичные им, поражают в основном гениталии — отсюда и название — генитальный герпес. Они распространены еще более широко и чаще вызывают острые и тяжелые патологические процессы.

Недавно в Западной Европе была разрешена к применению субъединичная вакцина против вируса простого герпеса второго типа. Основой ее является один белок — гликопротеин оболочки вириона gD. Однако она имеет особенности. Вакцина показана к применению только лицам, не инфицированным никаким герпесвирусом. В противном случае эффективность вакцинации резко снижается. Кроме того, это пока единственная вакцина, для которой установлено различное влияние на людей разного пола: вакцина оказалась эффективной только для женщин.

Генные вакцины. Принцип применения ДНК-вакцин заключается в том, что в организм пациента вводят молекулу ДНК, содержащую гены, кодирующие иммуногенные белки патогенного микроорганизма. ДНК-вакцины называют еще генными, генетическими, полинуклеотидными, вакцинами из нуклеиновых кислот.

Для получения ДНК-вакцин ген, кодирующий продукцию иммуногенного протеина какого-либо вируса или микроорганизма, встраивают в бактериальную плазмиду. Плазмида представляет собой небольшую стабильную молекулу кольцевой двуспиральной ДНК, которая способна к репликации (воспроизведению) в бактериальной клетке. Кроме гена, кодирующего вакцинный протеин, в плазмиду встраивают генетические элементы, которые необходимы для экспрессии этого гена в клетках эукариотов, в том числе человека, для обеспечения синтеза белка. Такую плазмиду вводят в культуру бактериальных клеток, чтобы получить большое количество копий. Затем плазмидную ДНК выделяют из бактерий, очищают от других молекул ДНК и примесей. Очищенная молекула ДНК и служит вакциной.

Введение ДНК-вакцины обеспечивает синтез чужеродных протеинов клетками вакцинируемого организма, что приводит к последующей выработке иммунитета против соответствующего возбудителя. В опытах на животных было показано, что таким путем возможно выработать не только антитела (гуморальный иммунитет), но и специфический цитотоксичный ответ (клеточный иммунитет), который ранее считался достижимым только с помощью живых вакцин.

ДНК-вакцины можно вводить в солевом растворе обычным парентеральным способом (внутримышечно, внутрикожно). При этом бóльшая часть ДНК поступает в межклеточное пространство и только после этого включается в клетки. Применяют и другой метод введения, используя так называемый генный пистолет. Для этого ДНК фиксируют на микроскопических золотых шариках (около 1–2 мкм), затем с помощью устройства, приводимого в действие сжатым гелием, гранулы «выстреливают» непосредственно внутрь клеток. Этот метод для иммунизации требует очень небольшого количества ДНК. Если при иммунизации классическими субъединичными вакцинами вводят микрограммы

протеина, то при использовании ДНК-вакцины — нанограммы и даже меньше.

К настоящему времени сконструировано более 20 ДНК-вакцин против различных вирусных болезней животных и человека: бешенства, болезни Ауески, инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной инфекции и лейкоза КРС, ринопневмонии лошадей, репродуктивного и респираторного синдрома свиней, болезней Марека и Ньюкасла, синдрома снижения яйценоскости, гриппа А, парвовирусной инфекции собак, гепатитов В и С, ВИЧ-инфекции, лимфоцитарного хориоменингита, Т-клеточного лейкоза человека, герпесвирусной инфекции мышей и иммунодефицита кошек. Однако в опытах на добровольцах до сих пор удовлетворительного иммунного ответа получено не было. Также при использовании ДНК-вакцин существует несколько неясных моментов:

неизвестны сроки, в течение которых клетки организма будут вырабатывать антигенный белок;

далеко не все ясно с безопасностью генных вакцин: а) необходимо исключить онкогенную опасность, поскольку судьба введенной в клетку ДНК точно неизвестна. Недостаточно изучено, может ли вводимая ДНК встраиваться в геном клетки человека и вызывать риск развития рака; б) образование антигена в организме может продолжаться длительное время (до нескольких месяцев), это может привести к развитию различных форм иммуносупрессии и других патологических явлений; в) чужеродная ДНК может вызвать образование анти-ДНК-антител, которые способны индуцировать различные формы аутоагрессии и иммунопатологии; г) сам образующийся антиген может обладать побочным биологическим действием.

Векторные противовирусные вакцины. В 80-х годах прошлого столетия возникла идея конструирования гибридных вирусов, способных при заражении человека или животных синтезировать не только свои белки, но и протективные белки других патогенных вирусов, для которых нет эффективных вакцин. Такие гибридные вирусы получили название *векторных* или *генно-инженерных живых поливалентных* вакцин. Вирусы, в геном которых встраивают чужеродные гены, называют *векторными вирусами* или *векторами*. Несомненно, что при создании живых поливалентных вакцин в качестве векторных наиболее целесообразно использовать вирусы, уже применяемые в качестве живых вакцин.

Внимание многих исследователей последние годы было приковано к вирусу осповакцины (ВОВ), принадлежащему к семейству поксвирусов. Для ВОВ накоплен огромный опыт использования в медицинской практике в разных климатических зонах. Этим данный вирус очень привлекателен в качестве вектора для создания живых поливалентных вакцин. Обнаружено, что нарушение определенных генов ВОВ приводит к снижению его реактогенности

(вирулентности). В многочисленных работах на лабораторных животных продемонстрировано успешное использование ВОВ в качестве вектора для получения эффективных живых вакцин против различных вирусных инфекций.

Впечатляющие результаты получены при использовании гибридного ВОВ, экспрессирующего поверхностный гликопротеин G вируса бешенства. Во многих европейских странах и в Канаде основным природным источником вируса бешенства являются лисы, от которых заражаются домашние животные и человек. В США главные природные носители вируса бешенства — еноты и скунсы. Лабораторные эксперименты показали, что при введении лисам вместе с кормом гибридного ВОВ происходят вакцинирование животных и выработка надежного иммунного ответа против бешенства (а также против ортопоксвирусов). Исходя из этих результатов, в Швейцарии и некоторых других странах провели масштабные эксперименты, которые состояли в том, что в местах обитания лис разбрасывали пищевые приманки, содержащие живой гибридный вирус осповакцины. В результате значительно сократилось число лис, зараженных вирусом бешенства, что привело к радикальному снижению в этих районах заболеваемости бешенством домашних животных и человека.

Кроме использования вируса осповакцины в качестве вектора активно ведутся работы с адено-, полиовирусом и вирусом ветряной оспы на предмет создания эффективных систем доставки генов в эукариотические клетки.

Живая рекомбинантная вирусная вакцина имеет ряд преимуществ перед неживыми и субъединичными: презентация антигена практически не отличается от таковой при обычной инфекции; вирус может реплицироваться в клетке-хозяине, увеличивать продукцию антител В-клетками и стимулировать выработку Т-клеток; встраивание генов иммуногенных белков в один или большее число сайтов генома вируса еще больше уменьшает его вирулентность.

Недостаток живой рекомбинантной вирусной вакцины состоит в том, что при вакцинации лиц с выраженным иммунодефицитом (например, больных СПИДом) у них может развиться тяжелая вирусная инфекция. Поэтому до начала любых клинических испытаний любого на первый взгляд безопасного вируса как системы доставки и экспрессии целевого гена необходимо убедиться в том, что он действительно безопасен.

Контрольные вопросы

1. Что такое генная инженерия и чем она занимается? 2. Какие ферменты используются в технологии рекомбинантных ДНК? 3. Как устроен плазмидный вектор ? 4. Каковы основные этапы клонирования ДНК? 5. В каких областях применяются генно-инженерные методы? 6. Что такое субъединичные и векторные вакцины?

1.7. ПАТОГЕНЕЗ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Еще на заре существования человечества людей чрезвычайно интересовали механизмы возникновения болезней. Причиной заболевания сначала считали исключительно внешние болезнетворные факторы: простуду, голод и даже сверхъестественные силы. Открытия более поздних лет позволили точнее формулировать взгляды на внешние причины заболевания, отнеся их главным образом за счет воздействия болезнетворных организмов. Но и в те времена существовали предпосылки против столь одностороннего понимания причин даже инфекционных болезней. И только с развитием молекулярной биологии поиск причин заболевания стал включать в себя не только изучение вредных факторов внешней среды, но и сам организм.

Под инфекцией в настоящее время понимают состояние зараженности организма с антагонистическими взаимоотношениями между патогенным возбудителем и хозяином. Оно проявляется в виде болезни или заразоносительства.

Термином «патогенез» обозначается механизм развития болезни. Знание патогенеза необходимо врачу для понимания процесса повреждения организма и прогнозирования исхода болезни, рационального взятия патологического материала, а также для организации профилактики и ликвидации вспышек заболевания.

Патогенез можно рассматривать на трех уровнях. На клеточном уровне патогенез рассматривается в теме «Репродукция вирусов», патогенез в популяции чувствительных живых организмов изучается в курсе «Эпизоотология», и патогенез в организме рассматривается в данном разделе.

Вирусные болезни передаются от больных животных здоровым различными путями. Например, аэрогенно передаются вирусы инфекционного бронхита кур, инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, оспы. Алиментарно, т. е. с кормом, с водой, передаются вирусы ящура, вирусной диареи крупного рогатого скота, гриппа птиц. Контактно, т. е. прямым соприкосновением, или непрямым контактом — через инфицированные предметы ухода, передается вирус оспы. Около 40 % вирусов передается трансмиссивно, т. е. насекомыми. Например, вирус инфекционной анемии лошадей переносится комарами, клещевого энцефалита — клещами, с укусом передается вирус бешенства. И наконец, трансовариально передается вирус инфекционного бронхита кур, трансплацентарно — вирус инфекционного гастроэнтерита свиней, вирусной диареи крупного рогатого скота.

Началом инфекционного процесса служит проникновение вируса в организм. Место проникновения зависит от способа передачи вируса и локализации чувствительных к данному вирусу клеток.

Большая часть вирусов проникает в организм хозяина через барьеры слизистых оболочек дыхательных путей и пищеварительного тракта. Поверхность слизистых оболочек защищена от вирусов комплексом факторов: неспецифическими ингибиторами, протеолитическими ферментами, слизью, солями желчных кислот, лизоцимом, Е-киллерами. Заражение произойдет, если вирус окажется резистентен к названным факторам.

Вирусы оспы способны проникать через неповрежденную кожу, а вирус классической чумы свиней, инфекционной анемии лошадей — через поврежденную кожу с укусом членистоногими, вирус иммунодефицита человека — при переливании крови.

Нахождение вируса на месте внедрения называют первичной локализацией вируса, которая может быть в эпителии кожи или слизистых оболочек, в регионарных лимфатических узлах, в клетках тканей. Некоторые вирусы, например гриппа, в месте первичной локализации уже размножаются. Тогда в ответ на размножение вируса в организме синтезируется интерферон как фактор естественной видовой и неспецифической резистентности.

Следующим этапом развития вирусной болезни является первичная циркуляция вируса по организму (диссеминация), которая может осуществляться с током крови (виремия), лимфы или по нервным стволам. Вирусы бешенства, болезни Борна, алеутской болезни норок распространяются по нервам в восходящем (центростремительном) направлении. Такую миграцию вируса называют нейропробазией.

Распространившись по организму, вирус локализуется в чувствительных к нему клетках определенного типа. Чувствительной к вирусу является та клетка, которая имеет на поверхности рецепторы, комплементарные данному вирусу и необходимые для адсорбции на ней вируса; в цитоплазме чувствительных к вирусу клеток находятся ферменты для его депротеинизации. По тому, в каких клетках организма размножаются и локализуются те или иные вирусы, их условно разделяют на нейро-, дерма-, пневмо-, энтеро-, висцеро- и пантропные.

Размножение вируса в клетках ведет к изменению их обмена веществ, морфологии и функции. В результате появляются цитопатическое действие вируса и вирусные тельца-включения. Непосредственными причинами, ведущими к повреждению и даже гибели пораженных вирусом клеток, могут быть: механическое воздействие массы вирионов (вплоть до разрыва клетки); токсическое действие промежуточных и структурных белков; интеграция вирусного генома с клеточным; повреждение клеточных лизосом и митохондрий; паралич клеточного генома.

Одним из видов патологии клеток, зараженных вирусом, является их трансформация (в культуре клеток) или малигнизация (в организме). В результате действия вируса изменяются поверхностные свойства клеток, что ведет к их неограниченному делению, нарушению связей с окружающими клетками и распростра-

нению с током крови и лимфы по организму. В месте задержки такой клетки происходит ее активное проникновение между нормальными клетками и размножением. Возникает метастаз, а затем опухоль.

На основании ряда исследований сформулирована гипотеза, по которой клетки большинства позвоночных несут вертикально передаваемую информацию вируса, встроенную в ДНК клетки. Она и служит источником трансформации нормальной клетки в опухолевую. Фенотипическое проявление этого процесса может происходить или не происходить, что зависит от состояния организма и определенных внешних воздействий.

Способностью вызывать неограниченный рост клеток обладают как ДНК-содержащие вирусы (адено-, герпес-, паповавирусы), так и РНК-содержащие (ретровирусы). Таким вирусам дали название — онкогенные.

По мере нарастания числа пораженных вирусом клеток развиваются патологические изменения в функционировании органа, что ведет к появлению определенных клинических признаков заболевания и патологических изменений органов и тканей. Время от момента заражения до появления клинических симптомов называется инкубационным периодом.

Одновременно с развитием болезни включается клеточный противовирусный иммунитет — активизируются и клонируются Т- и В-лимфоциты. Это приводит к разрушению зараженных вирусом клеток и появлению гуморального иммунитета — противовирусных антител.

В период поражения вирусом органов и тканей ослабевает иммунитет организма, и тогда наступает обострение бактериальных инфекций. Именно наличие таких инфекций делает течение болезни тяжелым и нередко приводит к гибели.

Вслед за размножением и накоплением вируса в определенных органах происходит его распространение по организму (так называемая «вторичная циркуляция»). Вирус передвигается с током крови, лимфы, по нервам. Движение вируса по нервам от головного мозга к периферии называют центробежным, а распространение вируса таким способом по всему организму — септиневритом.

В зависимости от локализации патологического процесса вирус выделяется из организма различными путями: с отделяемым слизистых оболочек носа и глаз, со слюной, с молоком, со спермой, с мочой, фекалиями, корочками кожных поражений. Это необходимо учитывать при проведении мероприятий по борьбе с тем или иным заболеванием.

Животные являются вирусоносителями в течение всей болезни и в разный период времени после переболевания (реконвалесцентное вирусоносительство). Вирусоносители периодически могут быть вирусовыделителями, что имеет большое значение для сохранения стационарного неблагополучия хозяйства.

В зависимости от вирулентности возбудителя и реактивности организма длительность нахождения вируса в организме различна. Короткое время вирус присутствует в организме при инапарантной и острой инфекции. Если вирус авирулентный, а животное малочувствительно к нему, то клинических признаков болезни не отмечают и вскоре происходит освобождение организма от вируса. Это инаппарантная инфекция.

Острая инфекция характеризуется ярким проявлением клинических признаков и заканчивается выздоровлением или гибелью. Выздоровление наступает вследствие действия комплекса факторов, иммунитета и интерференции между формами вируса — стандартными вирионами и дефектными интерферирующими частицами. Значительно реже наступает гибель животного. Причиной ее может быть повреждение жизненно важных органов (мозга, сердца), обширные повреждения нескольких органов, вызванных действием пантропных вирусов (чума собак) и развитием осложнений, вызванных бактериальной микрофлорой.

Длительное пребывание вируса в организме носит название персистенция (от лат. persistentia — постоянство). Персистенцией объясняется механизм латентной, хронической и медленной инфекций.

Латентная инфекция — это бессимптомная персистенция вируса; вирус может выделяться во внешнюю среду, а под действием стрессов возможно развитие острой инфекции (например, герпесвирусная инфекция).

Хроническая инфекция представляет собой персистенцию вируса, характеризующуюся чередованием периодов обострений и ремиссий, т. е. бессимптомных периодов, на протяжении недель или месяцев. Хроническая инфекция, как правило, заканчивается выздоровлением (например, аденовирусная инфекция или инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота).

Медленная инфекция имеет длительный инкубационный период — от нескольких недель до нескольких лет. Поражается обычно один орган, а развитие симптомов заболевания приводит к гибели. Такими заболеваниями являются, например, алеутская болезнь норок, инфекционная анемия лошадей, СПИД. Патогенез медленных инфекций до сих пор до конца не изучен и представляет собой различные механизмы патологии иммунной системы.

Контрольные вопросы

1. Каковы пути передачи вируса от больного животного к здоровому? 2. Каковы пути распространения вируса по организму? 3. От чего зависит место вторичной локализации и размножение вируса? 4. Как выделяется вирус из организма? 5. Как называют инфекции, при которых вирус находится в организме короткое и длительное время?

1.8. ПРОТИВОВИРУСНЫЙ ИММУНИТЕТ

Иммунитет — это целостная система биологических механизмов самозащиты организма, с помощью которых он распознает и уничтожает все чужеродное (т. е. генетически отличающееся от него), если оно проникает в организм или возникает в нем. С помощью этих механизмов поддерживается структурная и физиологическая целостность организма на протяжении всей его жизни, т. е. сохраняется физическое здоровье людей и животных и обеспечивается исцеление от многих болезней.

Наиболее опасный чужеродный материал, который необходимо распознать и убрать, — это микроорганизмы и вирусы, вызывающие инфекционные заболевания. Устойчивость к инфекции может быть естественной (т. е. врожденной) или приобретенной в результате переболевания или вакцинации.

Иммунное реагирование начинается после проникновения в организм чужеродного агента, несущего на себе признаки генетически чужеродной информации (вируса, бактерий и др.), но попасть в организм и спровоцировать иммунный ответ чужеродные агенты могут, лишь преодолев ряд защитных механизмов, которые можно рассматривать как первичную линию обороны иммунной системы. Чужеродные агенты, проникшие в организм, быстро (минуты, часы) уничтожаются механизмами естественной защиты. В противном случае начинается иммунный ответ, т. е. активация защитных механизмов против определенного (специфического) возбудителя.

Защитные механизмы противовирусного иммунитета. В понятие противовирусного иммунитета входят три категории защитных механизмов:

естественная видовая резистентность;

неспецифические факторы резистентности, включающие клеточные и физиологические реакции (интерферон, ингибиторы, температура, фагоцитоз и т. д.);

специфические факторы иммунитета, проявляющиеся при иммунизации или после переболевания (В-, Т-лимфоциты, антитела, макрофаги).

Естественная видовая резистентность. Это видовой иммунитет — невосприимчивость, обусловленная врожденными биологическими особенностями, присущими данному виду животных или человеку. Признак, передающийся по наследству, например невосприимчивость человека к вирусу чумы крупного рогатого скота или животных к бактериям брюшного тифа человека и т. д.

Естественная невосприимчивость обусловлена отсутствием условий для размножения вирусов (не обеспечена адсорбция, проникновение, депротеинизация вируса).

Видовой иммунитет к определенному вирусу генетически обусловлен и передается из поколения в поколение в пределах определенных линий животных одного и того же вида. Например, линия

мышей PR-1 обладает 100%-ной резистентностью к вирусу желтой лихорадки (штамм 17D), тогда как 100 % мышей линии SWISS — гибнет.

Существует различная степень напряженности видового иммунитета — от абсолютной до относительной резистентности, которую удается преодолеть с помощью различных воздействий (большие дозы, рентгенооблучение, обработка кортизоном и т. д.). Кроме того, резистентность организма к инфекционным болезням зависит от пола, возраста, климатических условий и других факторов, так, новорожденные мышата, крольчата восприимчивы к вирусу ящура, а взрослые животные резистентны к этому возбудителю.

В основе видового иммунитета лежат различные механизмы естественной неспецифической резистентности.

Кожа. Неповрежденная кожа представляет собой обычно непроницаемый барьер. Секреты сальных и потовых желез обладают определенным ингибирующим действием.

Слизистые оболочки. Также являются механическим препятствием для проникновения возбудителей. Клетки слизистых оболочек вырабатывают различные ферменты и другие продукты жизнедеятельности, которые обладают некоторым противовирусным действием. Слизь, выделяемая оболочками, способствует вымыванию и удалению попавших агентов. Неблагоприятно воздействует на возбудителей и желудочный сок с его кислой реакцией.

Функции выделительной системы. Их также следует отнести к неспецифичным факторам защиты организма. Освобождение организма от микроорганизмов и вирусов происходит с помощью желудочно-кишечного тракта, мочевыводящих путей, потовых желез, дыхательной и других систем.

Защитная роль температуры. Считают, что лихорадка — важный фактор, содействующий выздоровлению от вирусной инфекции. Температура 38—40 °С оказывает инактивирующее действие на вирусы, способствует ускорению кровотока, усилению обменных процессов в организме, активизирует макрофаги, однако дальнейшее повышение температуры подавляет фагоцитоз. Защитная роль высокой температуры была показана на заражении кроликов вирулентным штаммом вируса миксомы, при содержании в условиях 39—40 °С гибели не наблюдали, напротив, низкая температура внешней среды способствовала усилению тяжести поствакцинальной инфекции у кроликов.

Влияние гормонов. В защитных реакциях организма участвуют гормоны, которые опосредовательно влияют на резистентность к вирусным агентам. Доказано, что малые дозы кортизона повышают защитные функции организма, а большие — снижают резистентность к вирусным инфекциям; гормон роста активирует защитные функции организма; тестикулярный и овариальный

гормоны снижают резистентность мышей к вирусу энцефаломиокардита.

Функция лимфатических узлов. При проникновении в организм возбудитель с током лимфы заносится в лимфатические узлы, задерживается в них и становится объектом для действия макрофагов. Лимфатические узлы не только захватывают чужеродный материал, они являются местом, где происходит избирательное накопление активированных данным чужеродным веществом клеток, которые участвуют в иммунных реакциях против него (лимфоциты, макрофаги).

Роль фагоцитоза. Ранее считали, что фагоцитоз в противовирусном иммунитете не имеет существенного значения. Так, некоторые вирусы даже могут репродуцироваться в лейкоцитах (вирусы африканской чумы свиней, чумы крупного рогатого скота). Однако роль фагоцитарных клеток в противовирусном иммунитете очень велика. Защита организма от вирусных инфекций проявляется в основном фагоцитозом не только вирионов, а инфицированных ими чувствительных клеток, эритроцитов, тромбоцитов и других частиц, доступных для фагоцитоза (рис. 32).

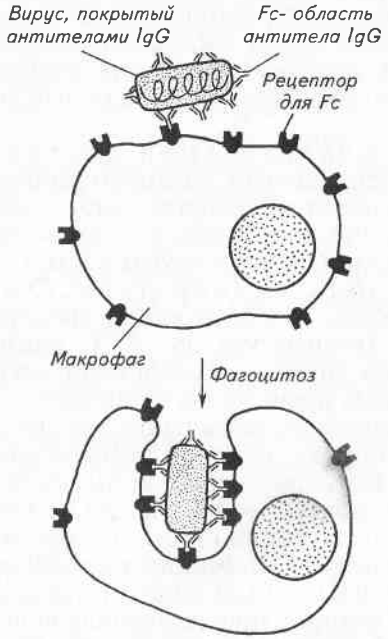


Рис. 32. Схема фагоцитоза вируса:

показано, как вирус, покрытый антителами IgG, эффективно фагоцитируется макрофагами, имеющими на поверхности рецепторы, способные связывать Fc-область молекулы IgG. Связывание вируса с этими рецепторами активирует процесс фагоцитоза

Клетки, которые обладают высокой фагоцитарной активностью, называют макрофагами. Все макрофаги объединены в систему мононуклеарных фагоцитов (СМФ).

Клетки СМФ	*Ткани, в которых эти клетки обнаруживают*
Клетки-предшественники	Костный мозг
Промоноциты	Костный мозг
Моноциты	Периферическая кровь
Макрофаги	Соединительная ткань (гистиоциты)
	Печень (купферовские клетки)
	Легкие (альвеолярные макрофаги)
	Лимфатические узлы, селезенка (свободные и фиксированные макрофаги)
	Серозные полости (плевральные и перитонеальные макрофаги)
	Костная ткань (остеокласты)
	Нервная ткань (микроглиальные клетки)

Образование макрофагов происходит через следующие этапы: стволовая клетка → монобласт → промоноцит → моноцит костного мозга → моноцит периферической крови → тканевой макрофаг. В кровь из костного мозга клетки поступают на стадии промоноцита и моноцита и циркулируют в ней около 36 ч.

Фагоцитоз — это не просто уничтожение чужеродного объекта, но и представление антигена для запуска цепи иммунных реакций, приводящих к формированию иммунитета.

Скорость освобождения крови от вирусов (клиренс) зависит как от биологических свойств вирусов (размера, вирулентности) и величины вводимой дозы, так и от резистентности организма, активности его клеточных и гуморальных факторов — крупные вирусы (оспа, герпес и др.) выводятся быстрее, чем мелкие (энтеровирусы).

Специфические антитела вызывают агломерацию вирионов и их опсонизацию, комплемент повышает связь антител с вирусами и способствует укрупнению агломератов и фагоцитозу. Фагоцитированные вирусы гибнут под влиянием кислого содержимого вакуоли и ферментов фагоцитов. Однако в отличие от бактерий вирусы более устойчивы к ферментам фагоцитов, поэтому процесс переваривания их фагоцитами происходит не во всех случаях.

В процессе иммунизации организма макрофаги подвергаются активации и фагоцитоз становится более эффективным. Активированные макрофаги синтезируют и секретируют целый комплекс биологически активных соединений (более 50), таких, как простагландины, некоторые компоненты системы комплемента, фактор некроза опухоли и др.

Активация макрофагов осуществляется с помощью имеющегося на их цитоплазматической мембране большого количества рецепторов для разных стимуляторов.

Система макрофагов — один из главных защитных механизмов не только естественной резистентности (видового иммунитета), но и приобретенного иммунитета. Подвергая процессингу антиген и представляя его другим иммунокомпетентным клеткам, макрофаги индуцируют синтез специфических антител и клеток иммунной памяти.

Неспецифические факторы резистентности. Неспецифические ингибиторы. Ингибиторы к вирусам гриппа в нормальных сыворотках крови человека и животных обнаружил в 1942 г. Херст. Клетки организма вырабатывают особые вирусотропные вещества — ингибиторы, способные взаимодействовать с вирусами и подавлять их активность. Так, сывороточные ингибиторы обладают широким диапазоном действия: одни подавляют гемагглютинирующие свойства вирусов, другие — их инфекционную активность.

Сывороточные ингибиторы разделяют на:

термолабильные (Chu-ингибиторы, β-ингибиторы), которые инактивируются при температуре 60—62 °С. Они способны нейтрализовать инфекционную и гемагглютинирующую активность вирусов гриппа, кори, болезни Ньюкасла и др.;

термостабильные (Френсиса, α- и γ-ингибиторы). Они блокируют гемагглютинирующую активность вируса.

Различные вирусы (даже одного вида) различаются по чувствительности к ингибиторам. Есть штаммы ингибиторочувствительные и ингибиторорезистентные.

Установлены глубокие отличия биохимической природы ингибиторов и их количественное содержание в сыворотках крови животных различных видов.

Между ингибиторами* и антителами имеется разница во взаимодействии их с вирусом. Так, в отличие от антител комплекс ингибитор — вирус не фиксирует комплемент; вирус соединяется с антителами при одновременном присутствии антител и ингибиторов; вирус с антителами образует более прочную связь.

Помимо сывороточных ингибиторов описаны ингибиторы в тканях, секретах и экскретах животных, в том числе птиц, а также в клеточных культурах.

Система интерферонов (ИФН). В 1957 г. английские вирусологи А. Айзекс и Ж. Линдеман обнаружили, что клетки, зараженные вирусом, вырабатывают особое вещество, угнетающее размножение как гомологичных, так и гетерологичных вирусов, которое они назвали интерфероном. Установлено, что существует не один интерферон, а целая система их, в которой выделены три основных типа.

* При исследовании сывороток крови в серологических реакциях их освобождают от ингибиторов различными методами: прогревание в течение 30 мин при температуре 56—60 °С, обработка коалином, CO_2, KIO_4 и другими методами.

Номенклатура интерферонов разработана специальной комиссией ВОЗ в 1980 г.

Новое обозначение	*Старое обозначение*
IFN-α	Тип I (лейкоцитарный), pH 2,0 — стабильный, индуцируемый чужеродными клетками
IFN-β	Тип II (фибробластный), pH 2,0 — стабильный.
IFN-γ	Тип III (иммунный), pH 2,0 — лабильный, индуцируемый антигенами и митогенами

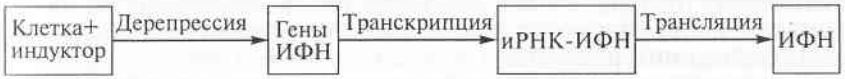
Внутри каждого типа существуют подтипы, так, у α-интерферона их около 20. По природе интерфероны — гликопротеиды. Они закодированы в генетическом аппарате клетки. У человека гены интерферона локализованы на 2, 5, 9 и 11-й хромосомах.

Система интерферона не имеет центрального органа, так как способностью вырабатывать интерферон обладают все клетки организма позвоночных животных, хотя наиболее активно его вырабатывают клетки белой крови (лейкоциты, Т-лимфоциты, NK, макрофаги и др.).

Интерферон спонтанно не продуцируется клетками. Для его образования нужен индуктор (вирусы, бактериальные токсины, синтетические вещества, двунитчатые вирусные РНК).

Индукция интерферона происходит вследствие дерепрессии его гена (оперон для α-интерферона имеет 12 структурных генов). Происходят транскрипция иРНК для интерферона и ее трансляция на рибосомах клетки.

Схематически механизм продукции интерферона может быть представлен следующим образом:



Промежуток времени между взаимодействием индуктора и клетки и появлением интерферона (lag-период) обычно длится 4—8 ч. Интерферон не взаимодействует непосредственно с вирусом, не препятствует адсорбции вируса на клетке и его проникновению в нее.

Антивирусное действие интерферона не связано с синтезом какого-то нового белка, а проявляется в повышении активности ряда ключевых ферментов клеточного обмена веществ (протеинкиназы и синтетазы). В результате блокируются стадии инициации, трансляции и происходит разрушение вирусных иРНК — это и обусловливает универсальный механизм действия интерферона при инфекциях, вызываемых разными вирусами.

Наиболее характерные свойства интерферона:

видотканевая специфичность. Он активен в гомологичных системах и резко снижает активность в гетерогенных организмах (по-

этому для лечения человека используют интерфероны человеческого происхождения);

универсальность против широкого круга вирусов, т. е. не обладает специфичностью в отношении вирусов, хотя разные вирусы обладают неодинаковой чувствительностью к интерферону*;

высокая эффективность. Небольшие дозы его обладают противовирусной активностью.

Изучение свойств интерферонов показало, что они обладают и антибактериальными свойствами (особенно к грамположительным бактериям), противоопухолевым действием и иммуномодулирующим свойством. Интерфероны стимулируют активность природных клеток-киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов, повышают чувствительность к ним клеток-мишеней, стимулируют фагоцитоз, антителообразование, фиксацию комплемента и т. д.

Биологическая активность у разных интерферонов может быть выражена в разной степени, например, α- и β-интерфероны обладают более высокой противовирусной активностью, чем γ-интерфероны, которые имеют во много раз бóльшую иммуномодулирующую активность.

Одним из факторов, определяющих резистентность организма, является способность его тканей вырабатывать интерферон. У разных животных она неодинакова и определяется врожденными особенностями организма, возрастом (интерферон новорожденных проявляет меньшее антивирусное действие по сравнению с интерфероном взрослых животных). Кроме того, на выработку интерферона тканями организма влияют и внешние условия, например, погода, температура воздуха (зимой и осенью организм производит интерферонов меньше, чем в теплое время года), ионизирующее облучение животных ведет к снижению продукции эндогенного интерферона.

В практике известно два пути использования интерферона:

применение готового экзогенного гомологичного интерферона для профилактики и лечения ряда вирусных инфекций (при гриппе, гепатите В, герпесе и злокачественных новообразованиях). Препарат эффективнее на ранних стадиях заболевания;

индукция в организме эндогенного интерферона. Проявление его хорошо известно при введении птице вакцинных штаммов вируса болезни Ньюкасла, а также лапинизированного штамма L3 и ЛТ вируса чумы крупного рогатого скота.

В настоящее время интерфероны получают генно-инженерным методом.

---

* Показано, что наиболее чувствительны к интерферону вирусы с суперкапсидной оболочкой (миксо-, арбовирусы, вирусы оспы), кроме герпесвирусов. Более устойчивы адено- и пикорнавирусы.

Киллерные клетки. В 1976 г. в лимфоидной ткани были обнаружены природные киллеры — клетки NK (от англ. Natural killer — природный убийца), их еще обозначают как естественные киллеры (ЕК-клетки). Они происходят из клеток-предшественников костного мозга. Содержание ЕК-клеток в крови составляет 5—20 % от общего числа лимфоцитов, в печени — 42 %, в селезенке — 36, в лимфоузлах — 3, в легких — 5, в тонкой кишке — 3 и в костном мозге — 2 %. В отличие от Т-цитотоксических лимфоцитов киллерная активность ЕК-клеток не зависит от представления им чужеродных антигенов молекулами главного комплекса гистосовместимости класса I.

Распознавание и уничтожение ЕК-клетками клеток-мишеней не требует предварительной сенсибилизации (иммунизации) и не сопровождается образованием клеток памяти. Однако ЕК-клетки играют важную роль в защите организма против опухолевого роста, метастазов опухолей и вирусных инфекций — в элиминации мутированных и вирусинфицированных клеток, отторжении трансплантанта. По существу, естественные киллеры участвуют в первой защитной реакции организма до включения других, специфических, иммунных механизмов. ЕК-клетки вызывают лизис клеток-мишеней, независимых от антител и комплемента, и в то же время не обладают способностью к фагоцитозу. Цитотоксическим фактором ЕК-клеток является особый белок, который по своим физико-химическим и иммунологическим свойствам сходен с белком перфорином, который обусловливает образование пор в мембране клеток-мишеней. В ЕК-клетках содержатся также гранзимы, обусловливающие индукцию апоптоза (программированная гибель клетки) при проникновении в клетки-мишени.

После лизиса клеток-мишеней ЕК-клетки остаются жизнеспособными, освобождаются от мишеней и могут вступать во взаимодействие с новой клеткой-мишенью (рециклированные ЕК-клетки). ЕК-клетки убивают клетки-мишени быстро (1—2 ч) без подготовки в виде иммунного ответа, это отличает их от Т-лимфоцитов.

Помимо ЕК-клеток естественной цитотоксичностью, не вызванной предшествующей иммунизацией, обладают антителозависимые К-клетки (антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность — АЗКЦ).

Благодаря хорошо скоординированному взаимодействию систем макрофагов, интерферонов, комплемента, главного комплекса гистосовместимости, Т-лимфоцитов и природных киллеров еще до приобретения специфического иммунитета обеспечивается своевременное распознавание и уничтожение всех генетически чужеродных веществ (микроорганизмов и мутантных клеток). В результате сохраняется структурная и функциональная целостность организма.

Вместе с тем эти системы служат основой для формирования приобретенного (специфического) иммунитета, и на их уровне

видовой и приобретенный иммунитет смыкаются, образуя единую и наиболее эффективную систему самозащиты организма.

Специфические факторы иммунитета. Специфическая система иммунитета имеет свои центральные (костный мозг, тимус, фабрициева сумка у птиц, печень у млекопитающих) и периферические органы (селезенка, лимфатические узлы, лимфоидные ткани желудочно-кишечного тракта, а также кровь и лимфа, в которые поступают и непрерывно в них циркулируют все иммунокомпетентные клетки).

Органом иммунитета является лимфоидная ткань, а его основными исполнителями — *макрофаги* (а также другие антигенпредставляющие клетки), различные *популяции* и *субпопуляции Т- и В-лимфоцитов*.

Основной мишенью действия иммунной системы являются антигены, подавляющее большинство которых имеет белковую природу.

Лимфоциты представлены двумя большими популяциями — В- и Т-клетками, которые ответственны за специфическое распознавание антигенов. Возникнув из общей исходной, так называемой стволовой клетки, и пройдя соответствующую дифференцировку в центральных органах иммунной системы, Т- и В-лимфоциты приобретают иммунокомпетентность, выходят в кровь и непрерывно циркулируют по организму, выполняя роль его эффективных защитников.

Т-лимфоциты обеспечивают клеточный тип иммунных реакций, а В-лимфоциты — гуморальный тип иммунного ответа.

Дифференцировка предшественников Т-лимфоцитов в иммунокомпетентные клетки («обучение») происходит в тимусе под влиянием гуморальных факторов, секретируемых тимусом; созревание В-лимфоцитов — у птиц в бурсе, у млекопитающих сначала в печени плода, а после рождения в костном мозге (рис. 33).

Зрелые В- и Т-лимфоциты приобретают способность распознавать чужеродные антигены. Они покидают костный мозг и тимус и заселяют селезенку, лимфатические узлы и другие скопления лимфатических клеток. Подавляющее большинство Т- и В-лимфоцитов циркулирует в крови и лимфе. Такая постоянная циркуляция обеспечивает контакт как можно большего числа соответствующих лимфоцитов с антигеном (вирусом).

Каждая В-клетка генетически запрограммирована на синтез антител к одному определенному антигену. Встретив и распознав этот антиген, В-клетки размножаются и дифференцируются в активные плазматические клетки, секретирующие антитела на данный антиген. Другая часть В-лимфоцитов, пройдя 2—3 цикла деления, превращается в клетки памяти, которые не способны к выработке антител. Они могут жить много месяцев и даже лет без деления, циркулируя между кровью и вторичными лимфоидными органами. Быстро распознают антиген при повторном его поступлении в организм, после чего клетки памяти приобретают способ-

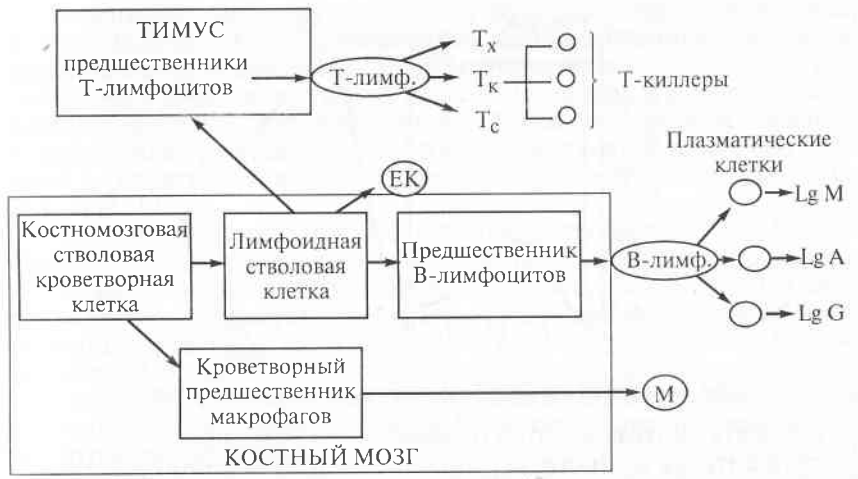


Рис. 33. Схема происхождения и дифференцирования клеток иммунной системы (*ВОЗ, 1978*):

М — макрофаги

ность к делению и превращаются в плазматические клетки — секретирующие антитела.

Таким же образом образуются клетки памяти из Т-лимфоцитов. Это можно назвать «резервом» иммунокомпетентных клеток.

Клетки памяти определяют продолжительность приобретенного иммунитета. При повторном контакте с данным антигеном они быстро превращаются в клетки-эффекторы. При этом В-клетки памяти обеспечивают синтез антител в более короткий срок, в большем количестве и в основном IgG. Установлено, что существуют Т-хелперы, которые определяют переключение классов иммуноглобулинов.

Различают два варианта выдачи иммунного ответа в форме биосинтеза антител (рис. 34):

первичный ответ — после первой встречи организма с антигеном;

вторичный ответ — при повторном контакте с антигеном, через 2—3 нед.

Они различаются по следующим показателям: продолжительностью латентного периода; скоростью нарастания титра антител, общего количества синтезируемых антител; последовательностью синтеза иммуноглобулинов различных классов. Клеточные механизмы первичного и вторичного иммунных ответов также отличаются.

При первичном иммунном ответе отмечают:

биосинтез антител после латентного периода продолжается 3—5 дней;

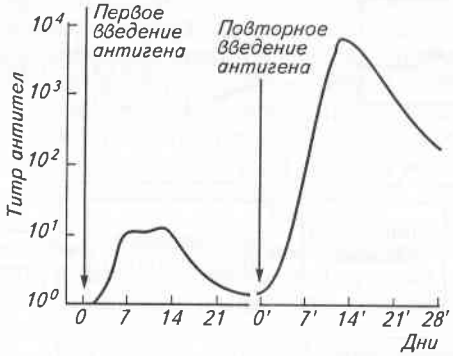


Рис. 34. График первичного и вторичного иммунного ответа

скорость синтеза антител относительно невелика;
титр антител не достигает максимальных значений;
первыми синтезируются IgM, затем IgG и позже IgA и IgE.

Вторичный иммунный ответ характеризуется:
латентный период — в пределах нескольких часов;
скорость синтеза антител имеет логарифмический характер;
титр антител достигает максимальных значений;
синтезируется сразу IgG.

Вторичный иммунный ответ обусловлен клетками иммунной памяти.

Т-клетки имеют несколько популяций с различными функциями. Одни взаимодействуют с В-клетками, помогая им размножаться, созревать и образовывать антитела, а также активируют макрофаги — хелперные Т-клетки (Тх); другие угнетают иммунные реакции — супрессорные Т-клетки (Тс); третья популяция Т-клеток осуществляет разрушение клеток организма, зараженных вирусами или иными агентами. Этот тип активности назван цитотоксичностью, а сами клетки — цитотоксическими Т-клетками (Тц) или Т-киллерами (Тк).

Поскольку Т-хелперы и Т-супрессоры действуют как регуляторы иммунного ответа, эти два типа Т-лимфоцитов называют Т-клетками-регуляторами.

Существенным фактором в противовирусном иммунитете являются макрофаги. Они не просто уничтожают чужеродные антигены, но и предоставляют антигенные детерминанты для запуска цепи иммунных реакций (презентируют). Поглощенные макрофагами антигены расщепляются на короткие фрагменты (антигенные детерминанты), которые связываются с молекулами белков главного комплекса гистосовместимости (ГКГС I, II) и транспортируются на поверхность макрофагов, где они распознаются Т-лимфоцитами (Тх, Тк) и В-лимфоцитами, что приводит к их активации и размножению.

Т-хелперы, активируясь, синтезируют факторы (медиаторы) для стимуляции В- и Т-лимфоцитов. Активированные Т-киллеры размножаются и образуется пул цитотоксических Т-лимфоцитов, способных обеспечить гибель клеток-мишеней, т. е. клеток, зараженных вирусом*. Активированные В-лимфоциты размножаются и дифференцируются в плазматические клетки, которые синтезируют и секретируют антитела соответствующего класса (IgM, IgG, IgA, IgD, IgE).

Координированное взаимодействие макрофагов, Т- и В-лимфоцитов при встрече с антигеном обеспечивает как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ (цв. вкл., рис. 8, 9). Для всех форм иммунного ответа требуется согласованное взаимодействие основных факторов иммунной системы: макрофагов, Т-, В-лимфоцитов, NK-клеток, системы интерферонов, комплемента, главной системы гистосовместимости. Взаимодействие между ними осуществляется с помощью разнообразных синтезируемых и секретируемых медиаторов.

Медиаторы, вырабатываемые клетками иммунной системы и участвующие в регуляции ее активности, получили общее название цитокинов (от греч. cytos — клетка и kineo — приводить в движение). Их подразделяют на *монокины* — медиаторы, продуцируемые моноцитами и макрофагами; *лимфокины* — медиаторы, секретируемые активированными лимфоцитами; *лимфокины*, которые химически идентифицированы и получены в чистом виде. В 1979 г. было предложено назвать их *интерлейкинами*. Они обозначаются номерами — 1, 2, 3, 4, 5 и т. д. Семейство интерлейкинов пополняется новыми представителями, которые осуществляют взаиморегуляцию иммунной, нервной и эндокринной систем. Все иммунокомпетентные клетки на своих мембранах несут уникальные рецепторы, с помощью которых они распознают и воспринимают сигналы от других иммунных клеток, перестраивают свой метаболизм, синтезируют или устраняют свои собственные рецепторы. Благодаря этому все клетки иммунной системы функционируют как хорошо отлаженная система.

Основные особенности противовирусного иммунитета. Особенности проявления иммунного ответа при вирусных заболеваниях определяются тем, что вирусы являются облигатными внутриклеточными паразитами со своеобразным способом размножения.

---

* Главным свойством всех клеток-киллеров является то, что под их влиянием в клетке-мишени запускаются механизмы апоптоза (запрограммированной гибели клетки). Лизис клетки происходит после отсоединения киллера, что позволяет одному киллеру лизировать несколько клеток-мишеней. В процессе лизиса участвуют секретируемые лимфоцитами перфорины и гранзимы. Перфорин, встраиваясь в мембрану клетки, формирует в ней канал, через который в клетку проникает вода. Клетка разбухает и лизируется. Считают, что гранзимы обусловливают индукцию апоптоза.

Ранняя стадия инфекции, как правило, состоит в противоборстве вируса с защитными системами организма-хозяина. Самый первый защитный барьер — кожные покровы и слизистые оболочки организма. В случае нарушения их целостности в действие вступают механизмы экстренной неспецифической защиты (факторы врожденного иммунитета). Среди них особо выделяют противовирусную активность интерферона, ЕК-клетки (естественные киллеры) и макрофаги.

Противовирусное действие интерферона. Инфицирование клетки вирусом вызывает синтез интерферона. Под его действием активируются защитные механизмы соседних клеток, обеспечивая их устойчивость к вирусной инфекции. Интерферон индуцирует синтез двух ферментов: протеинкеназы, что ведет к подавлению синтеза вирусных белков, и 2′, 5′-олигоаденилатсинтетазы, активирующей эндонуклеазу, которая разрушает вирусную иРНК. Кроме того, γ-интерферон сильно активирует макрофаги и ЕК-клетки.

Противовирусное действие ЕК-клеток и макрофагов. Активные ЕК-клетки появляются уже через двое суток после заражения организма-хозяина вирусом. ЕК-клетки и макрофаги уничтожают зараженные клетки. Главным образом ЕК-клетки осуществляют реакцию антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ).

Если вирусу удается преодолеть барьеры врожденной защиты, он вызывает развитие специфического иммунного ответа с появлением Т-киллеров, Т-хелперов и противовирусных антител. Главную роль в иммунном ответе отводят антителам и Т-киллерам. Основные механизмы противовирусного иммунитета сводятся к блокаде распространения вирусных частиц и уничтожению зараженных вирусом клеток, т. е. клеток, которые фактически являются «фабриками» по производству новых вирусов.

Роль антител (цв. вкл., рис. 10). Распространение вируса в организме блокируют в основном антитела. В процессе развития специфического иммунитета синтезируются антитела к большинству антигенов вируса. Однако считается, что вирусную инфекцию сдерживают в основном антитела к поверхностным гликопротеинам. Эти антигены, часто называемые протективными, локализованы на поверхности вирионов или экспрессируются на мембране зараженной вирусом клетки. Механизмы гуморального противовирусного иммунитета могут быть различными. Способ устранения инфекционности вирусных частиц зависит от их локализации — внеклеточной или внутриклеточной.

Антитела, адсорбируясь на поверхности вирионов, блокируют его жизненно важные функции. Прежде всего, это блокада прикрепления к клетке хозяина, проникновения в нее, раздевание вируса. Адсорбция антител на белках капсида не позволяет некоторым вирусам (вирусу чумы плотоядных, кори и др.) проникать из клетки в клетку путем их слияния. Кроме того, считают, что антитела, активируя систему комплемента, вызывают повреждения оболочки некоторых вирусов и блокируют клеточные рецепторы для вирусов. Однако в настоящее время этот процесс не считают существенным в противовирусной защите.

Действие антител, помимо нейтрализации внеклеточных вирусов, состоит в том, что они вызывают разрушение инфицированных вирусами клеток, активируя систему комплемента. Второй механизм действия антител на внутриклеточный вирус — это реакция антителозависимой клеточной цитотоксичности, осуществляемая ЕК-клетками. Антитела, фиксированные на мембране пораженной вирусом клетки, контактируют с ЕК-клетками (через Fc-фрагмент IgG), которые убивают зараженные клетки с помощью перфоринов и гранзимов.

Роль Т-клеток. В иммунитете к вирусным инфекциям Т-клетки выполняют разнообразные функции. Т-хелперы играют важную роль в образовании антител в ответ на антигены, кроме того, эти клетки помогают в индукции Т-киллеров, а также в привлечении макрофагов и Е-клеток в очаг вирусной инфекции и в их активации. Т-киллеры осуществляют противовирусный иммунологический надзор, и действуют они весьма эффективно и избирательно, разрушая инфицированные вирусами клетки с помощью перфоринов и гранзимов. Проникнув внутрь клетки-мишени, гранзимы через каскад реакций активируют эндонуклеазы. Этот фермент способствует разрыву цепей ДНК и развитию апоптоза (программированная гибель клеток).

Механизмы «ухода» вирусов от иммунного надзора организма хозяина. Вирусы обладают разнообразными свойствами защиты от распознавания их антителами:

наиболее эффективно этому служит смена антигенов: в вирусных белках происходит изменение иммунодоминатных областей. Антигенная изменчивость наблюдается у вирусов иммунодефицита человека и у вирусов гриппа. Так, у вируса гриппа она называется антигенным «дрейфом» (постепенные изменения) и «шифтом» (резкие изменения). Гуморальный иммунитет к этим вирусным инфекциям сохраняется лишь до появления нового серовариантa возбудителя, что не позволяет рассчитывать на долговременный эффект вакцинации;

антитела могут удалять вирусные антигены с плазматической мембраны клетки путем кеппинга (агрегации молекул клеточной поверхности). Так, герпесвирусы кодируют гликопротеины, связывающие антитела через Fc-фрагмент, при этом нарушается активация комплемента и блокируется действие противовирусных антител;

ряд вирусов (цитомегало-, аденовирусы и др.) индуцируют выработку белков, подавляющих экспрессию молекул ГКГС класса I на мембране пораженных клеток. Это дает вирусу преимущество, помогая избежать распознавание этих клеток Т-киллерами.

Отдельные вирусы (герпесвирусы) обладают генами белков, гомологичных цитокиновым рецепторам. В результате эти «растворимые» рецепторы как «ловушки» связывают цитокины и нейтрализуют их действия;

некоторые вирусы (вирус Эпштейна — Барра, аденовирусы) способны противодействовать эффекту интерферонов — они продуцируют короткие отрезки РНК, которые каким-то образом подавляют активацию протеинкиназы;

многие вирусы способны вызывать у макрофагов выработку супрессирующих цитокинов, подавляющих развитие иммунного ответа.

Контрольные вопросы

1. Каковы факторы естественной видовой резистентности организма и чем они обусловлены? 2. Какие неспецифические клеточные и общефизиологические реакции являются защитными механизмами организма? 3. Каковы биологическая роль неспецифических ингибиторов и их классификация? 4. Каковы роль фагоцитоза в противовирусном иммунитете? 5. Каков механизм образования интерферона и его роль в противовирусном иммунитете? 6. Какие клетки участвуют в формировании специфического иммунитета? 7. Какие виды Т-лимфоцитов вам известны и какова их роль в специфическом иммунитете? 8. Каковы роль антител в противовирусном иммунитете, их структура и механизм образования? 9. Каков механизм взаимодействия макрофагов, Т- и В-лимфоцитов, какова роль медиаторов? 10. Какие существуют способы «ускользания» вирусов от иммунологического надзора?

1.9. ПРОФИЛАКТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ ЖИВОТНЫХ

Основным способом борьбы с вирусными болезнями является их профилактика, т. е. предупреждение. Профилактика вирусных болезней строится, в общем, на тех же принципах, что и профилактика других инфекционных заболеваний. Она проводится по двум основным направлениям:

неспецифическая профилактика включает комплекс санитарно-гигиенических мероприятий (дезинфекция, дезинсекция, дератизация, ограждение ферм, дезбарьеры и т. д.), направленных на недопущение инфицирования животных, и зоогигиенических мероприятий (полноценное кормление, оптимальные условия содержания животных и т. д.), направленных на повышение защитных возможностей организма;

специфическая профилактика заключается в использовании вакцин, гипериммунных сывороток и иммуноглобулинов, создающих специфическую невосприимчивость к определенной инфекции.

Вакцино-профилактика занимает ведущее место в борьбе со многими вирусными заболеваниями человека и животных.

Вакцина представляет собой биологический препарат, приготовленный из возбудителей инфекции, лишенных патогенных

свойств, но сохранивших иммунногенные свойства. Введение в организм вакцины ведет к активации факторов иммунитета, в том числе и к образованию антител против того возбудителя, из которого приготовлена вакцина. Вакцина — это биопрепарат, предназначенный для создания активного иммунитета.

Основоположником вакцинации считают английского врача Э. Дженнера (1749—1823). Следует учесть, что в то время ничего не знали о вирусах. Э. Дженнер в течение многих лет анализировал наблюдения о невосприимчивости людей, переболевших коровьей оспой, к натуральной оспе человека и пришел к выводу о возможности профилактики натуральной оспы человека прививками вирусом коровьей оспы. В 1796 г. он провел первый эксперимент, сделав мальчику прививку содержимым пустулы коровьей оспы, а затем дважды (через несколько месяцев после прививки) вводил ему вирус натуральной оспы, мальчик не заболел.

Этот опыт стал первой научно продуманной попыткой предотвратить инфекционное заболевание. Позднее в честь первооткрывателя прививок Э. Дженнера было предложено все препараты, используемые для искусственного создания приобретенного активного специфического иммунитета против определенных возбудителей или их токсинов, называть вакцинами (от лат. vacca — корова), а процедуру введения вакцин — вакцинацией.

В настоящее время препараты оспенной вакцины значительно усовершенствованы. Благодаря тщательной вакцинации в нашей стране оспа была ликвидирована к 1936 г., а во всем мире — к 1980 г. (в 1976 г. наблюдали последний случай заболевания в Сомали).

Однако Э. Дженнер не разработал принципы, по которым можно было готовить вакцины. Это сделал 100 лет спустя французский ученый Л. Пастер (1822—1895). Он со своими учениками разработал теорию ослабления (аттенуации) вирулентных свойств микробов и заложил основы применения ослабленных микробов для профилактики инфекционных болезней. Л. Пастер в период с 1881 по 1885 г. разработал вакцину против очень опасной болезни — бешенства, возбудитель которого еще не был открыт. Он многократно пассировал заразный материал (мозг погибших от бешенства собак) через мозг кроликов и обнаружил закономерность — вирулентность материала для кроликов увеличивалась, сокращался инкубационный период болезни, который после 90—140 пассажей стабилизировался на уровне 7 дней. Полученную культуру Л. Пастер назвал вирусом-фикс. Этот вирус утратил патогенность для собак и кроликов при подкожном введении, не проникал в слюнные железы (вирус утратил свойство нейропрабазии — проникать в ЦНС). Из него была приготовлена вакцина. Она впервые использована Л. Пастером в июле 1885 г. на 9-летнем мальчике, которого укусила бешеная собака. Вакцину вводили подкожно. Мальчик остался жив. Это был первый случай в исто-

рии человечества спасения человека с помощью вакцины, созданной руками человека. Последующие прививки против бешенства были успешными и стали достоянием всех стран. Началась эра создания вакцин.

После открытия вирусов Д. И. Ивановским (1864—1920) в 1892 г. и разработки методов их культивирования получены вакцины против многих вирусных инфекций.

В настоящее время более 80 % всех инфекционных заболеваний животных, в том числе пушных зверей и птиц, вызываются вирусами. Мероприятия по борьбе с вирусными болезнями обычно носят комплексный характер, однако их успех во многом зависит от наличия и эффективности средств специфической профилактики. Благодаря использованию научных достижений в области вирусологии, генетики, биохимии, молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии постоянно совершенствуются и создаются новые биологические препараты для профилактики вирусных болезней.

При изготовлении вакцин для получения вируссодержащего материала используют живые биологические системы, чувствительные к вирусам: животных, куриные эмбрионы, культуры клеток.

В зависимости от биологической системы, используемой для культивирования вакцинного штамма вируса, различают тканевые, авинизированные, культуральные вакцины.

Тканевые вакцины в своей основе содержат какую-либо ткань животных, в которой размножался и накапливался вакцинный вирус. Например, вакцину против бешенства готовили из мозговой ткани овец, зараженных пастеровским вирусом-фикс бешенства, лапинизированную вакцину против ящура — из тканей крольчат, зараженных адаптированным к ним вакцинным штаммом. Количество тканевых вакцин постепенно сокращается.

Авинизированные вакцины готовят из эмбриональных жидкостей и тканей развивающихся эмбрионов птиц, зараженных вакцинным штаммом. Наиболее часто для этих целей используют эмбрионы кур, реже уток и японских перепелов, например, для получения вакцин против гриппа птиц, болезни Ньюкасла, гепатита утят и др.

Культуральные вакцины готовят из зараженных культур клеток или переживающих тканей, при этом применяют роллерный (используют вращающиеся бутыли) или суспензионный (глубинный — используют реакторы) методы культивирования клеток и тканей. Это наиболее перспективный и прогрессивный метод получения вакцин. Таким методом готовят, например, вакцины против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 крупного рогатого скота, ящура, чумы крупного рогатого скота и др.

В зависимости от видовой принадлежности вакцинного штамма различают гомологические и гетерологические противовирусные вакцины.

Гомологические вакцины готовят из того вида вируса, против которого предполагается создать иммунитет, например, вакцины против вирусной диареи, чумы крупного рогатого скота, бешенства и др. Большинство вирусных вакцин — гомологические.

Гетерологические вакцины готовят из вирусов другого вида, но имеющих в своем составе сходные антигены и обладающих перекрестной иммуногенностью. Например, вакцину против оспы кур готовят из вируса оспы голубей, вирус герпеса индеек используют для защиты кур от болезни Марека, вирус кори — для защиты собак от чумы плотоядных и т. д.

В зависимости от количества типов или видов возбудителей, включенных в состав вакцины, различают моновалентные, поливалентные, ассоциированные и смешанные вакцины.

Моновалентные вакцины содержат антигены одного типа (вида) вируса.

Поливалентные вакцины (бивалентные, трехвалентные и т. д.) готовят из нескольких типов одного вируса. Например, трехвалентную противоящурную вакцину получают из трех типов вируса ящура — А, О и С.

Ассоциированные вакцины содержат антигены возбудителей разных видов, например, вакцина «Бивак» — против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота, «Тетравак» — против чумы, аденовироза, инфекционного гепатита и парвовирусного энтерита собак.

Смешанные вакцины представляют собой смесь вирусных и бактерийных антигенов, например, вакцина против чумы плотоядных, ботулизма и вирусного энтерита собак.

В зависимости от жизнеспособности (способности к репродукции) вируса, входящего в состав вакцины, все противовирусные вакцины подразделяют на живые и инактивированные.

Живые вакцины содержат живые селекционированные ослабленные (аттенуированные) штаммы вирусов.

Инактивированные вакцины содержат инактивированные штаммы вирусов. Чаще для этой цели используют эпизоотические штаммы, которые инактивируют (обезвреживают) физическими или химическими методами.

Все вакцинные препараты можно разделить на две большие группы: *цельновирионные* и *компонентные*. К цельновирионным относятся как живые, так и инактивированные вакцины. К компонентным можно отнести все вакцины, которые не входят в рубрику цельновирионных вакцин, т. е. сплит-вакцины, субъединичные и синтетические вакцины, а также вакцины, полученные генно-инженерными методами. К сожалению, пока отсутствует общепринятая научно обоснованная классификация вакцин.

Живые вакцины. Это биопрепараты, содержащие штаммы вирусов, утратившие способность вызывать клинически выраженное заболевание, но сохранившие способность репродуцироваться в

организме восприимчивого животного и стимулировать выработку факторов специфического противовирусного иммунитета.

Принцип получения живых вакцин. Основным в технологии производства живых вакцин является получение аттенуированных штаммов вирусов путем:

1) адаптации патогенных вирусов к маловосприимчивым или совсем невосприимчивым лабораторным животным. Так был получен штамм Л3 Накамура для профилактики чумы крупного рогатого скота (путем серийных пассажей на кроликах), штамм К для профилактики чумы свиней. При пассажах на животных успех во многом зависит от выбора метода заражения. Так, Л. Пастер путем серийных (130—140) интрацеребральных пассажей уличного вируса бешенства на кроликах получил вакцинный штамм, известный под названием вирус-фикс. Получены аттенуированные штаммы вирусов инфекционного бронхита, инфекционного ларинготрахеита птиц, катаральной лихорадки овец и другие путем адаптации к куриным эмбрионам. Методом адаптации к культурам клеток (пассирование в сочетании с селекцией в культуре клеток) вируса чумы крупного рогатого скота (штамма Л3 Накамура) удалось получить аттенуированный ареактогенный вакцинный штамм ЛТ. Аналогичным путем получены вакцинные штаммы вирусов инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи крупного рогатого скота, чумы плотоядных и др.

При многочисленных серийных пассажах вируса происходит накопление случайных мутаций*.

Исследователь, используя различные методы селекции, отбирает штаммы по признаку утраты вирулентности (к естественно восприимчивому животному) при сохранении иммуногенности. Это очень длительная, кропотливая работа, которая не всегда может быть успешной;

2) селекции природно-ослабленных штаммов вирусов при атипично или латентно протекающих инфекциях. Так были выделены вакцинные штаммы вируса болезни Ньюкасла В1, Н, Ф, Ла Сота, Бор-74 (ВГНКИ), аттенуированные штаммы ротавирусов человека;

3) использование гетеротипичных антигенно-родственных апатогенных штаммов в качестве живых вакцин. Например, вирус оспы голубей создает иммунитет против оспы кур; вирус герпеса индеек защищает кур от болезни Марека; вирус фиброматоза создает у кроликов иммунитет от миксоматоза; вирус кори человека в состоянии защитить щенков от чумы плотоядных;

* В основе изменчивости вируса лежат мутации, т. е. изменения состава и последовательностей нуклеотидов вирусного генома.

4) аттенуация вирусов генно-инженерными методами. Этот метод конструирования стабильных аттенуированных штаммов связан с делеционными (делеция — выпадение одного или нескольких нуклеотидов в вирусном геноме) мутациями. Преимущество таких мутантов состоит в том, что их способность к реверсии практически исключается. Исходя из этого, прилагаются усилия для получения стабильных делеционных мутаций, которые бы обеспечили вирусу достаточную дефектность, делающую его аттенуированным, но не настолько, чтобы потерять жизнеспособность. Этот тип «генной хирургии», использующий рестрикционные эндонуклеазы, может быть исполнен только на ДНК. Следовательно, те вирусные геномы, которые представлены РНК, должны быть транскрибированы в ДНК-копии, а затем подвергнуты изменениям.

Первые успехи в аттенуации вирусов с использованием методов генной инженерии достигнуты в опытах с ДНК-содержащими вирусами животных. Делеционные мутанты по тимидинкиназе получены у вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и вируса болезни Ауески. Так, мутанты вируса инфекционного ринотрахеита вследствие делеции в гене тимидинкиназы не способны кодировать синтез этого фермента в клетках инфицированного организма. Нарушение этой функции генома вируса сопровождается его аттенуацией при сохранении антигенных свойств.

Основное требование к живым вакцинам на основе делеционных мутантов вирусов — их выраженная репликация in vitro и in vivo с тем, чтобы производство вакцин было экономически выгодным, а применение достаточно эффективным.

Любой вакцинный штамм должен быть хорошо изучен, клонирован, паспортизирован и комиссионно сдан во Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов, где он хранится, поддерживается и контролируется.

Так как свойства вакцины определяются вакцинным штаммом, то к ним предъявляются следующие основные требования:

генетическая стабильность — способность сохранять свои свойства в различных условиях пассирования на восприимчивых животных, в системе культивирования, хранения и т. д., т. е. штамм не должен подвергаться реверсии (возврату в исходное состояние);

безвредность — вакцинный штамм не должен вызывать клиническую картину болезни, вместе с тем должен обладать способностью «приживаться» (размножаться) в организме естественно восприимчивых животных. От длительности приживаемости обычно зависят продолжительность и напряженность иммунитета. Высокоиммуногенные штаммы приживаются в организме на 2—4 нед.

При идеальном исходе аттенуации вирус должен практически утрачивать способность поражать клетки-мишени, но сохранять

способность размножаться в других клетках, обеспечивая создание выраженного и напряженного иммунитета при минимальной реактогенности и полной безопасности.

Живые вакцины обладают рядом существенных преимуществ перед инактивированными вакцинами:

1) создают высокую напряженность и длительность иммунитета (более чем на 1 год, иногда на всю жизнь), так как в организме вакцинные штаммы размножаются, вызывая развитие вакцинной реакции, сходной с естественным постинфекционным процессом, происходит активация всех компонентов иммунной системы, стимулируется общий (системный) и местный ответ;

2) требуются малые прививочные дозы и для большинства из них однократное введение;

3) возможное применение их не только подкожно, внутримышечно, но и перорально, интраназально и аэрозольно;

4) иммунитет вырабатывается в более короткий срок, на первых этапах обычно за счет интерферона, а затем уже — накопления вируснейтрализирующих антител;

5) технология и экономичность изготовления их превосходят создание инактивированных вакцин.

Несмотря на преимущества живых вакцин по некоторым позициям, у них есть недостатки:

1) иногда возможны поствакцинальные осложнения у молодых, ослабленных и беременных животных;

2) возможно, хотя и в редких случаях, внесение в организм животных контаминантов (латентных вирусов, микроорганизмов), загрязняющих вакцины. Например, культуры клеток из тканей крупного рогатого скота нередко инфицированы аденовирусами, вирусами диареи, парагриппа-3; куриные эмбрионы — вирусами лейкозно-саркоматозного комплекса, аденовирусами, микоплазмами; культуры клеток свиного происхождения — парвовирусами, классической чумы свиней. Неконтролируемое попадание посторонних агентов в вакцину может привести к серьезным последствиям;

3) возможна реверсия вакцинного штамма;

4) живые вакцинные штаммы весьма чувствительны к неблагоприятным факторам, возникающим при производстве, хранении, транспортировке и применении;

5) нужен довольно длительный срок для получения аттенуированных вакцинных штаммов.

Генетический механизм аттенуации недостаточно изучен. Это обстоятельство не дает возможности предложить единое правило получения вакцинных штаммов. Несмотря на попытки многих исследователей, до сих пор не получено аттенуированных вакцинных штаммов вирусов ящура, инфекционной анемии лошадей и др.

Живые вакцины широко применяют в основном для животных на откорме и не рекомендуются в репродуктивных стадах. Готовят

их на биофабриках, биокомбинатах или других предприятиях по производству биопрепаратов, которые получают вакцинные штаммы из Всероссийского государственного научно-исследовательского института контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов.

Таким образом, технология изготовления живых вакцин сводится к культивированию вакцинного штамма в какой-либо биологической системе (животные, эмбрионы птиц, культуры тканей и клеток); определению концентрации вируса (его титра) в вируссодержащем материале; контролю на стерильность (отсутствие посторонних контаминантов); фасовке и лиофилизации (перед лиофилизацией для сохранения биологической активности вируса добавляют стабилизирующие вещества). Затем вакцины проходят контроль на стерильность, биологическую активность, реактогенность, безвредность, антигенную и иммуногенную активности. Если вакцина отвечает всем установленным показателям, ее этикетируют и выпускают для применения.

Живую вакцину обычно называют вирусвакциной. Анализ данных применения живых вакцин свидетельствует о достаточно высокой эффективности многих из них, например, таких, как вакцины против чумы крупного рогатого скота, чумы плотоядных, болезни Ньюкасла и др.

Инактивированные вакцины. Это наиболее сложные по составу биопрепараты. Для получения их обычно используют эпизоотические вирулентные вирусы. Их подвергают щадящей обработке (инактивации), которая приводит к необратимой утрате способности вируса размножаться (репродуцироваться), но при этом сохраняются его антигенные и иммуногенные свойства. Следовательно, в инактивированной вакцине должен быть «убит» вирусный геном (нуклеиновая кислота) и не должны подвергаться изменениям белки, гликопротеины, полисахариды вируса, так как иммунный ответ обусловлен главным образом веществами поверхности капсида вируса. В результате вирус утрачивает способность к репродукции и инфицированию, но сохраняет способность стимулировать у животных специфические факторы иммунитета.

Изготовление инактивированных вакцин также начинается с выбора производственного штамма вируса (с учетом основных его биологических свойств), культивирования и накопления производственного штамма вируса в чувствительной биологической системе (животные, эмбрионы птиц, культура клеток). Затем вируссодержащий материал подвергают очистке и концентрированию различными методами (низкоскоростное центрифугирование, фильтрование, ультрацентрифугирование и др.). Очистка и концентрирование вирусных агентов — важный этап, так как «убитый вирус» не размножается в организме, и для получения достаточно интенсивного иммунного ответа необходимо вводить значительное количество вирусного материала. Суспензии вируса должны

быть очищены от балластных веществ (фрагментов клеточных структур, невирусных белков, липидов и др.), которые дают дополнительную нагрузку на иммунную систему организма и значительно снижают специфичность и напряженность иммунных реакций. Полученная после очистки и концентрации вируссодержащая суспензия подвергается инактивации. В случае особо опасных вирусов инактивация предшествует процессу очистки. При этом необходимо иметь в виду, что балластные вещества препятствуют процессу инактивации.

Важным условием эффективности вакцин является выбор инактиватора и оптимальных условий инактивации, позволяющих полностью лишить вирус инфекционности при максимальном сохранении антигенности. Однако механизм инактивирующих воздействий недостаточно изучен и их использование зачастую эмпирическое.

Для инактивации вирусов используют физические и химические методы. Из физических методов наиболее распространенными являются γ-лучи, УФ-лучи, воздействие температуры, реже ультразвука, фотодинамическое воздействие некоторых красителей (метиленовая синька, акридиновый оранжевый, толуидин и др.). Наиболее уязвимыми мишенями для γ-лучей являются пуриновые и пиримидиновые основания. Белковая оболочка под воздействием радиации повреждается незначительно. Этот метод дает возможность одновременно надежно инактивировать и стерилизовать готовый препарат.

Эффективность УФ-лучей определяется их проницаемостью и адсорбцией биологическими молекулами. Белки поглощают УФ-лучи в меньшей степени, чем нуклеиновые кислоты и поэтому более устойчивы к их действию. Полагают, что под влиянием УФ-лучей в нуклеиновой кислоте образуются димеры между соседними пирамидиновыми основаниями, а также ковалентные связи между нуклеиновой кислотой и белковой оболочкой.

В практике создания инактивированных вакцин наиболее широкое применение получили химические инактиваторы, такие, как формальдегид (присоединение формальдегида к аминогруппам пуринов и пиримидинов уничтожает матричную и информационную активность нуклеиновых кислот), β-пропиолактон, этиленимины, гидроксиламин (инактивирующее действие определяется его взаимодействием с пиримидиновыми основаниями нуклеиновой кислоты, зависящим от величины pH) и др. Реагенты, которые используют для инактивации вирусов, являются мутагенами, поэтому инактиватор должен либо подвергнуться самораспаду (β-пропиолактон, гидроксиламин), либо переведен в неактивную форму (нейтрализован), а продукты нейтрализации — остаться безопасными.

После инактивации осуществляют контроль на авирулентность, направленный на выявление оставшихся жизнеспособных

вирионов. Степень безопасности инактивированных вакцин неразрывно связана с чувствительностью тест-системы, по которой оценивается полнота инактивации вируса. Для этой цели используют чувствительные культуры клеток животных, в том числе эмбрионов птиц. При этом репродукции вируса быть не должно.

Индивидуальный подход определяется свойствами вируса, особенностями болезни, чувствительностью биологических систем. Так, авирулентность вакцин против ящура определяют на крупном рогатом скоте (это более надежно), на свиньях, лабораторных животных и культуре клеток; вакцину против бешенства — на белых мышах; вакцину против болезни Ауески — на кроликах или в культуре клеток, которую использовали для накопления вируса; вакцину против болезни Ньюкасла — на куриных эмбрионах (не менее трех слепых пассажей). Если производственный штамм вируса, который используют для получения вакцины, культивируется в культуре клеток и вызывает характерные цитопатические изменения, то общепризнанным методом является испытание инактивированных препаратов в чувствительных культурах клеток (не менее трех слепых пассажей). Однако при оценке безопасности некоторых вакцин используют сложные комплексные подходы.

Для повышения иммуногенной активности вакцины в ее состав вводят адъюванты — вещества разнообразной химической природы, неспецифически стимулирующие иммунный ответ к различным антигенам. В качестве адъювантов используют: гидроксид алюминия, аэросил, минеральные масла, ДЭАЭ-декстран, сапонин; кроме того, используют синтезированные вещества — мурамилдипептид, полианионы, поликатионы и др. Механизмы действия адъювантов разнообразны и до конца не изучены. Одни из них вызывают воспалительную реакцию, другие способствуют депонированию антигенов и замедляют их гидролиз, третьи способствуют усилению поглощения антигенов макрофагами и антигенпредставляющими клетками.

К адъювантам предъявляют следующие требования: они должны быть нетоксичными в используемых дозах, не вызывать побочных реакций в организме, сами не обладать антигенной активностью, должны стимулировать развитие длительного гуморального и клеточного иммунитета.

После добавления адъюванта вакцину контролируют на отсутствие посторонних контаминантов (бактерий, грибов) путем посева на питательные среды (МПА, МПБ, МППБ, Сабуро или Чапека). Роста микроорганизмов не должно быть. Затем вакцину фасуют во флаконы и этикетируют. Окончательный контроль вакцины на основные показатели: авирулентность, стерильность, безвредность, допустимую степень реактогенности (на восприимчивых животных), антигенную и иммуногенную активность (на лабораторных и восприимчивых животных) осуществляют государствен-

ные контролеры в соответствии с техническими условиями на данный препарат.

Инактивированные вакцины отличаются большей стабильностью свойств, они безопаснее. Их применяют для животных любого возраста и в репродуктивных стадах. Такие вакцины используют преимущественно с профилактической целью в благополучных хозяйствах и угрожаемых зонах. Однако эти вакцины имеют некоторые недостатки:

1) технология их изготовления гораздо сложнее, что связано с необходимостью получения большого количества вируссодержащего материала, очистки, концентрации антигена, инактивации вирусного генома и включения в состав вакцины адъювантов;

2) необходимо проводить прививки многократно и в значительных дозах;

3) они индуцируют менее напряженный и длительный иммунитет, чем при использовании живых вакцин;

4) применять их возможно только парентерально;

5) они слабее стимулируют Т-систему иммунитета и местный иммунный ответ, поэтому резистентность слизистых оболочек верхних дыхательных путей и пищеварительного тракта бывает менее выражена, чем после применения живых вакцин;

6) способны иногда вызывать аллергическое состояние после повторной вакцинации.

Технология производства инактивированных вакцин сложнее, чем живых вакцин, и состоит из следующих этапов:

1) выбор производственного штамма;

2) культивирование вируса в биологической системе;

3) определение концентрации вируса (антигена);

4) инактивация, очистка и концентрация вирусного материала;

5) добавление адъюванта;

6) внутрицеховой контроль;

7) расфасовка, этикетирование;

8) заключительный контроль на стерильность, авирулентность, безвредность, реактогенность, антигенную и иммуногенную активность.

Помимо традиционных цельновирионных вакцин (живых, инактивированных) разработаны методы создания вакцин новых поколений: субъединичных, синтетических, получаемых методами генной инженерии. Совершенствование вакцин шло в направлении снижения количества балластных компонентов, снижения реактогенности и повышения иммуногенности препарата.

Субъединичные вакцины. В вакцинах, приготовленных из цельных вирионов, лишь поверхностные протективные антигены, составляющие обычно около 10 % вирусных белков, вызывают развитие вирусспецифического иммунитета. Остальные белки и липиды лишь усиливают реактогенность и вызывают развитие

аллергических реакций. Поэтому вполне закономерно получение суъединичных вакцин, содержащих протективные антигены. Как промежуточный этап были использованы *расщепленные вакцины,* или *сплит-вакцины,* которые получают путем дезинтеграции вируса (для этого используют различные детергенты, ультразвук и др.) с целью инактивации вирусного генома и удаления липидов. Такие вакцины менее реактогенны, чем цельновирионные, однако в них сохранены балластные вирусные белки, не играющие роли в создании протективного иммунитета.

Субъединичные вакцины лишены этих недостатков. Их готовят следующим образом. Очищенные препараты вируса разрушают детергентами (тритон х-100, твины 20—80, додецилсульфат натрия и др.), ферментами, органическими растворителями липидов и т. д. Затем выделяют поверхностные протективные антигены путем ультрацентрифугирования, хромотографии на колонках. Очищенные препараты стерилизуют и концентрируют. Полученные таким путем субъединичные вакцины не содержат геномов возбудителей и балластных антигенов, обладают минимальной реактогенностью, однако иммуногенные свойства их обычно слабее, чем у цельновирионных вакцин.

Большинство опасных вирусных инфекций человека и животных вызывают вирусы, имеющие суперкапсидную оболочку, а гликопротеины на их поверхности являются ключевыми антигенами, индуцирующими противовирусный иммунитет. Считается, что в обеспечении высокой иммуногенности гликопротеинов играет роль форма их надмолекулярной организации в препарате — мицеллярные формы обладают высокой иммуногенностью, тогда как мономерные формы не способны индуцировать формирование высокого уровня иммунитета. Таким образом, технология приготовления эффективных субъединичных вакцин должна предусматривать возможность мягкой, неденатурирующей экстракции гликопротеинов вирусной оболочки с последующим образованием из них мультимерных агрегатов. Для повышения иммуногенности изолированных гликопротеидов их встраивают в липосомы. Иммуностимулирующие свойства липосом подтверждены на ряде субъединичных вакцин. Реконструкция трансмембранных белков в липосомы, по-видимому, в наибольшей степени приближает их структуру к естественной. Липосомы и мицеллы гликопротеинов одинаково эффективно связываются с клеточной поверхностью и, вероятно, одинаково доступны для взаимодействия с клетками иммунной системы.

Технологический процесс получения субъединичных вакцин сложный и требует дорогостоящего специального оборудования, поэтому экономически они не всегда выгодны. Высокая стоимость очищенного антигенного материала сдерживает их широкое применение, хотя преимущество их неоспоримо. Отсутствие побочных реакций, неограниченные возможности для ассоциации

антигенов, длительное сохранение в минимальных объемах и полнейшая безопасность в связи с отсутствием в препаратах вирусных геномов свидетельствуют о том, что будущее за субъединичными вакцинами.

За рубежом и в нашей стране есть несколько субъединичных вакцин: против бешенства, болезни Ауески, инфекционного ринотрахеита, гриппа и др. Так, в нашей стране применяют субъединичную трехвалентную противогриппозную вакцину — гриппол. Она содержит поверхностные белки (гемагглютинин и нейроминидазу) двух типов вируса гриппа — А и В. В качестве адъюванта включен полиоксидоний. Проводятся работы по созданию вакцин против ящура, болезни Марека, инфекционной анемии лошадей и др.

Синтетические вакцины. Их создают путем биоорганического синтеза антигенных детерминант протективных вирусных белков. Получение таких вакцин возможно при полной расшифровке структуры (последовательности аминокислот) этих антигенных детерминант. Синтетические вакцины — это препараты, содержащие искусственно синтезированные короткие пептиды, имитирующие небольшие участки протективных антигенов вируса, способные вызвать специфический иммунный ответ организма и защитить его от конкретного заболевания. Для получения таких вакцин используют автоматические синтезаторы. Однако синтетические пептиды оказались слабыми антигенами, и для усиления иммуногенности они нуждаются в соединении с белком-носителем или синтетическим биополимером (мурамилпептид, сополимеры Д-глутамина и др.).

Проблема, связанная с синтетическими пептидами, состоит в том, что многие антигенные вирусные детерминанты представляют собой не непрерывную последовательность аминокислот, а конформационные кислотные участки, собранные вместе благодаря пространственной организации белка. Для иммунного ответа конформация является очень важной. Циклизированные пептиды показали бóльшую иммуногенность, чем их линейные аналоги.

Возможность использования синтетических пептидов для индукции иммунитета у животных впервые была показана на примере ящура. Это стало возможным после того, как было установлено, что за индукцию вируснейтрализующих антител вируса ящура ответственен белок VP-1. Позднее был синтезирован пептид, содержащий аминокислотные последовательности VP-1 (141—160), который связали с гемоцианином и адъювантом Фрейнда. Вакцину испытали на морских свинках, свиньях и крупном рогатом скоте. Вакцина защитила животных от заболевания при заражении их вирулентным штаммом вируса. Однако антительный ответ был в 10—100 раз ниже, чем после иммунизации цельными вирионами. Указанная вакцина не нашла широкого практического применения.

Получены обнадеживающие результаты применения синтетических вакцин против гриппа, гепатита В, полиомиелита и др.

Антиидиотипические вакцины. Это — антитела к антителам против вирусных антигенов, которые по структуре сходны с антигенами и способны индуцировать гуморальный и клеточный иммунные ответы.

Идиотипы фактически являются антигенными детерминантами активного центра конкретного антитела. Если этими антителами иммунизировать животных другого вида, то в их организме индуцируется синтез антител, приобретающих как бы свойства антигена. Эти антитела являются зеркальным отображением образа антигена. Таким образом, антитела на антитела предстанут в образе антигена. Введение этих антиидиотических антител создает защитный эффект против возбудителя, к которому были получены первичные антитела.

Антиидиотические антитела были получены для индукции иммунного ответа к вирусам гриппа, диареи крупного рогатого скота и др.

Генно-инженерные вакцины. Генная инженерия — это экспериментальная наука, изучающая закономерности конструирования in vitro и поведение в реципиентной клетке функционально активных молекул рекомбинантной ДНК. Объектом исследования генной инженерии являются гены — отрезки ДНК, кодирующие синтез тех или иных белков.

Принцип создания генно-инженерных вакцин заключается в том, что интересующий нас ген (ответственный за синтез иммунного белка вируса) «вырезают» из ДНК вируса с помощью ферментов (рестриктаз) и встраивают, используя ферменты (лигазы), в ДНК вектора (например, в плазмиду E. coli — это автономная кольцевая ДНК из 4—6 тыс. пар нуклеотидов, способная размножаться в клетках E. coli). Затем эту рекомбинантную ДНК вводят в клетки E. coli, в которых рекомбинантная ДНК размножается (реплицируется) и происходит экспрессия встроенного гена, т. е. синтез соответствующего белка (кодируемого встроенным геном вируса) (цв. вкл., рис. 11).

Бактериальные клетки E. coli культивируют в питательной среде, и происходит «наработка» иммуногенного белка вируса, который выделяют и после соответствующей очистки используют в качестве материала для вакцины. Однако необходимо отметить, что многие вирусные белки, успешно синтезированные в микроорганизмах, имеют очень низкую иммуногенную активность. Причина этого в особенностях формирования структуры вирусных белков. Как правило, они гликозилированы, имеют сложную третичную или четвертичную структуру. Так, гемагглютинин вируса гриппа находится в вирионе в виде тримера, который образуется из мономерных полипептидов в клетках животных. Получить in vitro такую функционально активную структуру гемагглютинина не уда-

ется. Иммуногенность гемагглютинина в вирионе в несколько тысяч раз выше, чем мономерного полипептида, синтезированного в бактериях.

При получении генно-инженерных вакцин в качестве векторов кроме плазмид используют фаги, дрожжи, вирусы животных (вирус осповакцины, аденовирусы, бакуло- и герпесвирусы).

Наибольший эффект получен с вирусом осповакцины, используемым в качестве вектора. Этот вирус имеет большой геном (около 187 тыс. пар нуклеотидов). Из него можно удалить значительный участок (около 30 тыс. пар нуклеотидов), который не является жизненно необходимым для репродукции этого вируса в клетках, а на его место встроить чужеродные гены тех вирусов, против которых получают вакцину. Полученные при этом рекомбинантные ДНК способны размножаться в организме привитых и индуцировать образование иммунитета не только против оспы, но и против того вируса, чей ген встроен в его геном. Использование вируса осповакцины в качестве вектора для вакцинации имеет ряд преимуществ: способность размножаться в клетках животных многих видов; экспрессировать несколько генов; индуцировать гуморальный и клеточный иммунитеты; термостабильность; экономичное производство и легкость применения. Выявленные ранее недостатки у вируса осповакцины, связанные с реактогенностью, были в основном устранены с помощью генетических манипуляций. Возможность включения нескольких генов, кодирующих соответствующие иммуногены, дают возможность вакцинировать животных одновременно против нескольких вирусных болезней. Однако необходимо иметь в виду, что индивидуумы, уже иммунные к вирусу осповакцины, при вакцинации рекомбинантным вирусам не дают эффекта ввиду отсутствия его приживаемости.

В последние годы получены профилактические препараты из рекомбинантного штамма вируса осповакцины, содержащего гены, кодирующие поверхностные гликопротеиды вирусов гриппа, бешенства, респираторно-сицитиального, болезни Ауески, инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота и др.

ДНК-вакцины (полинуклеотидные вакцины). Последние достижения генной инженерии и биотехнологии привели к бурному развитию совершенно нового направления вакцинологии — к ДНК-вакцинам.

Основой ДНК-вакцины является бактериальная плазмида (автономная кольцевая ДНК из 4—6 тыс. пар нуклеотидов), способная эффективно размножаться в клетках E. coli. В плазмиду генно-инженерными методами (используя ферменты рестриктазы, лигазы и т. д.) встраивают «смысловой» ген, кодирующий иммуногенный белок того вируса, от которого будет защищать ДНК-вакцина. На практике в качестве исходной плазмиды используют модифицированную плазмиду, содержащую эукариотический промотор

(обеспечивает высокий уровень экспрессии генов) цитомегаловируса или обезьяньего вируса 40, или вируса саркомы Рауса, и сигналы терминации транскрипции и полиаденилирования, позволяющие продуцировать иммуногенный белок вируса в клетках животных. Кроме того, в плазмиде есть ген устойчивости к антибиотику (например, к ампициллину), необходимому для ее селекции при клонировании и выращивании.

Таким образом получают рекомбинантную плазмиду (цв. вкл., рис. 12 и рис. 35, 36), которую выращивают (реплицируют) в необходимых количествах в бактериальных клетках E. coli в присутствии ампициллина и после соответствующей очистки плазмиды используют для иммунизации животных. Обычно используют физиологический раствор, в котором во взвешенном состоянии находятся полученные плазмиды (это снимает проблему реактогенности препарата).

Результаты исследования на лабораторных животных показали, что количество рекомбинантной плазмиды, необходимой для вакцинации при внутримышечном введении, может колебаться в пределах 0,001—10 мкг на 1 кг живой массы.

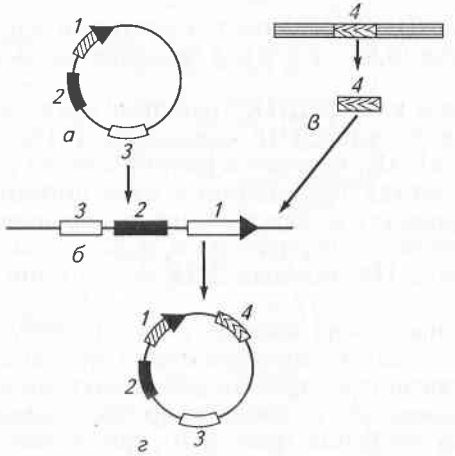


Рис. 35. Принципиальная схема получения рекомбинантных плазмид, используемых для ДНК-вакцинации:

а — исходная плазмида может размножаться в клетках E. coli, содержит в своем составе ген устойчивости к антибиотику, например ампициллину, необходимому для ее селекции при клонировании и выращивании (*2*), и нуклеотидные последовательности, кодирующие эукариотический промотор (*1*), и сигналы терминации транскрипции и полиаденелирования (*3*); стрелкой показано направление считывания генетической информации; *б* — для того чтобы встроить в исходную плазмиду «смысловой» ген методами специфического гидролиза, ее переводят из кольцевой в линейную форму; *в* — «смысловой» ген (*4*) находится в составе генома патогена, откуда его выделяют и культивируют, используя полимеразную цепную реакцию (если геном патогена представляет собой РНК, то предварительно получают ДНК-копию интересующего участка генома); *г* — после лигирования исходной плазмиды «смысловым» геном и последующего клонирования получают векторную плазмиду, содержащую в себе «смысловой» ген

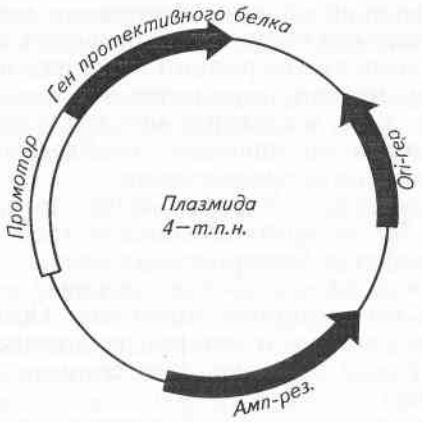


Рис. 36. Плазмидная ДНК для экспрессии чужеродных генов в клетках млекопитающих

Плазмидная ДНК поглощается клетками животных в небольшом количестве (0,01—1,0 %), а большая часть ее быстро разрушается.

Проникшая в клетку ДНК транспортируется в ядро и транскрибируется (клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразой II) с образованием иРНК, которая в цитоплазме на рибосомах клетки обеспечивает синтез полноценного иммуногенного белка возбудителя, что приводит к образованию гуморального и клеточного иммунного ответа и, следовательно, к формированию напряженного иммунитета. Плазмидная ДНК функционирует в клетках до 3—6 мес.

ДНК-вакцины можно вводить внутрикожно, внутримышечно, подкожно, внутривенно, интраназально, орально. Наиболее перспективными считают внутрикожный и внутримышечный методы. Заслуживают внимания результаты по так называемому баллистическому методу введения (gene gun), когда частички золота диаметром 1—2 мкм, покрытые плазмидной ДНК, с помощью специального прибора доставляют в клетки кожи. Для получения одинакового эффекта требуется ДНК в 100—5000 раз меньше, чем при внутримышечном способе введения.

Механизм иммунного ответа при ДНК-вакцинации пока не совсем ясен. Однако имеющиеся данные позволяют предположить, что это выглядит следующим образом (рис. 37). Синтезированный в клетках белок расщепляется в плазматических протеосомах на короткие пептиды (8—16 аминокислот), представляющие собой отдельные эпитопы или антигенные детерминанты. Пептиды транспортируются белками-переносчиками в эндо-

плазматический ретикулум. Там они связываются с молекулами белков главного комплекса гистосовместимости класса I (ГКГСI) — мембранными гликопротеидами и транспортируются на поверхность клеток, где распознаются цитотоксическими Т-лимфоцитами. Последние активируются, размножаются, и образуется пул цитотоксических Т-лимфоцитов, способных обеспечить гибель клеток-мишеней, т. е. клеток, зараженных вирусом.

Синтезированный в клетках иммуногенный белок может транспортироваться из клетки в межклеточное пространство. Он связывается с антигенпрезентирующими клетками (макрофагами), проникает в них путем эндоцитоза, расщепляется на короткие фрагменты (10—20 аминокислот) белка, которые объединяются с молекулами ГКГС класса II и транспортируются к поверхности клетки, где они узнаются соответствующими клонами Т-хелперов и В-клеток, что приводит к активации В-клеток и

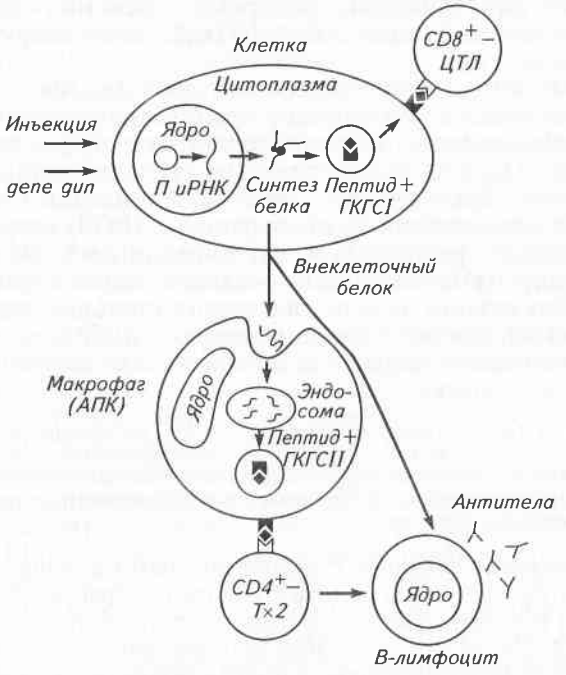


Рис. 37. Схема индукции клеточного и гуморального иммунного ответа ДНК-вакцинами:

П — плазмида; *иРНК* — информационная РНК; *АПК* — антигенпрезентирующая клетка; *CD8⁺-ЦТЛ* — цитотоксический Т-лимфоцит, несущий кластер дифференцировки 8 (мембранный маркер с порядковым номером 8); *CD4⁺-Тх2* — Т-хелпер второго типа, несущий кластер дифференцировки 4 (*по Б. Г. Орлянкину*)

дифференцировке их в плазматические клетки, секретирующие антитела. Действие цитотоксических Т-лимфоцитов также стимулируется Т-хелперами посредством продукции ими цитокинов — медиаторов межклеточных взаимодействий.

Таким образом, плазмидная ДНК с встроенным геном иммуногенного белка вируса индуцирует у животных полноценный гуморальный и клеточный иммунный ответ.

Для усиления иммуногенных свойств ДНК-вакцин их вводят совместно с плазмидами, в которые встроены гены цитокинов (регуляторы иммунного ответа). Кроме того, введение ДНК-вакцин в липосомах или в микрокапсулах обеспечивает высокий уровень гуморального и клеточного иммунного ответа.

В настоящее время сконструировано более 20 ДНК-вакцин против различных вирусных болезней животных и человека: бешенства, болезни Ауески, болезни Ньюкасла, инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, лейкоза крупного рогатого скота, ринопневмонии лошадей, синдрома снижения яйценоскости, парвовирусной инфекции собак, СПИДа, герпесвирусных инфекций человека и др.

ДНК-вакцины наиболее перспективны для профилактики болезней, склонных к длительному хроническому течению. Они обладают безопасностью инактивированных и эффективностью живых вакцин. Однако пока нет полных сведений о том, какова эффективность ДНК-вакцин при иммунизации ими людей. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) разработала унифицированные требования к ДНК-вакцинам*. Эффективность иммунизации ДНК-вакцинами очевидна, однако технология разработки этих вакцин находится в стадии становления и интенсивного изучения. Потребуется еще немало усилий для практической реализации нового подхода к профилактике вирусных болезней животных и человека.

Примечание. Репликация плазмидной ДНК происходит только в бактериальных клетках, тогда как транскрипция гена иммуногенного белка осуществляется только в клетках млекопитающих. Опыты на животных показали, что плазмидная ДНК не реплицируется, не встраивается в хромосомы и на нее не образуется антител в организме животных.

Растительные вакцины. Революционным направлением является разработка вакцин на основе трансгенных растений, в геном которых был встроен фрагмент генома патогенного микроорганизма или вируса. Экспериментальные данные свидетельствуют о широкой перспективе в разработке и практическом использовании таких вакцин. В 1998 г. на картофеле, который продуцировал В-субъединицу холерного анатоксина, была получена выраженная защита у поедавших его мышей при заражении их холерой. Аналогичная

* Biologicals, 1998. — Т. 26. — С. 205—212.

вакцина против кори была получена на табаке. Сейчас с обнадеживающими результатами испытываются «картофельные» вакцины к вирусу Ньюарк (возбудителю диареи) и гепатиту В. На животных исследуют выращенные на помидорах вакцины против бешенства.

Микрокапсулированные вакцины. Для получения таких вакцин используют биодеградирующие микросферы, которые, с одной стороны, предохраняют антиген от вредного влияния окружающей среды, а с другой стороны, распадаясь, освобождают антиген в заданное время. Микрокапсулы состоят из нетоксических полимеров лактида или гликолида или их сополимеров. Микросферы могут быть разной величины, максимальный диаметр обычно не превышает 10 мкм. Вакцины можно вводить любым способом (парентерально, орально, интраназально и пр.). В экспериментальных условиях испытано несколько десятков таких вакцин. С помощью микросфер можно проводить комплексную вакцинацию против нескольких инфекций одновременно: каждая капсула может содержать несколько антигенов, а для иммунизации можно брать смесь различных микрокапсул. Таким образом, микрокапсулирование позволяет значительно сократить количество инъекций при вакцинации.

Чрезкожная иммунизация. Было показано, что кожные пластыри, пропитанные В-субъединицей холерного токсина, не вызывают токсического эффекта. В то же время они активируют антигенпрезентирующие клетки, находящиеся в изобилии в коже. При этом развивается мощный иммунный ответ — как гуморальный, так и клеточный. Если в пластыре холерный токсин смешать с другим вакцинным антигеном, то иммунный ответ развивается и к нему. Такой путь испытывается для иммунизации против столбняка, бешенства, дифтерии, гриппа.

Антисмысловые РНК. Одним из новых перспективных направлений создания препаратов для вакцинопрофилактики является использование антисмысловых РНК и рибозим.

Молекулы антисмысловой РНК представляют собой относительно короткие рибонуклеотидные цепи (100—5000 нуклеотидов), комплементарные определенным участкам вирусного РНК-генома или отдельным вирусспецифическим мРНК. При взаимодействии антисмысловых РНК с комплиментарными регионами иРНК образуются РНК-РНК гибрид, что препятствует реализации имеющейся в мРНК информации. И следствием этого является ингибирование репродукции возбудителя. Таким образом, вакцина, основанная на принципах антисмысловых РНК, будет представлять вектор, в который встроен фрагмент одного из важных для репродукции генов возбудителя в обратной ориентации. Тогда продукт транскрипции этого гена будет иРНК, комплиментарная нормальному транскрипту генома возбудителя (схема). В этом случае, если антисмысловая РНК будет синтезирована в достаточных количествах, она с большой частотой будет гибридизоваться со смысловой РНК и подавлять экспрессию гена (рис. 38).

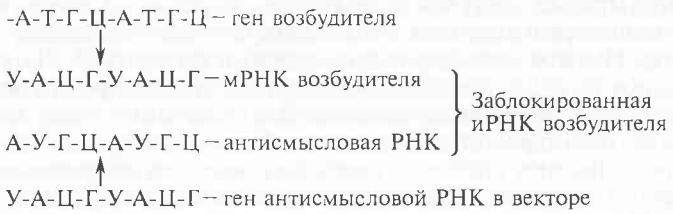


Рис. 38. Схема биологического действия антисмысловых РНК

Одной из проблем, возникающей при изучении биологического действия антисмысловых РНК, является обеспечение их избытка по отношению к уровню иРНК мишеней. Эту проблему можно решить по двум направлениям: во-первых, в качестве мишеней действия антисмысловых РНК выбирают гены ранних регуляторных белков, которые синтезируются в малом количестве копий, что позволит предотвратить вирусную инфекцию на самых ранних стадиях развития; во-вторых, высокую копийность антисмысловых транскриптов можно обеспечить установкой генов антисмысловых транскриптов под контроль сильных промоторов.

В настоящее время имеется большое количество исследований, проведенных с культурами клеток, зараженных вирусами лейкоза крупного рогатого скота, аденовирусами, вирусом иммунодефицита человека и др., в которых показан положительный эффект по ингибированию репродукции этих вирусов (А. В. Васильев и др., 2002).

Рибозимы. Одним из значительных событий в биохимии и молекулярной биологии последних лет стало обнаружение каталитических свойств у полирибонуклеотидов, впоследствии выделенных в отдельный класс каталитически активных молекул рибонуклеиновых кислот и получивших название «рибозимы».

Возможность РНК осуществлять ферментативные функции привела к переосмыслению РНК в биологии и химии, поскольку считали, что эти функции выполняют только белки. Рибозимы специфически расщепляют фосфодиэфирную связь в молекуле РНК.

Из-за небольших размеров (50—400 рибонуклеатидов) они являются очень удобной моделью как для изучения механизма действия каталитических РНК, так и для практического применения. Весьма интенсивно, особенно в последние годы, развиваются исследования рибозимов, связанные с использованием их в качестве терапевтических и профилактических агентов. В частности, как удобные и эффективные инструменты для ингибирования экспрессии генов клеточного и вирусного происхождения рибозимы открывают путь к созданию новых подходов к профилактике, терапии вирусных инфекций, опухолевых и наследственных заболеваний. Кроме того, для нужд сельского хозяйства принципиально возможно создание трансгенных растений и животных, стабильно синтезирующих рибозимы строго направленного действия — против определенных патогенов. Такие животные и растения будут обладать устойчивостью к определенным инфекциям вирусного или бактериального происхождения. Особую ценность рибозимам, как потенциальным профилактическим и терапевтическим агентам, придают их практически абсолютная специфичность и нетоксичность.

Создание антисмысловых молекул с рибозимной активностью приводит не только к образованию комплекса с РНК-мишенью, но и расщеплению в ней определенной фосфодиэфирной связи.

Дальнейшее применение рибозимов в качестве профилактических и терапевтических агентов будет зависеть от разработки оптимальных способов переносов, эффективности и стабильности рибозимов. Существуют две основные стратегии доставки рибозимов в клетки: экзогенный перенос — доставка в клетку синтезированной in vitro рибозимной РНК и эндогенный перенос — введение в клетки генов, кодирующих рибозимы. Экзогенный способ осуществляется с помощью липосом катионных липидов и других методов.

Для осуществления эндогенного способа используют плазмидные или вирусные векторы. В качестве вирусных векторов применяют ретровирусы, аденовирусы и др.

В настоящее время были испытаны с положительным эффектом рибозимы для блокирования репродукции вирусов гриппа, иммунодефицита человека, гепатита С, лимфоцитарного хориоменингита и др.

* * *

Поствакцинальный иммунитет складывается из двух видов иммунных реакций: гуморальной и клеточной. Отсутствие циркулирующих антител еще не является доказательством слабого иммунитета. В основе резистентности к некоторым видам инфекций лежат клеточные механизмы, поэтому вакцины, используемые для профилактики этих инфекций, должны формировать клеточный иммунитет. Антигенность (способность антигена вызывать образование антител и взаимодействовать с ними) не всегда совпадает с иммуногенностью и протективной активностью антигенов. Например, очищенная фракция гликопротеина, полученная из респираторно-синцитиального вируса, вызывает образование антител, которые не только не защищают, а, наоборот, усиливают поражение легких при последующем заражении вирусом. Этот феномен еще недостаточно изучен. Предполагается, что в основе ослабления резистентности может лежать повышенная чувствительность, которая развивается после введения этого гликопротеина.

Иммуногенность вакцин составляет основу ее эффективности. Как правило, корпускулярные вакцины (живые, убитые) обеспечивают необходимую иммуногенность, а в остальных случаях часто приходится использовать дополнительные методы повышения иммуногенности вакцин.

Основные способы повышения иммуногенности вакцин:

1) очистка вакцин от низкомолекулярных веществ, способных вызвать специфическую или неспецифическую супрессию иммунного ответа;

2) агрегация антигена с помощью ковалентного связывания и других методов комплекса образования;

3) включение в вакцину максимального количества эпитопов антигена;

4) сорбция на веществах, создающих депо антигена (гидроксид алюминия, фосфат кальция и др.);

5) смешивание с маслом (водно-масляные эмульсии);

6) добавление микробных, растительных и других видов адъювантов;

7) связывание слабого антигена с носителем (столбнячным, дифтерийным анатоксином и др.);

8) усиление иммуногенных свойств вакцины с помощью искусственных носителей — адъювантов (полиоксидоний и др.);

9) включение антигена в микрокапсулы, обладающие адъювантными свойствами, обеспечивающие выброс антигена через заданный промежуток времени, использование липосом;

10) улучшение условий процессинга и презентации антигена. Использование антигенов гистосовместимости класса I и II или антител к этим антигенам.

С точки зрения молекулярной и клеточной иммунологии вакцина должна удовлетворять следующим требованиям:

1) активировать вспомогательные клетки (макрофаги, дендритные клетки, клетки Лангенрганса), участвующие в процессинге и презентации антигена;

2) содержать эпитопы для Т- и В-клеток, обеспечивающие необходимое соотношение гуморального и клеточного иммунитета;

3) легко подвергаться процессированию, ее эпитопы должны обладать способностью взаимодействовать с антигенами гистосовместимости класса I и (или) II;

4) индуцировать образование регуляторных клеток (Т-хелперов, В- и Т-супрессоров), эффекторных клеток (киллеров, Т-эффекторов ПЧЗТ, антителообразующих клеток) и клеток иммунологической памяти.

Контрольные вопросы

1. Каков принцип изготовления живых вакцин и каковы их преимущества и недостатки перед инактивированными вакцинами? 2. Каковы принципы конструирования инактивированных цельновирионных вакцин? 3. Что представляют собой субъединичные (молекулярные) противовирусные вакцины и каковы методы их конструирования? 4. Какова роль генно-инженерных методов в создании противовирусных вакцин? 5. Какова роль адъювантов и иммуномодуляторов в повышении иммуногенных свойств противовирусных вакцин?

1.10. ХИМИОТЕРАПИЯ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

Химиотерапия вирусных инфекций — это особая проблема. Успехи в поиске эффективных противовирусных терапевтических препаратов пока не столь значительны как в области противомикробных средств. Трудность заключается в создании препаратов, избирательно подавляющих репродукцию вируса и не затрагивающих процессы жизнедеятельности клеток и всего организма в целом.

Большинство ингибиторов вирусспецифических процессов, тесно связанных с метаболизмом, энергетическим обменом и ферментативными реакциями в клетке, практически всегда оказывают токсическое воздействие и на нее. Именно это считают главным объяснением того, что до сих пор не найден «волшебный препарат» против всех вирусов. Как правило, имеющиеся в терапевтической практике препараты обладают довольно низкой эффективностью, и то в случае применения на ранней стадии болезни. Они имеют узкий спектр действия (в лучшем случае, в пределах одного семейства) и к ним быстро формируется резистентность у патогенных вирусов. Тем не менее это направление интенсивно развивается, хотя каждый новый препарат появляется не скоро.

Поиск антивирусных препаратов идет по двум направлениям: направленный поиск и скрининг. В первом случае предпринимаются попытки использовать известные свойства химических соединений для целенаправленного воздействия на тот или иной этап репродукции вируса, т. е. изучение идет от предполагаемого механизма действия к препарату. Второй путь опирается на испытанный веками «метод тыка» — скрининг (отбор, просеивание), предполагая вылавливание активных препаратов среди широкого спектра химических соединений различного класса. Скрининг призван научно использовать случай. Поиск идет от препарата, а механизм, как полагают, приложится после. На первом этапе выявляется степень ингибирования репродукции вирусов; на втором — токсическое действие отобранных препаратов на нормальные клетки; на третьем определяется минимальная концентрация препарата, не оказывающая токсического действия на клетки; на последнем этапе проводится дальнейшее изучение отобранных препаратов.

Результаты многолетних трудоемких поисков антивирусных веществ путем такого отбора оказались весьма скромными и увенча-

лись открытием единичных химиопрепаратов, обладающих узким спектром действия.

Благодаря достижениям фундаментальных исследований в области вирусологии и выяснению молекулярных механизмов репродукции вирусов первое направление в химиотерапии вирусных инфекций более перспективно. Но оно основано на направленном получении или синтезе химиопрепаратов, действующих на заведомо известные уязвимые стадии репродукции вирусов либо на функции клеток, необходимые на каком-то общем для различных групп вирусов этапе их репродукции.

Можно выделить три основные группы препаратов, подавляющих начальные (адсорбция, проникновение и депротеинизация), средние (синтез компонентов) и заключительные [композиция (сборка) и высвобождение] стадии взаимодействия вирусов с клетками.

Ингибиторы адсорбции, проникновения и депротеинизации. Обнаружен ряд синтетических препаратов, ингибирующие ранние этапы репродукции вирусов. Наиболее активными из них оказались «СИМО» — аналог сиаловой кислоты и «AMps» — α-аминопараметоксифенилметансульфоновая кислота, препятствующая адсорбции вирионов вируса гриппа типа А на клетках.

Ремантадин и амантадин специфически блокируют стадию раздевания вируса и вызывают накопление промежуточных продуктов раздевания. Они блокируют слияние вирусной оболочки с лизосомальной мембраной, блокируется удаление белка М, и вирусный геном не выходит из лизосомы. Оба препарата ингибируют репродукцию ряда вирусов — гриппа, болезни Ньюкасла, кори, краснухи, везикулярного стоматита, альфа-вирусов и других липидсодержащих вирусов. Амантадин и ремантадин — эффективные средства химиотерапии и химиопрофилактики гриппа.

Ингибиторы синтеза вирусных компонентов. Это главным образом аномальные нуклеозиды, которые ингибируют функции вирусных полимераз, а при включении во вновь синтезируемые нуклеиновые кислоты делают их нефункциональными. Наиболее известные препараты этой группы — азидотимидин, ацикловир, рибавирин.

Азидотимидин (зидовудин) ингибирует обратную транскриптазу, избирательно взаимодействует с ферментом ретровирусов, включая ВИЧ.

Ацикловир — нуклеозидный аналог гуанозина с высокой избирательностью к инфицированным вирусами клеткам. В клетках после последовательных превращений ацикловира образуется ациклогуанозинтрифосфат, который ингибирует ДНК-полимеразу вирусов, тормозя образование полноценной молекулы нуклеиновой кислоты, так как из-за отсутствия гидроксильной группы к ациклогуанозинтрифосфату не могут присоединиться последующие нуклеотиды. Препарат не влияет на синтез ДНК в незараженной клетке, так как в них он не превращается в активную форму. Он эффективен при лечении инфекций, вызванных вирусом простого герпеса.

Рибавирин — имеет широкий спектр действия, обладая эффективностью против ДНК- и РНК-содержащих вирусов — вирусов гриппа, парагриппа, полиомиелита, риновируса, везикулярного стоматита, герпеса, осповакцины и др.

Ингибиторы сборки и освобождения потомства вирионов. Такими ингибиторами являются производные тиосемикарбазонов. Практическое применение нашел метисазон. Антивирусное действие его обусловлено подавлением трансляции поздних вирусных иРНК и сборки вирусных частиц. Препарат активен против вирусов оспы.

Ингибиторы протеаз. Известно, что для возникновения инфекционного процесса необходима протеолитическая активность вируса, т. е. нарезание одного или нескольких его белков. Сущность этого феномена заключается в том, что многие вирусные белки приобретают функциональную активность лишь после протеолитического нарезания. У пикорна-, тога-, ретро- и других вирусов этот процесс лежит в основе формирования всех структурных вирусных белков, которые образуются в результате нарезания белка-предшественника. У ортомиксо-, парамиксо-, рео-, бунья-, аренавирусов и других протеолитическому нарезанию подвергаются в первую очередь гликопротеиды. Так, например, у парамиксовирусов на суперкапсидной оболочке вириона два гликопротеида: HN (гемагглютинин/нейраминидаза) и F (белок слияния); у вирусов гриппа НА (гемагглютинин) и NA (нейраминидаза). В процессе инфекции вирусные гликопротеиды у вирусов обоих семейств претерпевают протеолитическое нарезание. У парамиксовирусов белок F_0 нарезается на два гликопротеида — F_1 и F_2; у ортомиксовирусов протеолизу подвергается гемагглютинин, который нарезается на два фрагмента — НА1 и НА2.

Вирионы приобретают способность заражать клетки (т. е. становятся инфекционными) лишь после нарезания ($НА \rightarrow НА1 + НА2$, $F_0 \rightarrow F_1 + F_2$). Чем выше уровень протеолитического нарезания вируса в организме, тем интенсивнее развитие инфекционного процесса и выше вирулентность вируса.

Нарезание белков у различных вирусов осуществляется либо только клеточными, либо клеточными и вирусспецифическими протеазами. Для правильного нарезания белка, обеспечивающего его активность, необходимы протеазы определенной специфичности. Отсюда следует, что подавление активности протеаз, участвующих в нарезании вирусных белков, должно блокировать способность вирионов заражать чувствительные клетки.

В последние годы проводятся многочисленные эксперименты на модели ВИЧ. Отмечают усиление противовирусной эффектив-

ности при совместном использовании ингибиторов протеаз ВИЧ и аномальных нуклеозидов.

Ингибиторами протеаз являются препараты: гордокс, контрикал, апротинин и др.

* * *

Особое место в терапии вирусных инфекций занимают **интерфероны** и **интерфероногены**. В настоящее время известно, что противовирусную защиту клеток могут создавать все три типа интерферонов (α, β, γ), но γ-интерферон, кроме того, усиливает и реакцию иммунитета в организме. Механизм противовирусного действия интерферона сводится к разрушению вирусных иРНК и подавлению синтеза вирусных белков в клетке.

Индукторами (интерфероногенами) выработки эндогенного интерферона в организме являются многие вещества: вакцины, иммуномодуляторы, лекарственные препараты. Считается, что сильной интерфероногенной активностью обладают препараты бактериальных липополисахаридов и полисахаридов (продигиозан, зимозан и др.), препараты нуклеиновых полимеров (нуклеинат натрия, полигуация и др.), низкомолекулярные полифенолы (гозалидон, мегасин и др.) и низкомолекулярные ароматические углеводороды (циклоферон, неовир).

Некоторые исследователи отмечают значительные преимущества в применении интерфероногенов по сравнению с введением чистых экзогенных интерферонов. Во-первых, интерфероногены вызывают выработку эндогенного интерферона, который в отличие от экзогенного не обладает антигенностью для собственного организма. Во-вторых, эндогенный интерферон вырабатывается в физиологически приемлемых количествах и функционирует длительно, экзогенный же интерферон быстро инактивируется. В-третьих, эндогенный интерферон, как правило, более активно вырабатывается именно в тех органах, где происходит развитие патологического процесса, а потому используется более эффективно. В-четвертых, многие интерфероногены параллельно с индукцией интерферона запускают и другие реакции иммунитета, поэтому реализация генетически детерминированных вируснейтрализующих механизмов оказывается более полноценной и эффективной.

Коммерческими препаратами α-интерферонов в отечественной практике являются: реаферон, α-ферон, вальферон и реальдирен. Представители β-интерферонов — β-ферон ребиф и полутан.

Показано, что **экстракты многих растений** обладают некоторой противовирусной активностью. У них различная химическая структура и различные механизмы действия, начиная с внеклеточного повреждения вирусных частиц до индукции интерферонов.

В настоящее время многими авторами была показана профилактическая и терапевтическая эффективность при вирусных инфекциях **фосфпренила** — производного полипренолов, получаемых из хвои сосны. Данный препарат обладает противовирусной активностью по отношению к вирусам человека и животных, имеющих суперкапсидную оболочку (трансмиссивный гастроэнтерит свиней, инфекционный бронхит кур, клещевой энцефалит, бешенство и др.). Кроме того, он стимулирует факторы естественной резистентности и иммунный ответ организма при вакцинации.

Однако точный механизм антивирусного действия многих препаратов этой группы пока изучен недостаточно.

* * *

Существует и другой подход к химиотерапии вирусных инфекций, основанный на положении, что мишенью действия антивирусного вещества может быть зараженная вирусная клетка. Такая клетка в генетическом и функциональном отношениях отличается от здоровых клеток и является мишенью действия стимулированных Т-эффекторов. Разрушение небольшой популяции зараженных клеток в начальных стадиях инфекции, до ее генерализации, не должно быть катастрофой для организма. Выявление зараженных клеток возможно, во-первых, иммунологически — с помощью антител, специфических к вирусиндуцированным антигенам, во-вторых, селективная гибель зараженных клеток возможна в результате повышения проницаемости плазматической мембраны зараженной клетки для ряда соединений, таких, как некоторые аномальные нуклеозиды, бактериальные токсины и др. Третья возможность заключается в использовании потенциальных токсинов — претоксинов, которые могут активизироваться и превращаться в токсины для зараженных клеток благодаря действию вирусспецифических ферментов. Такие вирусспецифические ферменты, как протеазы, протеинкиназы, нуклеотидкиназы могут активизировать различные группы соединений, используемых в виде претоксинов, которые в результате внутриклеточной активации вызовут гибель зараженной клетки.

Таким образом, мишенью действия антивирусных веществ могут быть: вирусспецифические процессы в зараженной клетке; зараженная клетка.

Резистентность к химиотерапевтическим препаратам. Обстоятельством, осложняющим применение химиопрепаратов, является появление вариантов вирусов, устойчивых к их действию. Этот феномен важен для будущего химиопрофилактики и лечения вирусных инфекций. Механизм, обусловливающий формирование устойчивых к химиопрепарату вирусных штаммов, и роль химиопрепарата в этом процессе изучены недостаточно.

Очевидно, что наличие химиопрепарата в среде репродукции вируса является селективным фактором, но не исключает и мутагенное действие самого препарата. Многочисленные исследования показали формирование резистентности вирусов гриппа к амантадину и ремантадину в различных системах: культуре клеток, куриных эмбрионах и при пассажах на животных; вируса простого герпеса — к производным дезоксиуридина и ацикловиру; вирусов оспы — к метисазону и т. д.

Одним из путей снижения или даже предупреждения возникновения ингибиторорезистентных мутантов является одновременное применение двух препаратов, обладающих различным механизмом противовирусного действия. Второй возможный путь борьбы с появлением устойчивых мутантов — применение препаратов, ингибирующих наиболее раннюю стадию репродукции вируса.

При использовании химиопрепаратов при вирусных болезнях животных необходимо руководствоваться следующими соображениями:

экономический эффект химиотерапии должен превосходить стоимость препарата и затраты на обработку животных;

препарат должен быть удобен для группового применения;

при профилактическом применении препарат должен защищать не менее 70 %, а при лечении — не менее 50 % животных; он должен смягчать клинические проявления болезни и не препятствовать формированию иммунитета; не должен обладать побочным действием (тератогенностью, хронической токсичностью и т. п.).

Таким образом, лечение вирусных болезней до сих пор остается сложнейшей проблемой. В этом направлении проводятся разносторонние, глубокие исследования с использованием методов молекулярной биологии и генной инженерии.

Контрольные вопросы

1. Чем можно объяснить, что успехи в химиотерапии вирусных болезней пока очень скромны? 2. По каким основным направлениям проводят поиск эффективных лечебных препаратов для вирусных заболеваний? 3. Какие вам известны препараты, подавляющие начальные стадии взаимодействия вируса с клетками и их механизм? 4. Какие наиболее известные препараты, ингибирующие синтез вирусных компонентов в клетке, сборку и выход вирионов из клетки и их механизм? 5. Какова роль интерферонов и интерферогенов в терапии вирусных болезней?

1.11. СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ В ВИРУСОЛОГИИ

Серологические реакции широко используют в вирусологии. В основе этих реакций лежит способность антител взаимодействовать со специфическими гомологичными антигенами в пробирке

(in vitro) с образованием комплекса антиген + антитело. Обычно источником антител служит сыворотка крови животных, поэтому эти реакции называют серологическими (от лат. serum — сыворотка).

Взаимодействие антител с гомологичными антигенами происходит и в живом организме. Если антигеном является инфекционный агент, антитела его нейтрализуют. В этом и состоит биологическая роль антител (это уже иммунологические реакции). В любой серологической реакции участвуют два основных компонента: антиген и антитело.

Антигены. Наиболее полное и точное определение, что такое антиген, дает академик Р. В. Петров: «Антигены — это все те же вещества, которые несут признаки генетически чужеродной информации и при введении в организм вызывают развитие специфических иммунологических реакций». Таким образом, антигены индуцируют образование антител и эффекторов клеточного иммунитета и вступают с ними в реакцию.

Хорошими антигенами являются белки, но антигенность присуща многим сложным полисахаридам, липополисахаридам, полипептидам, а также некоторым искусственным высокомолекулярным соединениям. Простые элементы — железо, медь, хлорид натрия, глюкоза и другие не обладают антигенными свойствами. Специфического отпечатка работы разных генов на этих молекулах нет. Эта специфичность проявляется на более высоком уровне организации биологических макромолекул. Так, аминокислоты, соединенные в полипептидную цепь достаточной величины и сложности, приобретают антигенность.

Существуют еще **гаптены**, или **неполные антигены**, — это вещества, которые не вызывают образование антител в организме, но способны вступать в реакцию с имеющимися антителами. Гаптенами могут быть простые химические вещества. Но если соединить гаптен с носителем (белком или другим высокомолекулярным веществом), то он может стимулировать образование антител.

Считают, что большинство естественных антигенов состоит из двух частей: высокомолекулярной (чаще белковой), определяющей функцию антигена, и небелковой, придающей антигену специфичность — фактор специфичности, детерминанты, эпитопы.

Основными характеристиками активности антигенов являются антигенность, специфичность и иммуногенность*.

В серологических реакциях главную роль играют антигенность и специфичность.

Антигенность — способность антигена вызывать образование антител. Различают сильные и слабые антигены. Существует не-

* Иммуногенность — способность антигена вызывать иммунный ответ и создавать иммунитет, обеспечивающий защиту организма от проникновения и развития возбудителя, имеющего в составе аналогичные антигены.

сколько объяснений антигенной активности, но не одно из них не является исчерпывающим.

Однако установлено, что антигенность определяется:

величиной молекулы антигена (молекулярная масса должна быть не менее 10 000 Д); химической чужеродностью; жесткостью структуры детерминанты антигена; сложностью структуры молекулы антигена.

Специфичность — свойство антигена вступать во взаимодействие только со специфическими (гомологичными) антителами. Эту специфическую связь обеспечивают детерминанты антигена.

Антигенная детерминанта — небольшой участок молекулы антигена, образующий пространственную конфигурацию за счет остатков молекул аминокислот, углеводов или липидов, которая и является фактическим местом присоединения молекулы антител.

Детерминанты часто сравнивают с валентностью. Антигены в основном имеют несколько детерминант, т. е. они многовалентны. Поэтому даже небольшая молекула антигена может присоединить несколько молекул антител.

Соединение антигена с антителами обеспечивается ионными, водородными, ван-дер-вальсовыми и гидрофобными связями.

Поскольку большинство белков являются хорошими антигенами, следовательно, и вирусные белки также обладают антигенными свойствами. Вирусы содержат белки, отличающиеся друг от друга физико-химическими и антигенными свойствами. Так, у вируса гриппа наиболее хорошо изучены три антигена: S-антиген (растворимый), по которому в РСК определяют тип вируса гриппа (A, B, C); суперкапсидная оболочка вируса гриппа (V-антиген) содержит два важных вирусных антигена — гемагглютинин (H) и нейраминидазу (N), обусловливающие штаммоспецифические особенности вируса в реакции торможения гемагглютинирующей и реакции торможения нейраминидазной активности. В естественных условиях у вируса гриппа периодически антигены H и N изменяются. Так, среди людей наблюдали циркуляцию вируса гриппа с антигенной структурой H0N1 (1934 г.), H1N1 (1947 г.), H2N2 (1957 г.), H3N2 (1968 г.).

На вирусные антигены в организме вырабатываются антитела.

Антитела. Это — специфические или иммунные белки, образующиеся в организме под воздействием различных антигенов в результате естественной инфекции или искусственной иммунизации. Антитела обладают важнейшим свойством — вступать в специфическую связь с гомологичным антигеном. Они реагируют с теми антигенами, против которых выработаны, и подходят к ним как отпечаток к пальцу. Специфичность антител определяется их активными центрами, которые находятся в тяжелых и легких пептидных цепях молекулы антитела (цв. вкл., рис. 14).

Активными центрами антител называют сравнительно небольшие участки молекулы антитела, которые непосредственно вступают в реакцию с детерминантной группой антигена и определяют специфичность их взаимодействия (рис. 39).

Молекула антитела имеет от 2 (IgG) до 10 (IgM) активных центров, определяющих ее валентность (цв. вкл., рис. 14, 15).

Различают антитела полные и неполные. *Полные антитела* (имеют не менее двух активных центров), соединяясь с антигеном образуют визуальный феномен в пробирке (преципитацию и др.) (цв. вкл. рис. 16).

Неполные антитела (блокирующие) не дают видимой реакции, но они нейтрализуют активность вируса. Для выявления в сыворотках крови неполных антител в серологические реакции вводят дополнительные компоненты (РНСК для выявления).

Обычно источниками антител в серологических реакциях служат сыворотки крови животных, но их обнаруживают и в секретах слизистых оболочек, лимфе и других жидкостных фазах организма.

Функцией антител наделены γ-глобулины. Белки, функционирующие как антитела, объединены в группу под названием «иммунные глобулины» (Ig). Различают пять главных классов иммуноглобулинов: IgA, IgG, IgM, IgD, IgE. Наиболее хорошо изучены IgG, IgM и IgA (цв. вкл., рис. 15).

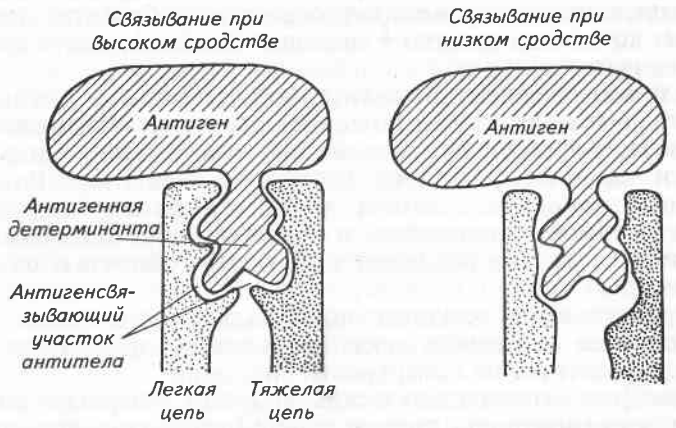


Рис. 39. Упрощенная схема связывания антигенной детерминанты макромолекулы с антигенсвязывающим участком двух различных антител — с высоким и низким сродством к данному антигену

Антигенная детерминанта удерживается в связывающем участке различными слабыми нековалентными воздействиями. В образование этого участка вносят свой вклад как легкая, так и тяжелая цепи молекулы антитела

IgM — основной класс антител, выделяемых в крови на ранних стадиях первичного иммунного ответа (10 активных центров, процент в глобулинах сыворотки — 5—10, период полужизни ≈ 5 сут).

IgG — при первичном иммунном ответе появляются позднее, чем IgM, однако они являются основным классом антител, находящихся в крови при повторном ответе (2 активных центра, процент в глобулинах сыворотки — 80—85, период полужизни ≈ 23 сут).

IgA — основной класс антител в секретах (молоке, слюне, слезах, секретах дыхательных путей, урогенитального и пищеварительного трактов). В сыворотке крови содержится около 13—14 % IgA от общего количества иммуноглобулинов, период полужизни 6 дней. У сывороточных IgA — 2 активных центра, у секреторных — 4. Секреторные IgA играют существенную роль в защите от кишечных и респираторных инфекций, обеспечивают первую линию защиты (местный иммунитет).

IgD и IgE в сыворотке крови очень мало. IgE имеют значение в развитии аллергических реакций. IgD обусловливают развитие аутоиммунных процессов и, возможно, препятствуют возникновению толерантности.

При соединении антигена с антителом происходит взаимодействие между поверхностью антигенной детерминанты и активным центром иммуноглобулина, находящимся в вариабельной его части таким путем, что комплементарные друг другу поверхности соединяются физико-химическими связями (цв. вкл., рис. 13). Связь эта хотя и прочная, тем не менее обратима, т. е. при определенных условиях (ультразвук, ультрацентрифугирование, обработка папаином и др.) из комплекса антиген + антитело можно выделить активный вирус и антитела.

Чем ближе соответствие антигенной детерминанты и активного центра антитела, тем интенсивнее электростатическое притяжение и гидрофобное взаимодействие между ними, выше аффинитет и прочнее комплекс (антиген + антитело). Различают авидные и неавидные антитела. Авидные антитела «жадно» вступают в реакцию с антигеном, и образуется прочный комплекс. Неавидные антитела обладают слабой способностью связывать антиген.

В серологических реакциях можно выделить две фазы:

первая фаза — специфическая, невидимая, характеризующаяся адсорбцией антител на поверхности антигена;

вторая фаза — неспецифическая, видимая, завершающаяся феноменом преципитации, лизиса, нейтрализации инфекционности вируса и т. д.

Взаимодействие антигена с антителами зависит от многих факторов: температуры (от 4 до 37 °С); pH среды; наличия электролитов и др. Оно возможно в различных соотношениях и в любых пропорциях. Однако при оптимальных концентрациях антигена и антител (когда все их валентности поглощены) реакция выражена

более четко. Это явление можно иллюстрировать следующим образом (цв. вкл., рис. 17). Если антиген имеет шесть детерминант, а антитело два активных центра, то:

а) при избытке антигена (*в*) макроагрегата нет, реакция не визуальна;

б) при избытке антител макроагрегата нет, реакция не визуальна;

в) при оптимальном количестве антител и антигена образуется макроагрегат, который хорошо виден в форме преципитата.

Компоненты, используемые в серологических реакциях. Для проведения серологических реакций необходимы следующие компоненты:

специфические антигены;

специфические антитела. Эти компоненты готовят на биофабриках;

исследуемый материал. Это может быть патологический материал для обнаружения вируса (антигена) или сыворотка крови для обнаружения антител;

дополнительные компоненты для различных серологических реакций: эритроциты, комплемент, гемолизин и др.

Подготовка антигенов для серологических реакций. В зависимости от свойств вируса и используемых реакций материалом для получения антигена могут служить:

ткани от больных и экспериментально зараженных животных. Так при диагностике ящура используют стенки афт или мышечные ткани мышат для РСК; кусочки головного мозга при бешенстве; кусочки паренхиматозных органов при инфекционном ринотрахеите, аденоинфекции и др.;

вирусные эмбриональные жидкости зараженных куриных эмбрионов при диагностике гриппа, болезни Ньюкасла, инфекционного ларинготрахеита и др.;

инфицированные культуры клеток при диагностике респираторно-синцитиальной инфекции, инфекционного ринотрахеита, аденоинфекции и др.

Антигены должны отвечать следующим основным требованиям: быть в высокой концентрации; мало содержать балластных веществ; быть безопасны в работе и хорошо сохраняться в лабораторных условиях. Для этого их (в зависимости от вируса и применяемой реакции) подвергают различным методам обработки:

замораживанию, оттаиванию с последующим центрифугированием (при ящуре для РСК, при инфекционном ринотрахеите, аденоинфекции, вирусной диарее и др. для реакции нейтрализации и т. д.);

обработке эфиром, ацетоном (при вирусных энцефалитах);

обработке твин-эфиром (при ПГ-3 и др.);

обработке гексаметафосфатом натрия $(NaPO_3)_6$ в определенных зонах РН (при ИРТ, аденоинфекции, вирусной диарее и др.).

Подготовка сывороток крови для серологических реакций. При исследовании сывороток крови животных необходимо иметь в виду, что они могут содержать:

1) агглютинины к эритроцитам животных различных видов. Содержание их у разных животных различно. Из исследуемых сывороток их удаляют. Для этого сыворотки предварительно обрабатывают эритроцитами животных того вида, которых будут использовать в реакции. Так, при исследовании сывороток на наличие антител к вирусу ПГ-3 крупного рогатого скота в РТГА используют эритроциты морской свинки, сыворотки предварительно обрабатывают эритроцитами морской свинки (на 5 мл сыворотки 2—3 капли осадка эритроцитов, 20 мин встряхивают при 4 °С и центрифугируют, надосадочную сыворотку используют в реакции). При арбовирусных инфекциях в РТГА используют гусиные эритроциты, сыворотки предварительно обрабатывают гусиными эритроцитами;

2) неспецифические ингибиторы вирусов. Как и антитела, они являются гуморальным неспецифическим фактором иммунитета и нейтрализуют инфекционную и гемагглютинирующую активности вирусов. Свое действие на вирусы неспецифические ингибиторы проявляют не только в организме (in vivo), но и в пробирке (in vitro). Наличие этих ингибиторов в исследуемой сыворотке приведет к искажению результатов серологических реакций. Поэтому все исследуемые сыворотки перед реакцией предварительно освобождают от неспецифических ингибиторов различными методами. Ингибиторы можно разделить на две группы:

а) термолябильные (β-ингибиторы), которые удаляют путем прогревания сывороток в течение 30 мин при температуре 56—63 °С (в зависимости от вида животного, от которого получена сыворотка). Перед прогреванием сыворотки разводят не менее чем в 2 раза физиологическим раствором во избежание их свертывания;

б) термостабильные (α-, γ-ингибиторы). Одни из них выдерживают нагревание до 75 °С, другие — до 100 °С. Методы освобождения от них разные и зависят от вида животного, от которого получена сыворотка, и от вируса, используемого в реакции. Наиболее широко в диагностических лабораториях используют следующие методы:

удаление ингибиторов углекислым газом (CO_2). Для этой цели чаще используют аппарат Киппа. Углекислый газ пропускают в течение 5—7 мин через исследуемую сыворотку, разведенную 1 : 10 дистиллированной водой, затем центрифугируют 10 мин при 1500 мин$^{-1}$ (об/мин) и затем к 0,9 мл надосадочной жидкости добавляют 0,1 мл 8,5%-ного раствора NaCl, прогревают 30 мин при 56 °С и используют сыворотку в реакции;

удаление ингибиторов перйодатом калия (KIO_4). С этой целью к 1 части сыворотки добавляют 1 часть 1%-ного KIO_4, выдерживают 2 ч при комнатной температуре, затем добавляют 2

объема 5%-ного раствора глюкозы и 2 объема физиологического раствора (разведение сыворотки 1 : 10);

удаление ингибиторов каолином. Для этого к 1 части сыворотки добавляют 1 часть 25%-ной взвеси каолина в физиологическом растворе, полученную смесь встряхивают, оставляют на 20 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют (10 мин при 2000 мин$^{-1}$). Надосадочную жидкость используют в реакции (разведение сыворотки 1 : 2);

существуют и другие методы (обработка сыворотки различными ферментами);

3) при постановке РСК необходимо учитывать, что сыворотки могут обладать антикомплементарной активностью, т. е. способностью связывать или разрушать комплемент и, следовательно, препятствовать гемолизу эритроцитов в индикаторной системе. Антикомплементарность может быть обусловлена: индивидуальными особенностями животного; наличием в сыворотке антикоагулянтов, консервантов, бактерий, а также длительным хранением сывороток. Существуют несколько методов устранения антикомплементарности, но чаще всего используют метод обработки сывороток комплементом морской свинки. К 3 частям сыворотки добавляют 1 часть комплемента, оставляют при 4 °С на ночь, затем сыворотку прогревают 30 мин при 37 °С, разводят сыворотку физиологическим раствором 1 : 8 и прогревают 30 мин при 60 °С.

Применение серологических реакций в вирусологии. Серологические реакции используют с целью:

диагностики вирусных болезней. Во-первых, по известному антигену (диагностикуму) определяют в исследуемой сыворотке наличие и количественное содержание (титр) специфических к данному антигену антител. Во-вторых, с помощью известного антитела, т. е. диагностической иммунной сыворотки, определяют наличие в исследуемом материале специфического антигена и осуществляют его идентификацию;

серологической оценки поствакцинального иммунитета. По уровню антител в сыворотках крови определяют напряженность гуморального иммунитета;

изучения иммунологического фона среди поголовья животных. Наличие антител в сыворотках крови позволяет установить комбинацию возбудителей, циркулирующих в стаде, и напряженность иммунитета к ним. На основании полученных данных можно более эффективно проводить мероприятия;

изучения антигенной структуры вирусов с помощью моновалентных сывороток к отдельным его компонентам;

установления степени антигенного родства вирусов;

оценки активности диагностических препаратов и вакцин;

изучения патогенеза вирусных болезней.

В вирусологии широко применяют следующие серологические реакции: реакцию нейтрализации (РН); реакцию торможения ге-

магглютинации (РТГА); реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА); реакцию торможения гемадсорбции (РТГАд); реакцию связывания комплемента (РСК); реакцию диффузионной преципитации (РДП); реакцию иммунофлуоресценции (РИФ); реакцию иммуноферментного анализа (ИФА). Они различаются между собой методом определения — образовался комплекс антиген + + антитело или нет. В связи с этим и техника постановки каждой их них разная.

Реакция нейтрализации (РН). Это универсальная реакция служит эталоном при оценке других серологических реакций. Принцип ее состоит в том, что при взаимодействии антигена (вируса) с гомологичными антителами образуется комплекс антиген + антитело, в результате нейтрализуется инфекционность вируса. Индикатором свободного (не связавшегося с антителами) вируса является чувствительная к вирусу живая система: животные, куриные эмбрионы или культура клеток.

При постановке реакции в пробирке смешивают равные объемы вируса и сыворотки, смесь выдерживают при соответствующей температуре (4, 22 или 37 °С) в течение одного часа или 16—18 ч (зависит от вируса и условий опыта). Затем этой смесью заражают чувствительную к вирусу живую систему, наблюдают за состоянием живых объектов и через соответствующий срок (в зависимости от вируса) учитывают результат нейтрализации вируса по отсутствию:

1) гибели, развития клинической картины болезни и патологических изменений в органах и тканях лабораторных животных;

2) гибели, патологических изменений в оболочках, тканях зародыша и отсутствию гемагглютининов в жидкостях полостей куриных эмбрионах;

3) цитопатического действия (ЦПД) или бляшкообразования в культуре клеток.

Сыворотки, используемые в РН, должны быть предварительно освобождены от термолабильных неспецифических ингибиторов путем прогревания. Как чувствительную систему, так и метод ее заражения подбирают с учетом наилучшей возможности культивирования данного вируса.

Так как для нейтрализации определенного количества вируса требуется определенное количество антител, а один из этих компонентов все еще неизвестен, то РН можно ставить в двух вариантах:

1) к разным дозам (разведениям) сыворотки (обычно в виде последовательных 2-кратных разведений) добавляют одинаковые дозы вируса (обычно 100—1000 $ЕД_{50}$). В этом варианте определяют титр вируснейтрализующих антител в сыворотке, показателем которого служит разведение сыворотки, защищающее от действия вируса 50 % зараженных биологических систем;

2) к разным дозам (разведениям) вируса (обычно в виде последовательных 10-кратных разведений) добавляют одинаковые дозы сыворотки (обычно в разведениях 1 : 10 или 1 : 20). При постановке данного варианта РН кроме исследуемой (или специфической) сыворотки используют и нормальную (отрицательную) сыворотку. В этом случае определяют индекс нейтрализации (IN), который показывает, во сколько раз иммунная (специфическая) или исследуемая сыворотка снижает титр вируса по сравнению с нормальной сывороткой*.

Необходимо помнить, что любая серологическая реакция (в том числе и РН) должна сопровождаться контролями на каждый компонент, участвующий в реакции.

РН позволяет решить следующие диагностические задачи:

обнаружить и определить титр вируснейтрализующих антител с помощью известного вируса;

идентифицировать неизвестный (выделенный) вирус путем исследования его с различными заведомо известными сыворотками (антителами).

Достоинствами РН являются ее универсальность и высокая специфичность; недостатки — большая трудоемкость; необходимость строго соблюдать стерильность материалов, посуды и инструментов; высокая стоимость живых биологических систем; относительная длительность биопробы и необходимость проведения математических расчетов.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). Широко используется при исследовании гемагглютинирующих вирусов. Основана на том, что антитела при встрече с гомологичным вирусом (антигеном) нейтрализуют не только его инфекционную, но и гемагглютинирующую активность, так как блокируют рецепторы вирионов, ответственные за гемагглютинацию, образуя с ними комплекс антиген + антитело.

Принцип РТГА состоит в том, что в пробирке (лунке) смешивают равные объемы сыворотки крови и вируса и после экспозиции (30—40 мин) добавляют эритроциты соответствующего вида животного**.

Эритроциты являются индикатором наличия вируса в смеси. Агглютинация эритроцитов указывает на наличие вируса в смеси, а отсутствие гемагглютинации — на его отсутствие, так как антитела полностью нейтрализовали гемагглютинирующую активность вируса.

---

* IN-титр вируса с нормальной сывороткой/титр вируса с иммунной (или исследуемой) сывороткой. Установлено, что IN = <10 — результат РН отрицательный; IN = 10—50 — результат РН сомнительный; IN = 100 и более — результат РН положительный.

** Выбор эритроцитов зависит от вируса, используемого в РТГА. Так, для вирусов гриппа используют эритроциты кур, для ПГ-3 КРС — эритроциты морской свинки. Обычно используют 0,5—1%-ную взвесь эритроцитов.

РТГА можно ставить в двух вариантах:

1) к разным разведениям сыворотки (обычно 2-кратным) добавляют одинаковые дозы вируса (4—8 ГАЕ);

2) к разным разведениям вируса (обычно 2-кратным) добавляют одинаковые дозы сыворотки.

Сыворотки, используемые в РТГА, должны быть предварительно освобождены от термолабильных и термостабильных ингибиторов.

Постановку РТГА по первому варианту проводят по следующим этапам:

титруют вирус в РГА и определяют его гемагглютинирующий титр;

приготовляют и контролируют рабочую дозу вируса (4 или 8 ГАЕ);

ставят главный опыт РТГА;

учитывают результаты. Оценивают гемагглютинацию в каждой смеси в крестах и определяют титр антител. За титр антител в сыворотке принимается наивысшее разведение сыворотки, которое еще полностью тормозит гемагглютинацию.

РТГА ставят в пробирках, специальных полистироловых планшетах макро- или микрометодом.

РГТА позволяет решить следующие диагностические задачи:

обнаружить и определить титр антител в сыворотке крови с помощью известного вируса;

идентифицировать неизвестный вирус путем исследования его с различными заведомо известными сыворотками (антителами).

Достоинства РТГА — простота техники постановки и быстрый результат. Однако эту реакцию можно использовать только для гемагглютинирующих вирусов.

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), или **реакция пассивной гемагглютинации (РПГА).** Основана на том, что эритроциты, на которых предварительно адсорбированы антигены, приобретают способность агглютинироваться в присутствии гомологичных сывороток (антител). Эритроциты при этом выполняют роль носителей со специфическими детерминантами, агглютинация которых происходит в результате реакции антиген + антитело (цв. вкл., рис. 18).

Эритроциты, к поверхности которых прочно присоединены антигены, называют эритроцитарным антигенным диагностикумом, или эритроцитами, сенсибилизированными антигеном.

Другой тип РНГА — на поверхности эритроцитов адсорбированы антитела и последующая их агглютинация происходит в присутствии гомологичного антигена. В этом случае такие эритроциты называют эритроцитарным антительным диагностикумом, или эритроцитами, сенсибилизированными антителами.

На основе этих двух принципиальных методических подходов разработаны и используются многие модификации РНГА. Так, в качестве носителей применяют мелкие стандартные частички латекса. В этом случае реакцию называют реакция латекс агглютинации (РЛА) или используют золотистый стафилококк — реакция коагглютинации и т. д. Обычно эритроцитарные диагностикумы готовят на предприятиях биологической промышленности, а в диагностических лабораториях ставят уже главный опыт РНГА.

Приготовление эритроцитарных диагностикумов включает следующие этапы:

фиксация эритроцитов формальдегидом или глютаровым, или акриловым альдегидами. Такие обработанные эритроциты длительно сохраняются. Чаще для этой цели используют эритроциты барана, человека, кур и др.;

обработка фиксированных эритроцитов раствором танина. В результате эритроциты приобретают свойство необратимо адсорбировать на своей поверхности белки (вирусы и антитела);

сенсибилизация танизированных эритроцитов вирусами или антителами.

Необходимо отметить, что методы приготовления эритроцитарных диагностикумов для вирусных инфекций различна.

Методика постановки РНГА для обнаружения и определения титра антител заключается в следующем:

к последовательным 2-кратным разведениям сыворотки добавляют равные дозы эритроцитов, сенсибилизированных антигеном;

смесь оставляют на 2—3 ч при комнатной температуре или на 16—18 ч при 4 °С;

учитывают результаты. Если в сыворотке содержатся антитела к вирусу, которым были сенсибилизированы эритроциты, наблюдают гемагглютинацию, которую оценивают в крестах.

За титр антител в сыворотке принимают наивысшее разведение сыворотки, которое еще обеспечивает гемагглютинацию не менее чем на два креста.

РНГА сопровождается всеми соответствующими контролями. Обычно ставят реакцию микрометодом (цв. вкл., рис. 18).

РНГА позволяет решать следующие диагностические задачи:

обнаружить антитела и определить их титр в сыворотке крови с помощью известного эритроцитарного антигенного диагностикума;

обнаружить и идентифицировать неизвестный вирус с помощью известного эритроцитарного антительного диагностикума.

Достоинства РНГА: высокая чувствительность, простота техники постановки и быстрота ответа. Однако важно отметить, что возникают большие трудности в приготовлении стабильных эритроцитарных диагностикумов (большая зависимость от чистоты используемых компонентов, необходимость подбора режима фиксации, танизации и сенсибилизации эритроцитов для каждого вида вируса).

Реакция торможения гемадсорбции (РТГАд). При диагностических исследованиях в практике применяют РТГАд. Эту реакцию

используют в том случае, если вирус обладает гемадсорбирующими свойствами. Гемадсорбцией называется адсорбция (прилипание) эритроцитов к поверхности клеток, зараженных вирусом. Чаще это явление наблюдают у гемагглютинирующих вирусов. Так, гемадсорбирующими свойствами обладают вирусы гриппа, вирус ПГ-3 и некоторые штаммы парвовирусов крупного рогатого скота и др.

Чтобы наблюдать гемадсорбцию, из пробирки с зараженной вирусом культурой клеток удаляют культуральную жидкость и вносят 0,5%-ную взвесь эритроцитов (для вируса ПГ-3 — эритроциты морской свинки, для вирусов гриппа — эритроциты кур), оставляют на 5—10 мин, затем слой клеток споласкивают физиологическим раствором (чтобы смыть эритроциты). Если в зараженной культуре клеток идет репродукция вируса, то на таких клетках под малым увеличением микроскопа можно видеть адсорбировавшие эритроциты, в контрольных (незараженных) культурах клеток таковые отсутствуют (цв. вкл., рис. 19).

РТГАд основана на торможении гемадсорбции, если зараженную вирусом культуру клеток предварительно обработать специфической сывороткой (содержащей антитела к этому вирусу). Так, для идентификации вируса ПГ-3 крупного рогатого скота широко используется данная реакция.

Методика постановки РТГАд заключается в следующем:

на 3—7-й день после заражения культур клеток из них удаляют питательную среду, промывают клетки раствором Хенкса и вносят в каждые 4 пробирки по 0,5 мл специфической к вирусу ПГ-3 сыворотки в разведении 1 : 10;

пробирки в наклонном положении оставляют при комнатной температуре на 30 мин (для контакта клеток с антителами);

во все пробирки вносят по 1 мл 0,5%-ной взвеси эритроцитов морской свинки;

через 30 мин — учет результатов. Отсутствие гемадсорбции в пробирках со специфической сывороткой и проявление ее в пробирках с зараженной культурой клеток, но не обработанной специфической сывороткой, свидетельствует о наличии вируса ПГ-3 в культуре клеток.

Чаще всего РТГАд применяют для идентификации вируса и редко для обнаружения и титрования антител.

Реакция связывания комплемента (РСК). Это — одна из традиционных серологических реакций, применяемых для диагностики многих вирусных болезней. Само название в значительной мере отражает суть метода, состоящего из двух отдельных этапов. На первом этапе участвуют антиген и антитело (один из этих ингредиентов заранее известен), а также определенное количество предварительно оттитрованного комплемента. При соответствии антигена и антитела их комплекс связывает комплемент, что выявляют на втором этапе с помощью индикаторной системы (смесь

бараньих эритроцитов и антисыворотки к ним — гемолизина). Если комплемент связался при взаимодействии антигена и антитела, то лизиса эритроцитов не происходит (положительная РСК). При отрицательной РСК несвязанный комплемент способствует гемолизу эритроцитов (рис. 40). РСК часто используют в диагностической практике для обнаружения и идентификации вирусов, обнаружения и титрования антител в сыворотках крови.

Основными компонентами РСК служат антигены (известные или выявляемые), антитела (известные антисыворотки или исследуемые сыворотки), комплемент (сыворотка крови морской свинки), гемолитическая сыворотка и эритроциты барана; в качестве разбавителя используют изотонический раствор натрия хлорида (pH 7,2—7,4) или различные буферные растворы.

(Методику постановки РСК см. с. 255.)

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ), или **метод флуоресцирующих антител (МФА).** При данном методе используют явление люминесценции. Сущность явления люминесценции заключается в том, что при поглощении различных видов энергии (световой, электрической и др.) молекулами некоторых веществ их атомы переходят в возбужденное состояние, а затем, возвращаясь в исходное состояние, выделяют поглощенную энергию в виде светового излучения.

В РИФ люминесценция проявляется в виде флуоресценции — это свечение, возникающее в момент облучения возбуждающим светом и прекращающееся сразу после его окончания.

Многие вещества и живые микроорганизмы обладают собственной флуоресценцией (так называемой первичной), однако интенсивность ее очень мала. Вещества, обладающие интенсивной первичной флуоресценцией и используемые для придания флуоресцирующих свойств нефлуоресцирующим веществам, получили название флуорохромы. Такая наведенная флуоресценция называется вторичной.

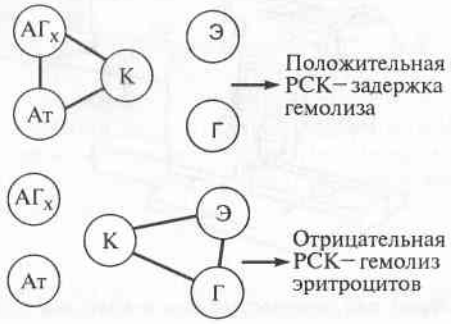


Рис. 40. Схема РСК

Для возбуждения флуоресценции при люминесцентной микроскопии чаще всего используют ультрафиолетовую или сине-фиолетовую часть спектра (длина волны 300—460 нм). Для этих целей в лабораториях имеются люминесцентные микроскопы различных моделей — МЛ-1—МЛ-4, «Люмам» (рис. 41).

В вирусологической практике применяют два основных метода люминесцентной микроскопии: флуорохромирования и флуоресцирующих антител (или РИФ).

Флуорохромирование — это обработка препаратов флуорохромом с целью увеличения силы и контрастности свечения их. Наибольший интерес представляет флуорохром акридиновый оранжевый, который вызывает полихроматическую флуоресценцию нуклеиновых кислот. Так, при обработке препаратов этим флуорохромом дезоксирибонуклеиновая кислота ярко флуоресцирует зеленым цветом, а рибонуклеиновая — рубиново-красным.

Метод РИФ заключается в том, что антитела, соединенные с флуорохромом, сохраняют способность вступать в специфическую связь с гомологичным антигеном. Образующийся комплекс антиген + антитело в связи с присутствием в нем флуорохрома обнаруживают под люминесцентным микроскопом по характерному свечению.

Для получения антител используют высокоактивные гипериммунные сыворотки, из которых выделяют антитела и метят их флуорохромом. В качестве флуорохрома наиболее часто используют ФИТЦ-флуоресцеин изотиоционат (зеленое свечение) и РСХ-родамин сульфохлорид (красное свечение). Антитела, меченные флуорохромом, называют конъюгатом.

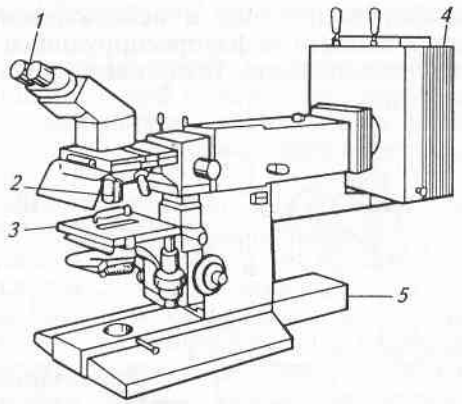


Рис. 41. Общий вид люминесцентного микроскопа «Люмам Р-2»:

1 — бинокуляр; *2* — объективы; *3* — предметный столик; *4* — кожух осветительной лампы; *5* — основание

Методика приготовления и окрашивания препаратов заключается в следующем:

готовят на предметных стеклах мазки, отпечатки из органов или на покровных стеклах — инфицированную культуру клеток; можно использовать и гистосрезы;

препараты подсушивают на воздухе и фиксируют в охлажденном ацетоне при комнатной температуре или при минус 15 °С (от 15 мин до 4—16 ч);

окрашивают по прямому или непрямому методу;

ведут учет под люминесцентным микроскопом по интенсивности свечения, оцениваемому в крестах.

Параллельно готовят и окрашивают препараты от здорового животного — контроль.

Различают два основных метода применения флуоресцирующих антител: прямой и непрямой (рис. 42).

Прямой метод (одноступенчатый) (рис. 43). На фиксированный препарат наносят конъюгат (флуоресцирующую сыворотку к предполагаемому вирусу), выдерживают 30 мин при температуре 37 °С во влажной камере. Затем препарат отмывают от несвязанного конъюгата физиологическим раствором (pH 7,2 — 7,5), подсушивают на воздухе, наносят нефлуоресцирующее масло и исследуют под микроскопом.

Прямой метод позволяет обнаружить и идентифицировать антиген. Для этого нужно иметь на каждый вирус флуоресцирующую сыворотку.

Непрямой метод (двухступенчатый) (рис. 44). На фиксированный препарат наносят немеченую сыворотку, содержащую антитела к предполагаемому вирусу, выдерживают 30 мин при 37 °С, отмывают несвязанные антитела. На препарат наносят флуоресцирующую антивидовую сыворотку*, соответствующую виду животного — продуцента гомологичных противовирусных антител, выдерживают 30 мин при 37 °С. Затем препарат отмывают от несвязанных меченых антител, подсушивают на воздухе, наносят нефлуоресцирующее масло и исследуют под люминесцентным микроскопом.

Непрямой метод позволяет не только обнаружить и идентифицировать антиген, но и выявить и определить титр антител. Кроме того, этим методом можно обнаруживать одной меченой сывороткой антигены различных вирусов, так как он основан на использовании антивидовых сывороток. Чаще применяют антикроличьи, антибычьи, антилошадиные сыворотки и сыворотки против глобулинов морской свинки.

---

* Антивидовые сыворотки получают, иммунизируя глобулинами животных тех видов, которые служат продуцентами антивирусных антител. Так, если антивирусные антитела получали на кроликах, то используют флуоресцирующую антикроличью сыворотку.



Рис. 42. Схема вариантов метода флуоресцирующих антител

Разработаны несколько модификаций непрямого метода. Наибольшего внимания заслуживает метод с использованием комплемента. Метод заключается в том, что на фиксированный препарат наносят инактивированную нефлуоресцирующую специфическую сыворотку и комплемент морской свинки, выдерживают 30 мин при 37 °С, промывают, и для выявления комплекса антиген + антитело + комплемент наносят флуоресцирующую антикомплементарную сыворотку, выдерживают 30 мин при 37 °С, промывают, подсушивают на воздухе и исследуют под люминесцентным микроскопом.

Достоинства РИФ: высокая специфичность и чувствительность; простота техники постановки; требуется минимальное количество компонентов. Это экспресс-метод диагностики, так как в течение нескольких часов можно получить ответ. К недостаткам можно отнести субъективизм в оценке интенсивности свечения и, к сожалению, иногда флуоресцирующие сыворотки бывают плохого качества. В настоящее время РИФ широко применяют в диагностике вирусных болезней животных.

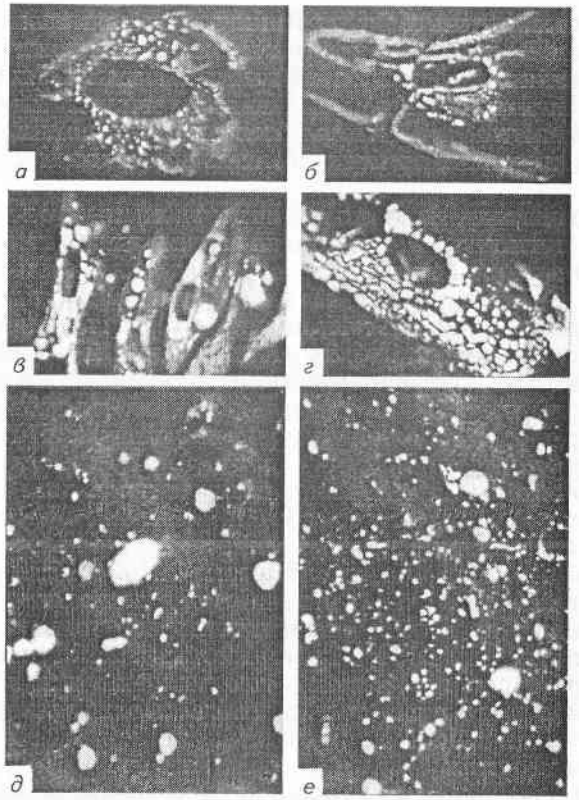


Рис. 43. Выявление антигена вируса бешенства прямым методом МФА (*препараты Е. В. Клюевой*):

а, б, в, г — в культуре клеток; *д, е* — в отпечатках мозга зараженных мышей

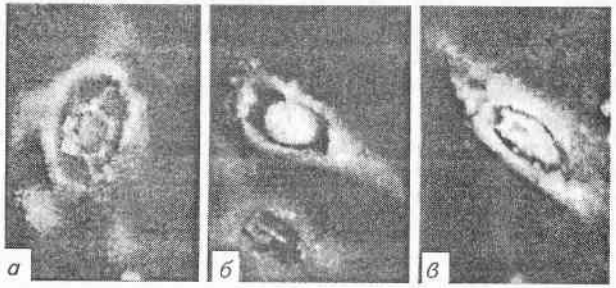


Рис. 44. Выявление непрямым МФА антигена аденовируса КРС в культуре клеток тестикул бычка (*препараты Л. Н. Носач, Р. В. Белоусовой и др.*):

а — внутриядерное включение не светится; *б* — внутриядерное включение светится; *в* — свечение в ядре и в цитоплазме

Иммуноферментный анализ (ИФА). В диагностике вирусных болезней человека и животных широко применяют методы, основанные на использовании ферментов в качестве метки антигенов и антител. Это группа методов носит название иммуноферментного анализа.

ИФА применяют в двух вариантах: гистохимическом и твердофазном.

Гистохимический вариант ИФА, или иммунопероксидазную реакцию, используют редко. Он аналогичен методу иммунофлуоресценции, но отличается тем, что для постановки реакции используют антитела, меченные не флуорохромом, а ферментом*. Таким образом, в комплекс антиген + антитело включаются антитела, меченные ферментом, и для обнаружения этого комплекса вносят субстрат** (фермент-чувствительное вещество), которое под действием фермента разлагается, образуя цветной продукт ферментативной реакции, хорошо видимый в световом микроскопе.

Материалом для выявления вирусных антигенов при этом варианте могут быть: мазки; отпечатки различных органов; парафиновые срезы; культуры клеток. При этом можно использовать как прямой, так и непрямой метод.

Прямой метод (рис. 45, *А*). На фиксированный препарат наносят конъюгат (антитела к предполагаемому вирусу, меченные ферментом), выдерживают при 37 °С в течение 1—2 ч во влажной камере, затем препарат отмывают физиологическим раствором от несвязанного конъюгата, подсушивают на воздухе, наносят несколько капель раствора субстрата, инкубируют 5—10 мин и промывают физиологическим раствором. Затем споласкивают дистиллированной водой, и результат учитывают с помощью светового микроскопа. В положительных случаях, т. е. при наличии антигена в исследуемом материале, видны или диффузное желто-коричневое окрашивание, или гранулы коричнево-черного цвета. В контрольных препаратах окрашивания не обнаруживают.

Непрямой метод (рис. 45, *Б*). На фиксированный препарат наносят специфическую к предполагаемому вирусу сыворотку, выдерживают при 37 °С в течение 1—2 ч во влажной камере, промывают физиологическим раствором, подсушивают на воздухе и наносят меченную ферментом антивидовую сыворотку, выдерживают при 37 °С 1—6 ч. Далее следует процедура, как в прямом методе.

Твердофазный иммуноферментный анализ (ТФИФА, РЭМА — реакция энзиммеченых антител, ELISA — enzyme-linked

* Для метки антител обычно применяют ферменты: пероксидазу хрена (чаще), щелочную фосфатазу, галактозидазу и др.

** В качестве субстрата используют ортофенилендиамин, 5-аминосалициловую кислоту или бензидин. К ним добавляют пероксид водорода (H_2O_2).

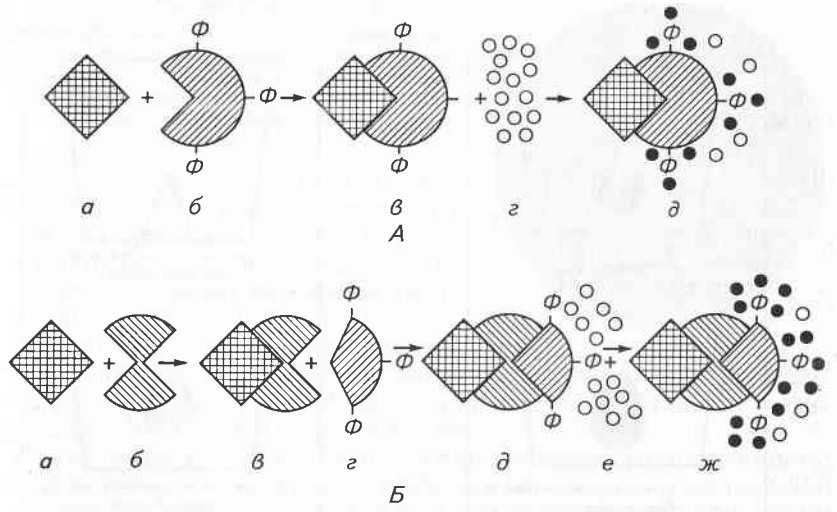


Рис. 45. Схемы методов выявления антигена:

А — прямого пероксидазного: *а* — срез ткани, содержащей антиген; *б* — антитела, меченные ферментом; *в* — комплекс антиген + антитело + фермент; *г* — субстрат; *д* — комплекс антиген + антитело + фермент, проявленный при помощи субстрата; *Ф* — фермент; *Б* — непрямого иммунопероксидазного: *а* — срез ткани, содержащей антиген; *б* — специфические антитела к антигену; *в* — комплекс антиген+антитело; *г* — вторичные антитела, меченные ферментом; *д* — комплекс антиген + антитело + вторичное антитело, меченное ферментом; *е* — субстрат; *ж* — комплекс, проявленный при помощи субстрата; *Ф* — фермент

immunosorbent assay) в последние годы широко используют в биологии, в том числе и в вирусологии. Характерная особенность метода в том, что один из компонентов реакции (антиген или антитело) фиксируют на твердом носителе. В качестве носителей используют полистироловые микропанели, шарики, палочки и др.

Этим методом можно обнаружить и идентифицировать антиген, а также выявить антитела и определить их титр в сыворотках крови.

Существует много вариантов метода. Наиболее часто для обнаружения антигенов используют прямой метод («сандвич»-метод, рис. 47). Для этого специфические к предполагаемому антигену антитела фиксируют в лунках микропанелей, в которые вносят исследуемый антиген и выдерживают при 37 °С 1—2 ч. Затем микропанели промывают буферным раствором и вносят в лунки меченные ферментом к предполагаемому антигену антитела, выдерживают при 37 °С 1—2 ч, промывают микропанели, вносят раствор субстрата и выдерживают 5—30 мин. Реакцию останавливают добавлением раствора серной кислоты и учитывают визуально по разности в окраске опытных и контрольных образцов или при по-

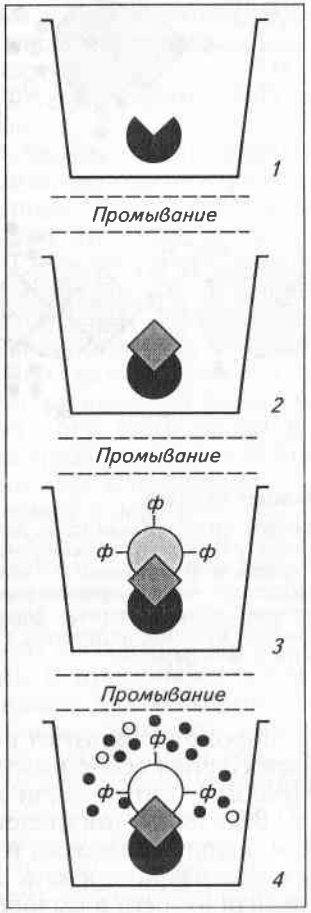


Рис. 46. Схема определения антигена непрямым методом твердофазного ИФА:

1 — адсорбция антигена в лунках; *2* — внесение исследуемого раствора. Специфические антитела фиксируются на антигене; *3* — внесение ферментомеченого антивидового глобулина, фиксирующегося на антителах; *4* — внесение субстрата и появление цветного продукта ферментативной реакции; *Ф* — фермент

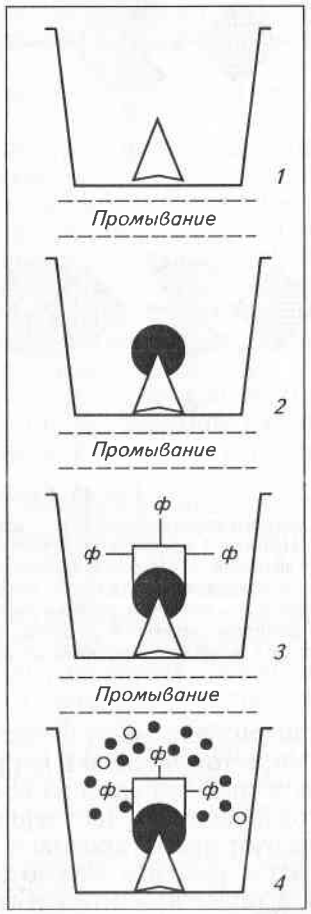
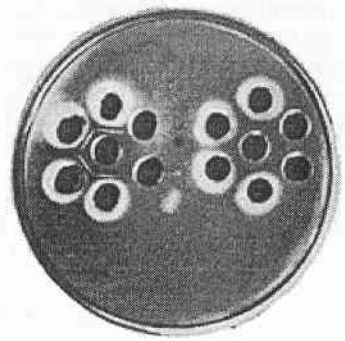


Рис. 47. Схема определения антигена методом двойных антител («сандвич»-метод) в твердофазном ИФА:

1 — адсорбция в лунках специфических антител; *2* — внесение исследуемого раствора, который соединяется с антителами; *3* — добавление ферментомеченых специфических антител; *4* — внесение субстрата и появление цветного продукта ферментативной реакции; *Ф* — фермент

Рис. 48. РДП

Слева в центральной лунке — преципитирующая сыворотка, по периферии — 4 лунки с антигеном, вид линии преципитации. Справа в центральной лунке — нормальная сыворотка, по периферии — те же антигены, линий преципитации нет



мощи спектрофотометрии. Положительные образцы имеют окраску от желтой до оранжево-коричневой.

Обнаружение и определение титра антител проводят непрямым твердофазным методом (см. рис. 46).

В крупных диагностических лабораториях применяют полностью автоматизированные установки для проведения твердофазного ИФА, позволяющие анализировать от 1000 до 4000 проб ежедневно.

Достоинства ИФА: высокая чувствительность; специфичность; простота техники постановки; требуется минимальное количество компонентов; не требуется специальных приборов; оценку можно проводить визуально; возможность автоматизации, что позволяет его применять для массовых исследований; исследуемые сыворотки не требуют предварительной обработки. Это — экспресс-метод диагностики, так как в течение нескольких часов можно получить ответ.

Радиоиммунный метод (РИМ). Отличие этого метода от ИФА заключается в том, что в качестве метки антигенов и антител используют не фермент, а радиоактивный изотоп, как ^{125}I или др. Результаты реакции учитывают путем определения радиоактивности исследуемых образцов. Это очень чувствительный и надежный метод, но требует специального оборудования и условий работы с радиоизотопами.

Реакция диффузионной преципитации в геле (РДП). Основана на способности к диффузии* в гелях** антител и растворимых антигенов (рис. 48). При создании условий, в которых они будут диффундировать навстречу друг другу, при их встрече образуется комплекс антиген + антитело. Этот комплекс не обладает способностью диффундировать в толще агарового геля и выпадает в осадок (в участках, где создаются их эквивалентные концентрации) в виде полосы преципитации, видимой невооруженным глазом. Если же диффундирующие антигены и антитела не гомологичны друг другу, то полосы преципитации не образуется.

---

* Диффузией называют проникновения молекул одного вещества между молекулами другого, обусловленные тепловыми движениями молекул.

** Гелями называют такие дисперсные системы, в которых жидкая фаза распределена равномерно среди твердой. В лабораторной практике очень часто используют агаровый гель.

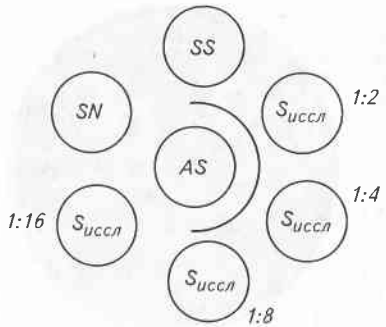


Рис. 49. Схема РДП для обнаружения и титрования антител:

AS — антиген специфический; $S_{иссл}$ — исследуемая сыворотка крови; *SN* — сыворотка отрицательная; *SS* — сыворотка специфическая; 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8, 1 : 16 — титры антител

Для создания условий диффузии в слое агара делают лунки, в которые заливают компоненты. Количество и взаимное расположение лунок зависит от решаемой задачи.

РДП позволяет решить следующие диагностические задачи:

обнаружить и идентифицировать неизвестный выделенный вирус путем исследования его с различными заведомо известными сыворотками (антителами);

обнаружить и определить титр антител в сыворотках с помощью известного антигена (рис. 49).

РДП может быть поставлена в чашках Петри (макрометод) и на предметных стеклах (микрометод).

(Методику постановки РДП микрометодом см. с. 335).

Методика постановки макрометода по технике принципиально не отличается от постановки микрометода, только в этом случае в чашку Петри наливают 20—25 мл расплавленного агара и в застывшем геле делают лунки диаметром 5—6 мм по специальной схеме (расстояние между лунками 4—5 мм) и вносят соответствующие компоненты.

При постановке РДП на предметных стеклах препарат можно через 48—72 ч высушить и окрасить раствором амидного черного, что позволит его сохранить и сфотографировать.

Достоинства РДП: простота техники постановки; быстрота получения ответа; не требует стерильной работы, особой чистоты компонентов; возможность документирования результата путем фотографирования. Недостаток РДП — низкая чувствительность.

Иммунодиффузия в электрическом поле (встречный электрофорез, ракетный электрофорез) позволяет повысить чувствительность метода в 10—20 раз и более.

Одна из разновидностей РДП — **реакция радиальной иммунодиффузии (РРИД).** (Методику постановки см. с. 259.)

Иммуноблоттинг (от англ. blot — пятно) — высокочувствительный метод выявления белков, основанный на сочетании электрофореза и ИФА или РИА. Принцип метода заключается в том, что антигены возбудителя разделяют с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, затем переносят их из геля на активированную бумагу (*1*) или нитроцеллюлозную мембрану и проявляют с помощью ИФА. Фирмы выпускают такие полоски с «блотами» антигенов. На эти полоски наносят исследуемую сыворотку (*2*). Затем, после инкубации, отмывают от несвязавшихся антител и наносят сыворотку против иммуноглобулинов того вида животного, который был донором исследуемой сыворотки, меченную ферментом (*3*). Образовавшийся на полоске комплекс (антиген + антитело исследуемой сыворотки + меченое антитело против иммуноглобулинов животного исследуемого вида) выявляют добавлением хромогенного субстрата (*4*), изменяющего окраску под действием фермента (цв. вкл., рис. 20).

Контрольные вопросы

1. Какова суть серологических реакций? 2. Что такое антигены и каковы их природа и основные свойства? 3. Что такое антитела, каковы их виды (полные, неполные, авидные и др.) и свойства? 4. Каков принцип взаимодействия антигена и антител? 5. Какие серологические реакции применяют в вирусологии? 6. Какие серологические реакции можно отнести к экспресс-методам диагностики вирусных болезней? 7. Каков принцип реакции нейтрализации, ее варианты и какие диагностические задачи можно решать с ее помощью? 8. Каковы принципы РИФ и ИФА и их варианты? 9. Каков принцип реакции торможения гемагглютинации, каковы ее варианты и какие диагностические задачи можно решать с ее помощью? 10. Что такое иммуноблоттинг?

1.12. ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Диагностика играет одну из решающих ролей в системе мероприятий по борьбе с болезнями животных вирусной этиологии. Быстрый и правильно поставленный диагноз обеспечивает успех в ликвидации вспышки болезни, так как позволяет четко выяснить эпизоотическую ситуацию и своевременно принять целенаправленные меры по оздоровлению поголовья животных с наименьшими потерями.

Для постановки диагноза требуются сбор, изучение, анализ и сопоставление целого комплекса различных данных. Поэтому диагноз — это результат кропотливой и вдумчивой работы.

На первом этапе диагностики используют данные, которые можно быстро собрать непосредственно в хозяйстве. К таковым относятся:

эпизоотологические данные, включающие сведения об охвате болезнью данного поголовья животных, скорости и территориальном распространении болезни, видах заболевших животных, динамике выявления больных и т. д.;

клинические признаки болезни. Они включают определение (по сравнению с нормой) температуры тела, частоты и формы дыхания, частоты пульса, нарушения аппетита, поведения, состояния кожных покровов и слизистых оболочек, функционирования органов пищеварения, выделения и т. д.;

патологоанатомические изменения, которые обычно устанавливают при вскрытии павших или вынужденно убитых животных. Различают макроскопические изменения (по сравнению с нормой) формы, размера, цвета, консистенции, появление узелков, кровоизлияний, везикул и другие образования, не встречающиеся в норме, а также микроскопические изменения в клетках и тканях, обнаруживаемые гистологическими методами.

Чаще всего на основании этих данных можно поставить предварительный диагноз, так как многие вирусные болезни имеют сходные эпизоотологические данные, клинические признаки и патологоанатомические изменения (например, парагрипп-3, вирусная диарея, инфекционный ринотрахеит, респираторно-синцитиальная и аденовирусная инфекции крупного рогатого скота или болезни Ньюкасла и грипп птиц и др.).

Кроме того, часто болезнь может быть вызвана не одним, а двумя и более этиологическими агентами (например, вирусом и бактериями или двумя и более вирусами). Даже такое заболевание, как ящур крупного рогатого скота, можно довольно уверенно диагностировать по эпизоотологическим, клиническим и патологоанатомическим данным, однако требуются лабораторные исследования для определения типа и варианта возбудителя.

Несмотря на ориентировочный характер предварительного диагноза, он играет весьма важную роль, так как ориентирует ветеринарных специалистов на проведение соответствующих мероприятий.

Окончательный диагноз на вирусную болезнь в большинстве случаев может быть поставлен только с учетом результатов лабораторных исследований. В лабораторной диагностике вирусных болезней точность диагноза прежде всего зависит от правильности взятия материала (пробы) от больных и павших животных, его транспортировки, качества приготовления и техники исследования вирусного материала.

Материал для исследования следует брать как можно быстрее после проявления четких признаков болезни или не позднее 1—2 ч после клинической смерти или убоя (позже начинается бактериальное обсеменение, и по мере продолжения инфекционного процесса количество вируса может уменьшаться в результате воздействия защитных механизмов организма).

При взятии материала для выделения вируса следует исходить из патогенеза предполагаемой инфекции (входные ворота, пути распространения вируса в организме, места его размножения, клинические признаки и пути выделения). В лабораторию направляют тот материал, который с наибольшей вероятностью может содержать возбудителей болезни. При этом необходимо соблюдать следующие общие правила:

материал должен быть взят строго асептически;

материал должен быть немедленно законсервирован (помещен в термос с охлаждающей смесью или добавлением 50%-ного стерильного глицерина), чтобы предотвратить разрушение вирусов;

материал удобнее брать в стерильные пробирки с резиновой пробкой или во флакончики из под антибиотиков. Для исследования вполне достаточно 5—10 г материала;

на пробирках должна быть не смываемая этикетка;

материал направляют с нарочным и сопроводительным письмом, в котором указывают хозяйство, вид больных животных, предварительный диагноз, вид и количество патологического материала, на что следует провести исследование, дату и фамилию врача.

В зависимости от симптомов болезни, а значит, и локализации возбудителя от больного животного может быть взят следующий материал:

смывы со слизистой оболочки носа, глаз, с задней стенки глотки, прямой кишки и клоаки у птиц. Берут их стерильными ватными тампонами, которые погружают в пробирки или флаконы, содержащие 3—5 мл соответствующей жидкости (раствор Хенкса, среды Игла, 199 и др.) с антибиотиками;

содержимое везикул, пустул, стенки везикул, корочки на коже;

фекальные массы непосредственно из прямой кишки;

кровь для выделения вируса и кровь для получения парных сывороток крови для обнаружения и определения титра антител. Для этой цели кровь берут дважды у одного и того же животного — в начале болезни и через 2—3 нед, т. е. в начале и в конце болезни.

От трупов патологический материал должен быть взят не позднее 1—2 ч после клинической смерти или убоя животного. В качестве патологического материала берут кусочки органов, которые:

имеют видимые отклонения от нормы;

могут быть поражены и содержать вирус на основании клинической картины болезни;

наиболее часто содержат вирус: селезенка, печень, легкие, почки, головной мозг, лимфатические узлы.

В лаборатории часть материала берут для исследования, оставшуюся часть хранят в холодильнике на случай дополнительных исследований. Затем составляют план исследования присланного материала, который включает следующие задачи:

обнаружение (индикация) вируса в материале;

выделение (изоляция) вируса из материала;

идентификация выделенного вируса;

при необходимости требуется доказать этиологическую роль выделенного вируса;

ретроспективная диагностика.

Методы обнаружения вирусов в материале от больных животных и трупов. Для обнаружения вируса чаще всего используют экспресс-методы, которые позволяют в материале:

1) обнаружить вирусные белки (антигены). Для этой цели используют серологические реакции: РИФ, ИФА, РНГА, РСК, РДП;

2) обнаружить вирусные нуклеиновые кислоты с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или ДНК-зонда;

3) обнаружить вирионы вирусов. Электронная микроскопия позволяет обнаружить вирусы любых размеров, а крупные вирусы (вирусы оспы) можно увидеть под световым микроскопом. Этот метод называется вирусоскопия.

Электронная микроскопия используется в основном в исследовательских целях. Электронный микроскоп — сложный и дорогой прибор, в диагностических ветеринарных лабораториях его нет. Хотя исследование с его помощью — очень эффективный экспресс-метод при диагностике рота-, коронавирусных и других инфекций. Если в материале содержится не менее 10^7 вирионов на 1 мл, он не требует дополнительных методов очистки и концентрации;

4) обнаружить тельца-включения под световым или люминесцентным микроскопом.

Тельца-включения — это внутриклеточные включения, образующиеся в клетках при репродукции в них некоторых вирусов (цв. вкл., рис. 21). По природе они представляют собой либо скопления (колонии) вирионов, либо измененный под действием вируса клеточный материал, либо комбинацию первого со вторым. Тельца-включения могут находиться в цитоплазме (чаще это РНК-содержащие вирусы) или в ядре (чаще это ДНК-содержащие вирусы, кроме вируса оспы), или в цитоплазме и ядре клетки (вирус чумы собак). Тельца-включения, образуемые некоторыми вирусами, получили специальное название, так, тельца-включения при оспе кур называются тельцами Боллингера, при чуме плотоядных — Ленца, при бешенстве — Бабеша—Негри и др. При обнаружении телец Бабеша—Негри в мазках головного мозга погибшего животного наличие бешенства считается доказанным (цв. вкл., рис. 22). При других вирусных инфекциях обнаружение телец-включений имеет лишь вспомогательное диагностическое значение;

5) обнаружить вирусные гемагглютинины, которые являются белками некоторых вирусов (орто-, парамиксовирусов и др.).

Гемагглютинирующие вирусы способны агглютинировать эритроциты животных определенных видов в условиях соответствующих температуры и pH среды. Иногда используют реакцию гемагглютинации (РГА) для обнаружения гемагглютинирующего вируса в материале (цв. вкл., рис. 23);

6) для обнаружения вируса в активной форме (инфекционной) используют довольно длительные вирусологические исследования. С этой целью применяют метод биопробы на живых чувствительных к предполагаемому вирусу системах: лабораторных животных, куриных эмбрионах, культурах клеток. В редких случаях приходится использовать естественно восприимчивых животных.

Методы выделения вирусов из материала больных животных и трупов. Выделение вируса из исследованного материала — самый важный этап в диагностике вирусных болезней. Его проводят на живых чувствительных к предполагаемому вирусу системах: на животных, куриных эмбрионах и культурах клеток.

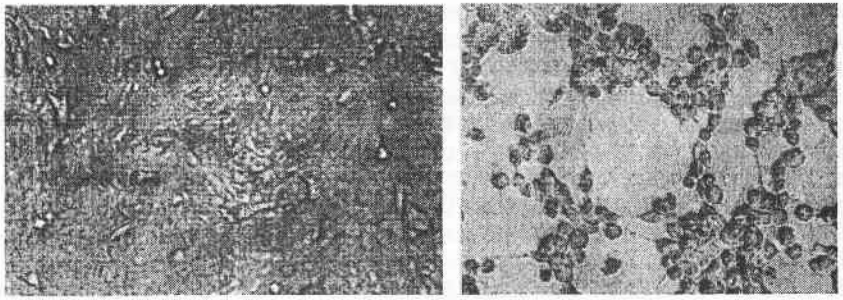
Для заражения чувствительных систем из материала (кусочки органов и тканей) готовят суспензию. С этой целью материал измельчают, растирают в ступке со стерильным кварцевым песком, разводят стерильным физиологическим раствором или раствором Хенкса (1 : 5—1 : 10), освобождают от крупных частиц путем центрифугирования в течение 20—30 мин при 2000—3000 $мин^{-1}$. Затем суспензию освобождают от бактерий и грибов, используя для этой цели антибиотики (обычно смесь пенициллина и стрептомицина по 200—1000 ЕД на 1 мл жидкости и нистатина), или пропускают через бактериальные фильтры (редко). Контролируют эффективность такой обработки посевом на питательные среды для аэробов, анаэробов и грибов. После получения отрицательного результата бактериологического контроля вируссодержащий материал используют для заражения живых объектов.

Смывы для заражения готовят следующим образом. Тампоны, погруженные в соответствующий раствор, встряхивают 10—15 мин, тщательно отжимают, полученную жидкость центрифугируют при 2000—3000 $мин^{-1}$ 20 мин. Надосадочную жидкость отсасывают в стерильные пробирки, обрабатывают антибиотиками и после бактериологического контроля используют для заражения. Из осадка клеток готовят мазки для РИФ.

Полученной таким образом суспензией заражают чувствительные к предполагаемому вирусу живые объекты (животных, куриные эмбрионы, культуры клеток) и регистрируют появление у них признаков размножения вируса, что служит показателем наличия вируса в исследуемом материале. Однако вирус не всегда проявляет действие в первом пассаже. В этом случае необходимо провести 3—4 «слепых» пассажа, чтобы вирус адаптировался к используемому живому объекту и накопился в количестве, достаточном для проявления своего действия.

Выделение вируса на культуре клеток. Культуры клеток пригодны для выделения большинства вирусов животных. Для этой цели используют как первично-трипсинизированные, так и перевиваемые и диплоидные культуры клеток.

Заражение культур клеток проводят следующим образом. Из пробирок или матрасов с выросшим монослоем клеток удаляют ростовую питательную среду, отмывают монослой клеток от ростовой среды (в ней могут быть антитела к исследуемому вирусу и неспецифические ингибиторы) раствором Хенкса и вносят вируссодержащий материал. После контакта (1—1,5 ч), необходимого для адсорбции вируса на клетках, вируссодержащий материал удаляют и вносят поддерживающую питательную среду, которая не способствует размножению клеток, но обеспечивает их жизнедея-



а *б*

Рис. 50. Формы цитопатогенного действия:

а — перевиваемая культура клеток Т-1, не зараженная вирусом (контроль); *б* — перевиваемая культура клеток Т-1, зараженная аденовирусом первого типа крупного рогатого скота

тельность. Пробирки и матрасы помещают в термостат для инкубации. Адсорбировавшиеся на клетках вирусные частицы проникают в клетки, репродуцируются в них и выходят в культуральную жидкость, заражают новые клетки, затем следующие и так до тех пор, пока не останется живых клеток.

Обнаружить вирус в клетках можно следующими методами (или признаками):

1) по цитопатическому действию (ЦПД) или цитопатическому эффекту (ЦПЭ). ЦПД — это любые изменения клеток под влиянием размножающегося в них вируса. Для обнаружения ЦПД зараженные культуры клеток просматривают под малым увеличением светового микроскопа. Формы ЦПД могут быть весьма разнообразными, что зависит от биологических свойств вируса, вида клеток, дозы заражения, условий культивирования и т. д. (рис. 50). Одни вирусы проявляют ЦПД через 2—3 сут после заражения (энтеровирусы), другие — 1—2 нед (аденовирусы). Наиболее существенно различаются между собой три формы ЦПД: фрагментация, округление клеток, симпластобразование (цв. вкл., рис. 24—30).

Фрагментация (см. цв. вкл., рис. 27) — разрушение клеток на отдельные фрагменты (вирус везикулярного стоматита и др.). *Округление* (см. рис. 50) — клетки принимают шаровидную форму и отделяются от стекла (адено-, пикорнавирусы и др.). *Симпластобразование* (см. цв. вкл., рис. 24—26, 28, 29) — образование гигантских клеток: цитоплазма соседних клеток сливается вследствие растворения клеточных оболочек и образуется одна большая клетка со многими ядрами (вирус ПГ-3, чумы крупного рогатого скота и др.);

2) с ее помощью в культуре клеток можно обнаружить некоторые вирусы, обладающие гемагглютинирующими свойствами: вирусы ПГ-3, гриппа и др. реакцией гемадсорбции. Гемадсорбцией называется прилипание (адсорбция) эритроцитов крови на поверх-

ности клеток, зараженных вирусом. Этот метод широко используется при диагностике ПГ-3 крупного рогатого скота, при этом используют эритроциты морской свинки (цв. вкл., рис. 19);

3) методом образования «бляшек». Этот метод технически сложнее других и применяется главным образом для титрования и клонирования вирусов (цв. вкл., рис. 31);

4) обнаружения вируса в РИФ. В том случае, если размножение вирусов в культуре клеток не сопровождается цитопатическим эффектом, гемадсорбцией, его присутствие можно обнаружить при помощи флуоресцирующих антител. Этот метод широко используют при диагностике классической чумы свиней, парвовирусных инфекций, бешенства и др.;

5) иммунопероксидазной реакцией;

6) путем обнаружения внутриклеточных включений. Для выявления телец-включений культуру клеток выращивают на покровных стеклах, помещенных в пробирки, заражают испытуемым материалом и через определенные сроки инкубации (при 37 °С), стекла промывают, фиксируют и окрашивают различными методами (гематоксилин-эозином, акридиновым оранжевым и др.).

Размножающиеся в культурах клеток вирусы частично или полностью (в зависимости от степени разрушения клеток) выходят в культуральную жидкость, которая и используется как готовая суспензия вируса. Если не все клетки культуры разрушились в результате размножения в них вируса, то их разрушают путем 2—3-кратного замораживания и оттаивания или ультразвуком.

Выделение вируса на куриных эмбрионах. Куриные эмбрионы чувствительны к большинству вирусов птиц и к некоторым вирусам млекопитающих (болезни Ньюкасла, гриппа, оспы птиц, ПГ-3 и др.). Используют куриные эмбрионы от 5-го до 12-го дня инкубации. Вирусы в них могут репродуцироваться в клетках самого зародыша, хорионаллантоисной (ХАО) и амниотической оболочках, в стенках желточного мешка, накапливаться в этих структурах и в жидкостях аллантоисной и амниотической полостей. В разных структурах могут репродуцироваться различные вирусы.

Разработано несколько методов заражения куриных эмбрионов, но в практике чаще используют следующие методы:

на ХАО — например, вирусы оспы птиц и др.;

в аллантоисную полость — вирусы гриппа, ПГ-3 крупного рогатого скота, вирус болезни Ньюкасла и др.;

в амниотическую полость — вирусы гриппа;

в желточный мешок — вирус риноларингопневмонии лошадей.

В редких случаях используют метод заражения куриных эмбрионов в тело зародыша и в кровеносные сосуды ХАО.

Обнаружить вирус в куриных эмбрионах можно по следующим признакам:

по гибели зародыша в определенные характерные для соответствующего вируса сроки инкубации;

по патологоанатомическим изменениям в структурах куриного эмбриона, например, белые узелки (оспины) при оспе птиц, инфекционном ларинготрахеите кур и других инфекциях или желто-зеленый цвет аллантоисной жидкости при гепатите утят и т. д. (цв. вкл., рис. 33);

по реакции гемагглютинации (для обнаружения гемагглютинирующих вирусов, например, вируса болезни Ньюкасла, гриппа, ПГ-3 и др.). При наличии вируса в эмбриональной жидкости куриного эмбриона через 3—7 мин после смешивания капли вируссодержащей жидкости и капли взвеси эритроцитов соответствующего вида животного образуются хлопья эритроцитов (агглютинация) (цв. вкл., рис. 23 и 32). Так, для выявления вируса ПГ-3 крупного рогатого скота используют эритроциты морской свинки, вирусов гриппа — эритроциты кур и т. д.

Выделение вирусов на лабораторных животных. Для этой цели чаще всего используют белых мышей, белых крыс, золотистых хомячков, морских свинок, кроликов и др. Существует большое количество методов введения инфекционного материала лабораторным животным. Наиболее часто используют внутримышечное, подкожное, внутрибрюшинное, внутривенное, интраназальное и интрацеребральное введения. Выбор метода заражения зависит от тропизма исследуемого вируса и вида животного.

За зараженными животными устанавливают контроль, отмечая изменения их поведения, появление специфических признаков болезни (так, вирус болезни Ауески у кроликов вызывает зуд, расчесы в месте инъекции вирусного материала, затем паралич и гибель животного).

Материал для вирусологических исследований от лабораторных животных следует брать как можно быстрее после появления четких специфических признаков болезни или после их гибели (так, при выявлении вируса ящура на новорожденных мышатах их убивают в агональной стадии и используют скелетные мышцы для приготовления антигена в РСК).

Признаками размножения вируса в организме лабораторных животных после экспериментального заражения служат гибель, клинические симптомы болезни (цв. вкл., рис. 34, 35) и патологические изменения (устанавливают при вскрытии). Если зараженное животное пало, его немедленно вскрывают, а если не погибло, убивают (через соответствующий срок) и тоже вскрывают для обнаружения патологоанатомических изменений, взятия вируссодержащего материала и дальнейшего исследования или следующего пассажа. Использованных животных обезвреживают автоклавированием или сжиганием в специальной печи.

Выделение вирусов на естественно восприимчивых животных. Используют редко и только в случаях, когда нет возможности использовать лабораторные чувствительные живые системы (культуры клеток, куриные эмбрионы, лабораторных животных).

Методы идентификации выделенных вирусов. Выделенный вирус необходимо идентифицировать, т. е. установить, какой это вирус

(семейство, род, вид). Идентификацию неизвестного (выделенного) вируса проводят с помощью серологических реакций: РТГА, РТГАд, РН, РИФ, ИФА, РНГА, РСК, РДП и др. При этом выделенный вирус используют как антиген и с ним в серологических реакциях применяют специфические сыворотки, содержащие антитела к заведомо известным вирусам. Та сыворотка, с которой выделенный вирус будет давать положительную реакцию (образование комплекса антиген + антитело), и укажет, какой это вирус.

Важно правильно выбирать серологическую реакцию. Каждая лаборатория предпочитает те или иные методы, основываясь на чувствительности, специфичности, скорости, удобствах и стоимости. Так, если вирус выделили на культуре клеток и он дает гемадсорбцию, то проще и быстрее его идентифицировать в РТГАд. Например, вирус ПГ-3 крупного рогатого скота дает гемадсорбцию с эритроцитами морской свинки и может быть идентифицирован в РТГАд. Вирусы, обладающие гемагглютинирующей активностью, целесообразно идентифицировать в РТГА.

Для идентификации выделенных вирусов используют РИФ, ИФА, РНГА, РДП, РСК. Наиболее универсальной и дающей более достоверные результаты при идентификации выделенных вирусов является РН, в которой используют те же живые чувствительные системы, на которых и был выделен исследуемый вирус.

Применение моноклональных антител с определенной специфичностью позволяет проводить идентификацию многих вирусов до уровня подтипов, штаммов или вариантов. Для обнаружения и идентификации вирусов кроме серологических реакций используют прямые методы идентификации вирусных нуклеиновых кислот: ДНК-, РНК-зонды, полимеразную цепную реакцию (ПЦР). С их помощью выявляют нуклеиновые кислоты вирусов.

Методы ДНК (или РНК)-зондов основаны на реакции гибридизации нуклеиновых кислот — способности односпиральных комплементарных цепей ДНК или РНК формировать двуспиральные структуры. Реакция может протекать между комплементарными молекулами вида: ДНК + ДНК, ДНК + РНК, РНК + РНК.

Геном вирусов, представленный в виде специфической последовательности нуклеотидов в молекулах нуклеиновых кислот, наиболее информативен и является надежным критерием для идентификации.

У большинства ДНК-содержащих вирусов (адено-, герпес-, покс-, папилломавирусы и др.) нуклеиновая кислота находится в виде двух цепей, которые связаны (водородная связь) комплементарно через азотистые основания (аденин—тимин, гуанин—цитозин).

5′ Г А А Т Т Ц 3′

3′ Ц Т Т А А Г 5′

Так, у аденовирусов таких нуклеотидных пар 35—36,5 тыс., у герпесвирусов — 125—240 тыс., у поксвирусов — 130—375 тыс. и т. д.

Если водный раствор ДНК нагреть до 100 °С или сильно защелочить (pH > 13), то комплементарные пары оснований теряют связь, и ДНК быстро диссоциирует на две отдельные цепи. Этот процесс называется денатурацией или плавлением.

Если комплементарные цепи ДНК выдерживать в течение определенного времени при температуре 65 °С, они легко спариваются, восстанавливая структуру двойной спирали. Этот процесс получил название ренатурация или гибридизация.

Все типы реакций гибридизации зависят от солевого состава среды, температуры инкубации, длины реагирующих цепей, их нуклеотидного состава.

Любой вирус включает одну специфическую для него молекулу ДНК (или РНК) со строго определенной последовательностью нуклеотидов. Чтобы в исследуемом материале обнаружить вирусную нуклеиновую кислоту, можно воспользоваться ее способностью после разделения цепей (если она двуспиральная) образовывать снова двойную цепь с комплементарной ей молекулой нуклеиновой кислоты, предварительно как-либо помеченной. Такая меченая односпиральная молекула нуклеиновой кислоты, комплементарная молекуле нуклеиновой кислоты определенного вируса, называется ДНК-зондом. Для каждого вида вируса зонд готовят заранее и вводят в него метку в виде атома радиоактивного фосфора (^{32}P) или в виде биотина, или другим веществом.

Методы ДНК-зондов сводятся к следующему:

получение односпирального фрагмента ДНК определенного вируса и его метки — это ДНК-зонд;

выделение из исследуемого материала нуклеиновых кислот и их денатурация;

контакт образовавшихся односпиральных молекул ДНК (или РНК) с ДНК-зондом при 55—65 °С, приводящих к образованию двуспиральных молекул (гибридизация) в случаях их взаимной комплементарности;

удаление всех негибридизированных односпиральных молекул нуклеиновых кислот (отмывают или добавляют нуклеазы);

обнаружение (по метке) образовавшихся двуспиральных молекул нуклеиновых кислот, которые и будут указывать на наличие в исследуемом материале того вируса, на который был получен ДНК-зонд.

Если использовали радиоактивный зонд, то результаты учитывают методом авторадиографии или путем подсчета импульсов в счетчике.

Существует большое количество модификаций метода гибридизации с мечеными нуклеиновыми кислотами. Их можно разделить на две основные группы: способы гибридизации в растворе и способы гибридизации на твердых носителях.

Наиболее популярен метод гибридизации с использованием носителей — нитроцеллюлозных или нейлоновых фильтров и твердых полимеров. Он заключается в том, что одну нуклеиновую кислоту (чаще исследуемую), предварительно денатурированную, иммобилизуют на носителе (фильтре), проводят гибридизацию с ДНК-зондом и непрореагировавшие молекулы зонда отмывают, а иммобилизованные меченые гибриды остаются на фильтре. Сигнал, подаваемый связанным зондом, обнаруживают посредством авторадиографии, если зонд был радиоактивным, или путем образования цветных пятен, если использовали меченный ферментом зонд.

Достоинства метода: высокая чувствительность и специфичность; быстрота анализа; универсальность; отсутствие необходимости в стерильной работе, математической обработке результатов. Недостатки: относительная технологическая сложность и трудность получения зонда; если метка радиоактивная, то нельзя зонд нарабатывать впрок, так как период полураспада ^{32}P — 14 сут, а ^{131}I — 8 сут; если метка нерадиоактивная, то чувствительность метода снижается в 10 раз и более.

Методы ДНК (РНК)-зондов из диагностической практики постепенно вытесняются новым методом — полимеразной цепной реакцией.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Часто используется в качестве экспресс-метода для индикации и идентификации вирусов. Впервые этот метод разработал К. Мюллис (США) в 1983 г. Благодаря высокой чувствительности, специфичности и простоте выполнения его широко применяют в генетике, судебной медицине, диагностике и других областях.

Суть метода — амплификация, т. е. увеличение числа копий строго определенных фрагментов молекулы ДНК in vitro. В этом методе действуют матричный механизм и принцип комплементарности. Две одинарные полинуклеотидные цепи (нуклеиновой кислоты) способны связываться водородными связями в одну двуспиральную, если последовательности нуклеотидов одной точно соответствуют последовательности нуклеотидов другой так, что их азотистые основания могут образовывать пары аденин—тимин и гуанин—цитозин.

ПЦР основана на амплификации ДНК с помощью термостабильной ДНК-полимеразы, осуществляющей синтез взаимно комплементарных цепей ДНК, начиная с двух праймеров. Праймер — это фрагмент ДНК, состоящий из 20—30 нуклеотидов. Эти праймеры (затравки) комплементарны противоположным цепям ДНК. При синтезе ДНК праймеры встраиваются в цепь новосинтезирующихся молекул ДНК.

Обычно ПЦР ставят в 25—40 циклов. Каждый цикл включает три этапа (рис. 51): первый — денатурация при 92—95 °С. При этом две цепи ДНК расходятся; второй — отжиг, или присоединение праймеров при 50—65 °С; третий — элонгация, или полимеризация

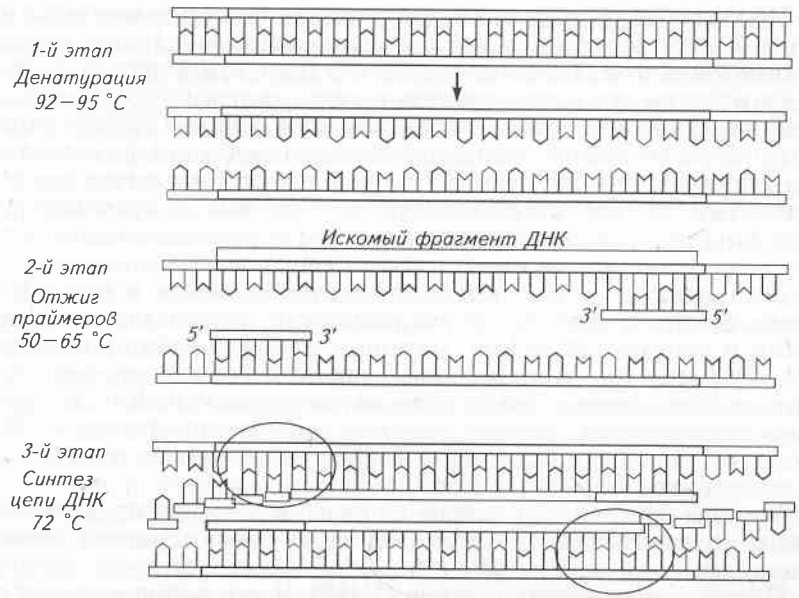


Рис. 51. Этапы полимеразной цепной реакции

при 68—72 °С, при этом ДНК-полимераза осуществляет комплементарное достраивание цепей ДНК-матрицы с помощью четырех видов нуклеотидов. В результате одного цикла происходит удвоение искомого генетического материала. Образовавшиеся в первом цикле цепи ДНК служат матрицами для второго цикла и т. д. После первого цикла амплифицируется только фрагмент между двумя праймерами. Таким образом, идет удвоение числа копий амплифицируемого участка, что позволяет за 25—40 циклов насинтезировать миллионы (2^n) фрагментов ДНК — количество, достаточное для индикации их различными методами (методом гибридизационных зондов, содержащих определенную метку, электрофорезом и т. д.). Чаще для этой цели используют метод электрофореза в агарозном геле с окрашиванием бромистым этидием.

В ПЦР из участков ДНК возбудителя используют праймеры, которые имеют уникальную последовательность нуклеотидов, характерных только для определенного возбудителя.

Методика постановки ПЦР сводится к следующему: из исследуемого материала выделяют ДНК-матрицу; в пробирке соединяют выделенную ДНК с амплификационной смесью, в которую входят ДНК-полимераза*, все 4 вида нуклеотидов, 2 вида праймеров, MgCl, буфер, деионизированная вода и минеральное масло. Затем пробирки помещают в амплификатор, и проводят амплификацию в автоматическом режиме по заданной программе, соответствующей виду возбудителя. Результаты регистрируют чаще методом электрофореза в 1—2%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия, который соединяется с фрагментами ДНК и выявляется в виде светящихся полос при облучении геля УФ-лучами на трансиллюминаторе (цв. вкл., рис. 36). Все процедуры ПЦР занимают 1—2 рабочих дня.

* ДНК-полимераза Taq — термостабильная ДНК-полимераза. Сохраняет активность при 95 °С.

С целью повышения специфичности и чувствительности ПЦР применяют различные варианты: гнездовую ПЦР; ПЦР с «горячим стартом» с использованием парафиновой прослойки или блокады активных центров полимеразы моноклональными антителами. Кроме того, некоторые фирмы выпускают лиофилизированные наборы реагентов для проведения амплификации ДНК, которые позволяют ускорить процесс проведения ПЦР и уменьшить возможность появления ложноположительных результатов.

В настоящее время внедряется новая технология ПЦР—ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR). Ее принципиальная особенность — мониторинг и количественный анализ накопления продуктов полимеразной цепной реакции и автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов (цв. вкл., рис. 37). Этот метод не требует стадии электрофореза, что позволяет снизить предъявляемые к ПЦР требования лаборатории. ПЦР в реальном времени используют флуоресцентно-меченые олигонуклеотидные зонды для детекции ДНК в процессе ее амплификации. ПЦР в реальном времени позволяет провести полный анализ пробы в течение 20—60 мин и теоретически способа детектировать даже одну молекулу ДНК или РНК в пробе.

Система детекции продукта в полимеразной цепной реакции «real-time» (мониторинговая ПЦР) позволяет цикл за циклом следить за накоплением амплифицированной ДНК. Система включает в себя олигонуклеотидный зонд, который способен присоединяться (гибридизироваться) к внутреннему сегменту ДНК-мишени. На 5′-конце зонд помечен флуоресцентным красителем-репортером (reporter dye), а на 3′-конце — блокатором (quencher dye). По мере накопления продукта ПЦР зонд гибридизируется к нему, однако свечения не происходит из-за близости между репортером и блокатором. В результате копирования последовательности полимераза достигает 5′-конца зонда. 5′—3′-экзонуклеазная активность полимеразы отсоединяет флуоресцентную метку с 5′-конца пробы, тем самым освобождая флуоресцирующий репортер от его связи с блокатором сигнала, что и приводит к увеличению флуоресценции. Уровень флуоресценции, таким образом, пропорционален количеству специфичного продукта реакции. Важно, что результаты ПЦР регистрируются по наличию флуоресценции в закрытых пробирках

и, таким образом, решается еще одна из основных проблем этого метода — проблема контаминации ампликонами.

Достоинства ПЦР: быстрота анализа; высокие чувствительность и специфичность; минимальное количество исследуемого материала; простота в исполнении и возможность полной автоматизации.

Ввиду того что чувствительность ПЦР может достигать до детекции одной копии ДНК-матрицы, существует высокая степень опасности получения ложноположительных результатов. Поэтому генно-диагностической лабораторией при постановке ПЦР необходимо неуклонно выполнять специальные требования к планировке и режиму работы.

ПЦР является одним из дополняющих методов, существующих в вирусологической диагностике. Эта реакция очень важна для диагностики вирусных инфекций, когда вирусные антигены или вирусспецифические антитела не могут быть обнаружены и когда присутствие вирусной нуклеиновой кислоты может быть единственным свидетельством заражения, особенно при латентно протекающих и смешанных инфекциях.

Доказательство этиологической роли вируса. В некоторых случаях после выделения вируса требуется доказать его роль в данной вспышке заболевания. Обычно это касается тех вирусов, которые могут находиться в организме животного, и если нет никаких предрасполагающих и осложняющих факторов, не вызывающих болезнь (например, некоторые штаммы энтеровирусов, вирус ПГ-3 крупного рогатого скота, аденовирусы и др.).

Этиологическая роль может быть доказанной, если в парных сыворотках от животных, послуживших источником получения патологического материала, будет установлено нарастание титра антител* к выделенному вирусу. Иногда для доказательства этиологической роли в заболевании животных выделенного вируса пытаются воспроизвести это заболевание на здоровых животных (обычно молодняке) того же вида путем заражения их этим выделенным вирусом. Однако недостаток этого метода, кроме дороговизны, еще в том, что далеко не всегда гарантирует воспроизведение болезни (например, ПГ-3, аденоинфекцию и др.).

Ретроспективная диагностика. В диагностике вирусных болезней ретроспективная диагностика играет очень важную роль. Существуют обстоятельства, при которых практически невозможно выделить вирус, или когда вирус принадлежит к трудноизолируемым из патологического материала (некоторые тога-, буньявирусы и др.). При проведении ретроспективной диагностики применяют серологические методы. Для этой цели исследуют парные

* Нарастание титра антител в 4 раза и более во второй сыворотке по сравнению с первой свидетельствует об этиологической роли выделенного вируса.

сыворотки крови больных животных, для получения которых от каждого животного кровь для исследования на наличие специфических антител берут дважды с интервалом в 2—3 нед: в начале заболевания (в острой фазе) и в конце его (в период выздоровления — реконвалесценции). Чтобы сыворотки были стерильными, берут кровь и получают из нее сыворотку в асептических условиях. До исследования сыворотки в пробирках под пробками хранят в холодильнике или в замороженном состоянии. Парные сыворотки крови обычно берут не менее чем от 10—20 животных и исследуют их одновременно.

Задача исследования сводится к установлению в парных сыворотках титра антител к вирусам, которые предположительно могли бы быть возбудителями болезней животных, от которых получены сыворотки. Предположение, к каким вирусам следует искать антитела, исходит из предварительного диагноза, поставленного по данным эпизоотологических наблюдений, клинических симптомов и патологоанатомических изменений. Наличие в сыворотках антител и их титры определяют в серологических реакциях с использованием эталонных антигенов предполагаемых вирусов. Выбор серологической реакции определяется тем, какая из них наиболее пригодна для работы с вирусом, а также возможностями лаборатории и квалификацией персонала. При этом учитывается быстрота получения ответа, трудоемкость работы и стоимость диагностикумов.

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

Недостаток метода в его ретроспективности, так как к моменту постановки диагноза животное, от которого получены парные сыворотки, уже или выздоровело, или пало. Однако поставленный серологическими методами диагноз достоверен, он дает уверенные представления о болезни и имеет важное значение для мероприятий по ликвидации вирусной болезни.

Новые виды анализов, основанные на микрометодах, включающих автоматическое оборудование, коммуникационные системы для быстрого сообщения полученных лабораторных данных, способствуют снижению себестоимости применяемых методов. Так, новые иммуноферментные анализы, часто основанные на моноклональных антителах или вирусных антигенах, полученных при помощи ДНК-технологий, привели к широкой разработке диагностических наборов.

Общая схема профилактики и диагностики вирусных болезней



Биологический материал для лабораторных исследований:

1) от больных животных:

смывы (носовые, глазные, половых органов);

поражения на коже и слизистых оболочках (стенки афт и папул, корочки, везикулярная и афтозная жидкость);

фекалии;

кровь: на вирусовыделение; для получения парных сывороток;

2) от трупов:

кусочки измененных органов и тканей;

кусочки органов и тканей согласно клиническому проявлению болезни;

кусочки органов, в которых чаще всего можно обнаружить вирус (селезенка, легкие, почки, печень, головной мозг, лимфатические узлы).

Этапы лабораторных исследований

I. Индикация вируса в патологическом материале.

Экспресс-методы:

1) обнаружение вирионов:

электронной микроскопией;

световой микроскопией (оспа);

2) обнаружение вирусных антигенов:

в серологических реакциях (РИФ, ИФА, РСК, РДП, РНГА);

3) обнаружение телец-включений методами световой и люминесцентной микроскопии;

обнаружение вирусных нуклеиновых кислот методами ПЦР, ДНК-зондов;

обнаружение гемагглютининов в РГА;

обнаружение инфекционной активности вируса методом биопробы на животных, куриных эмбрионах и культурах клеток.

II. Изоляция вируса из патологического материала методом биопробы:

1) **на животных** (лабораторных или естественно-восприимчивых).

Признаки размножения вируса в их организме: клинические симптомы, гибель, патологические изменения;

2) **на куриных эмбрионах.**

Признаки размножения вируса: гибель, патологические изменения, наличие реакции гемагглютинации (для гемагглютинирующих вирусов);

3) **в культурах клеток.**

Признаки размножения вируса: ЦПД, РГАд, бляшки, РИФ и др.

Для выделения большинства вирусов проводят не менее трех слепых пассажей.

III. Идентификация выделенного вируса

в серологических реакциях:

РН, РТГА, РТГАд, РИФ, ИФА, РСК, РДП, РНГА и др.;

в реакциях антиген — выделенный вирус, антитела — в стандартных сыворотках.

IV. Доказательство этиологической роли выделенного вируса

в серологических реакциях:

РН, РТГА, РТГАд, РИФ, ИФА, РСК, РДП, РНГА и др.;

в реакциях антиген — выделенный вирус, антитела — в парных сыворотках крови.

Положительный результат при увеличении титра антител во вторых пробах сывороток по сравнению с первыми в 4 и более раз.

V. Ретроспективная диагностика.

Исследование парных сывороток крови в серологических реакциях:

РН, РТГА, РТГАд, РИФ, ИФА, РСК, РДП, РНГА и др.;

в реакциях антиген — стандартные эталонные антигены, в качестве антител — парные сыворотки.

Положительный результат при увеличении титра антител во вторых пробах сывороток по сравнению с первыми в 4 и более раз и увеличении серопозитивных животных.

Контрольные вопросы

1. На основании каких данных можно поставить предварительный диагноз? 2. Почему при постановке окончательного диагноза на вирусные болезни необходимо проводить лабораторные исследования? 3. Каков принцип взятия патологического материала для лабораторных исследований? 4. Какими методами проводят индикацию вируса в патологическом материале? 5. Какие живые системы используют для изоляции вируса из патологического материала? 6. Какие методы используют для идентификации выделенного вируса? 7. В каких случаях требуется доказательство этиологической роли выделенного вируса? 8. Как можно поставить диагноз ретроспективно?

Глава 2
ЧАСТНАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ

●

2.1. СЕМЕЙСТВО АДЕНОВИРУСОВ

Семейство Adenoviridae (от греч. Adenos — железа) — большая группа вирусов, поражающая млекопитающих и птиц. Впервые аденовирусы были выделены в 1953 г. из миндалин и аденоидов детей.

Вирионы аденовирусов имеют икосаэдрическую (двадцатигранную) структуру и состоят из капсида и сердцевины, суперкапсидной оболочки нет. Капсид вирионов имеет диаметр 70—90 нм и состоит из 252 капсомеров, из которых 240 — гексоны (они образуют 20 поверхностей) и 12 пентоны. Пентоны расположены на вершинах икосаэдра и состоят из основания и длинного отростка (нити). Каждый пентон окружен пятью капсомерами, гексон — шестью соседними капсомерами. Сердцевина вирионов аденовирусов состоит из ДНК и четырех внутренних белков.

Геном аденовирусов содержит одну линейную двуспиральную молекулу ДНК с молекулярной массой 20—25 МД (35 000—36 500 пар нуклеотидов). Каждый 5′-конец молекулы ДНК ковалентно связан с терминальным белком (55 кД). Вероятно, он кодируется геномом вируса и играет важную роль в репликации ДНК. ДНК вируса инфекционна.

В вирионах аденовирусов содержится 13—14 полипептидов с молекулярными массами от 5 до 120 кД. В состав капсида входит 7 полипептидов: II, III, IIIa, IV, VI, VIII и IX.

Полипептид II содержится в гексонах, которые составляют основную массу белка вирионов (53 %) и имеют сложную антигенную структуру. В составе гексонов обнаружены две антигенные детерминанты, одна из которых индуцирует синтез группоспецифических, а другая — типоспецифических антител, нейтрализующих инфекционную активность вируса. Пентоны токсически действуют на клеточные культуры. Цитоплазматическая активность связана с основанием пентона (полипептид III). Нити пентонов (полипептид IV) отвечают за адсорбцию вирионов на клеточной поверхности и образование антител, обладающих вирус-нейтрализующей активностью.

В сердцевине вирионов содержатся четыре изученных белка: V, VII, X и 55 кД. Кроме этого, в вирионах в незначительных количествах содержатся полипептиды XI и XII, локализация и функции которых пока не ясны.

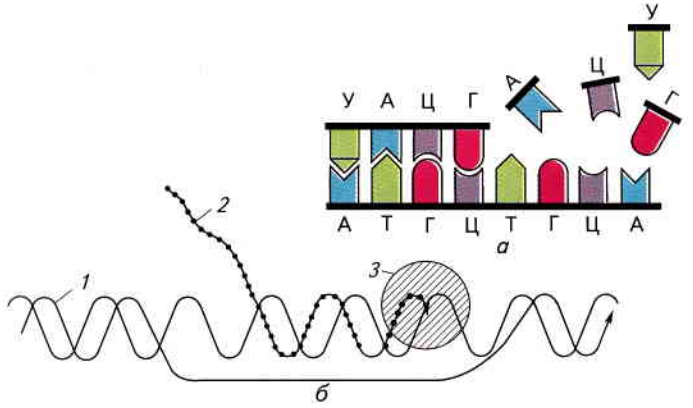


Рис. 1. Транскрипция ДНК и образование комплементарной РНК-цепочки:

а — спаривание комплементарных нуклеотидов при полимеризации; А, Ц, Г, Т, У — сокращенные обозначения аденина, цитозина, гуанина, тимина, урацила; *б* — схема транскрипции ДНК: *1* — ДНК; *2* — растущая нить; *3* — ДНК-зависимая РНК-полимераза

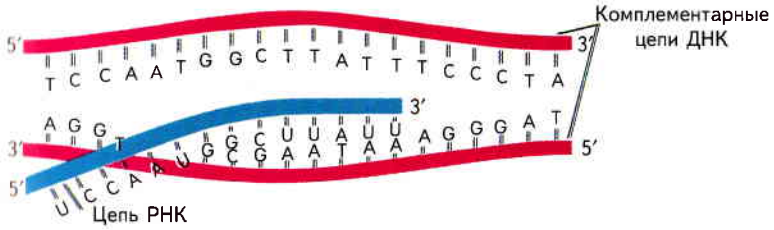


Рис. 2. Синтез РНК (транскрипция на локально денатурированном участке ДНК)

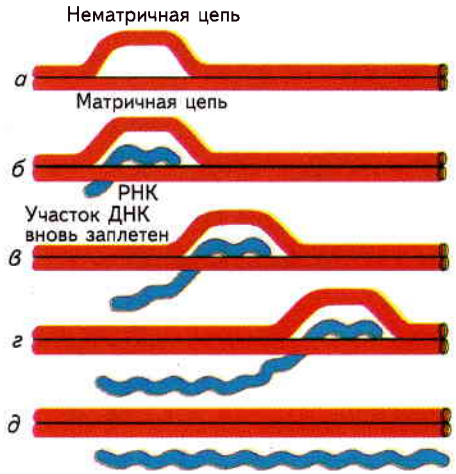


Рис. 3. Основные этапы транскрипции. Нуклеотидная последовательность РНК такая же, как у нематричной цепи ДНК:

а — инициация транскрипции: расплетание ДНК в начале гена; *б* — синтез РНК путем комплементарного спаривания с матричной цепью ДНК; *в* — перемещение места синтеза вдоль молекулы ДНК; *г* — транскрипция доходит до конца гена; *д* — отделение молекулы РНК и восстановление спиральной структуры ДНК

Вклейка 1. Зак. № 7291

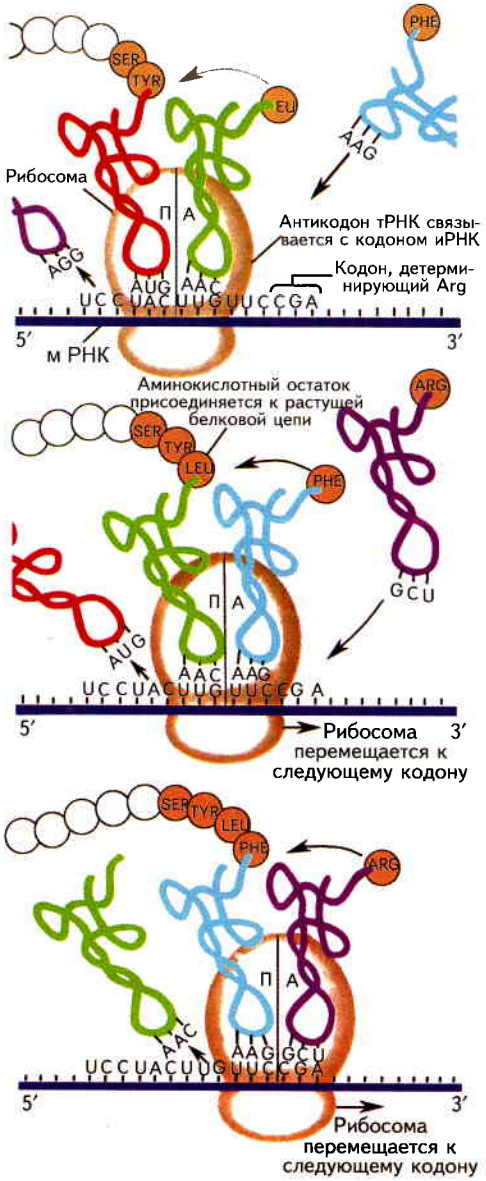


Рис. 4. На рибосоме кодоны иРНК спариваются с антикодонными тРНК, нагруженными аминокислотами:

А-центр (аминоацильный центр); П-центр (пептидильный центр)

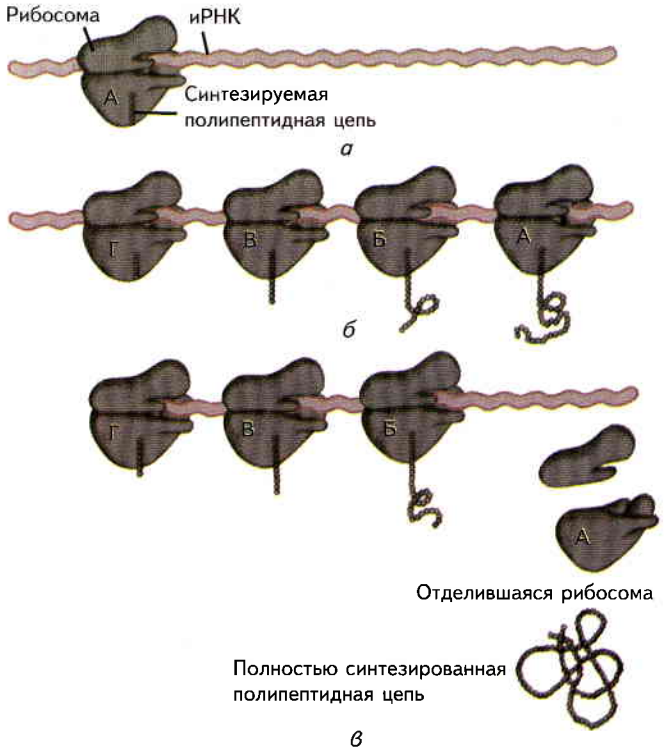


Рис. 5. Основные этапы трансляции матричной РНК с образованием белка:

полипептидная цепь и мРНК изображены без соблюдения масштаба; *а* — первая рибосома уже заняла свое место на иРНК. Она несет короткий полипептид — начальный участок кодируемого белка; *б* — картина, наблюдаемая через несколько секунд. Рибосома перемещается по иРНК, которая диктует последовательное присоединение аминокислот к полипептидной цепи. Такой же процесс осуществляется с участием второй, третьей и четвертой рибосом, в результате чего на мРНК образуется полирибосомный кластер; *в* — первая рибосома завершила сборку полипептидной цепи. Полипептидная цепь отделяется от рибосомы, а последняя отделяется от иРНК. Укладка синтезируемых полипептидных цепей и образование вторичной и третичной структуры начинаются еще до завершения их синтеза

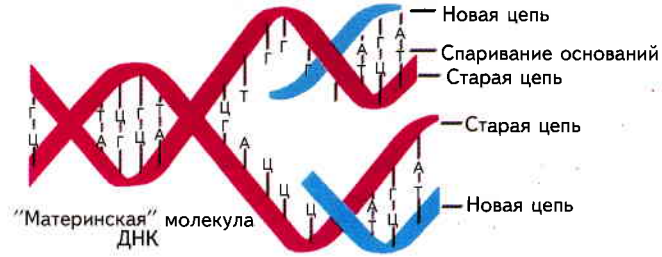


Рис. 6. "Материнская" ДНК служит матрицей для комплиментарных цепей

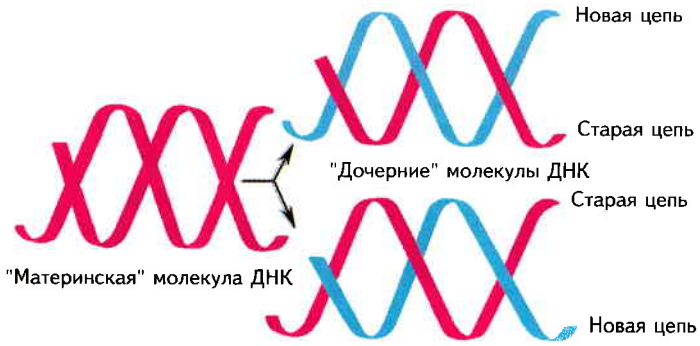


Рис. 7. Полуконсервативный механизм репликации

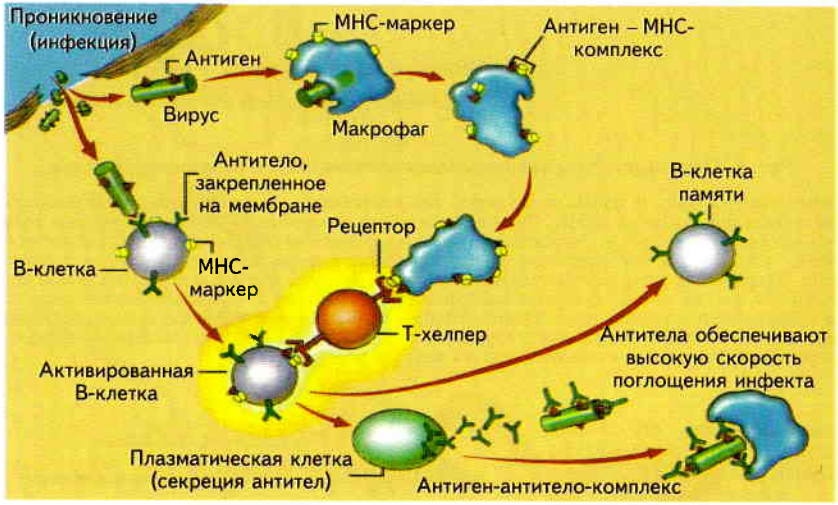


Рис. 8. Схема гуморального иммунного ответа:

МНС (от англ. major histocompatibility complex) — ГКГС — главный комплекс гистосовместимости

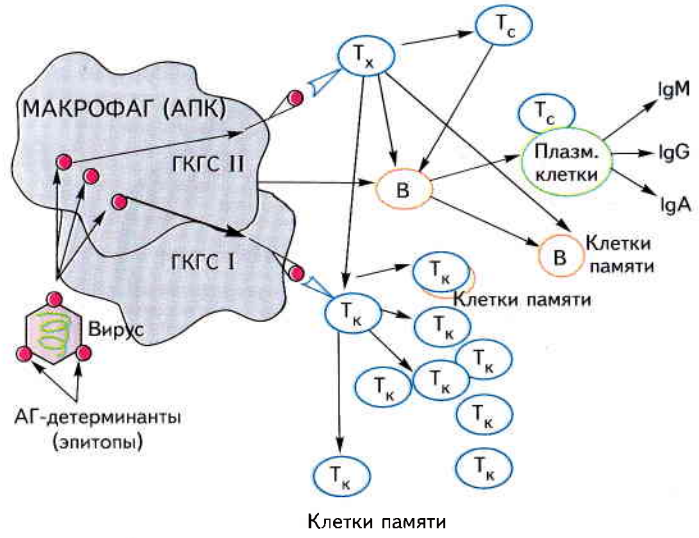


Рис. 9. Общая схема иммунного ответа

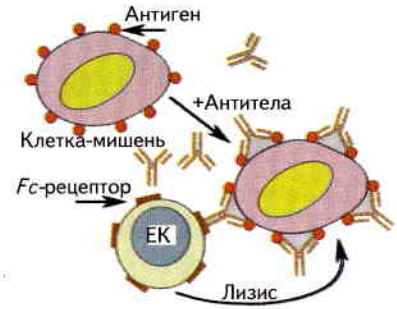


Рис. 10. Антителозависимая клеточная цитотоксичность

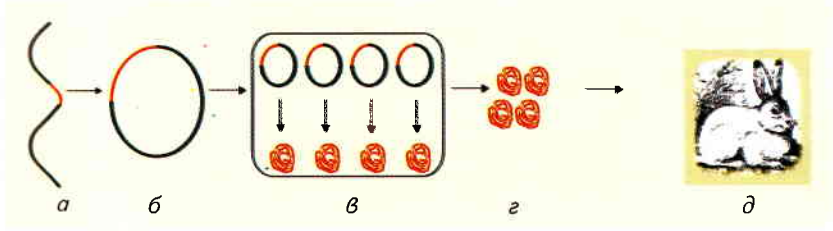


Рис. 11. Схема получения векторных вакцин:

а — НК вируса; *б* — рекомбинантная плазмида E. coli; *в* — репликация рекомбинантных плазмид E. coli и синтез вирусных белков; *г* — выделение и очистка вирусных белков; *д* — вакцинация животных очищенными белками

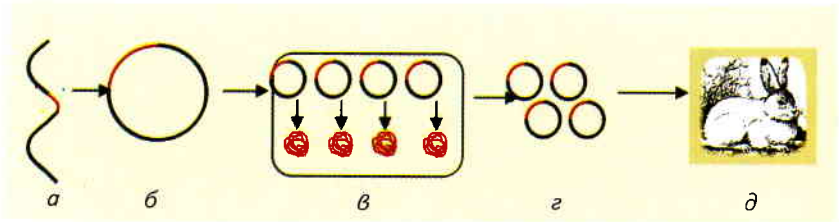


Рис. 12. Схема получения ДНК-вакцин:

а — НК вируса; *б* — рекомбинантная плазмида E. coli; *в* — репликация рекомбинантных плазмид в клетке E. coli и синтез вирусных белков; *г* — выделение и очистка рекомбинантных плазмид; *д* — вакцинация животных препаратами рекомбинантных плазмид

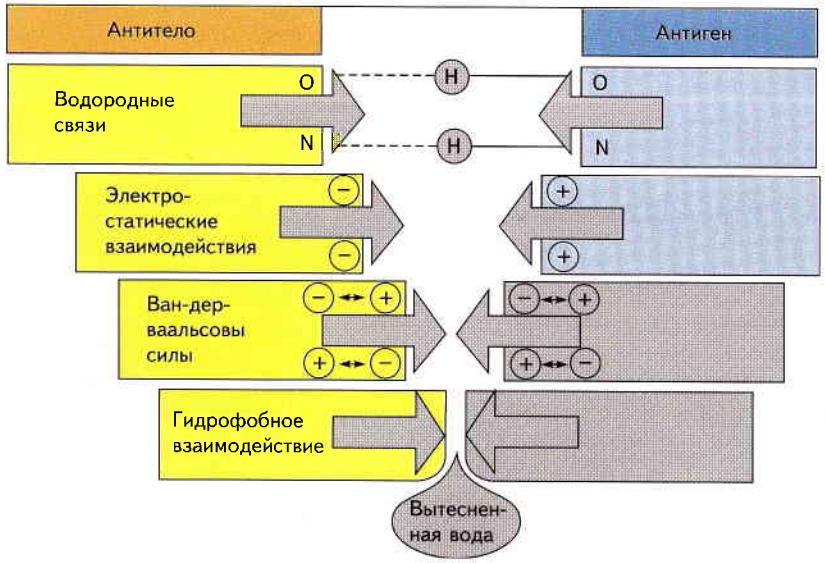


Рис. 13. Схема межмолекулярного притяжения

Для возникновения сил связывания (между антителом и антигеном) требуется тесное сближение взаимодействующих атомных групп. Водородные связи образуются за счет водородных мостиков между такими группами. Электростатическое взаимодействие возникает вследствие притяжения противоположно заряженных атомных групп, расположенных на боковых цепях связывающихся белков. Ван-дер-ваальсовы связи обусловлены взаимодействием между электронными оболочками молекул (в данном случае между индуцированными колебательными диполями). Гидрофобное взаимодействие, способное обеспечивать до $^1/_2$ общей энергии связи между антигеном и антителом, — это сильное притяжение в воде между неполярными (гидрофобными) группами, которое почти полностью устраняет их контакт с водой. В зависимости от типа связи различаются величины оптимального для связывания расстояния между взаимодействующими группами

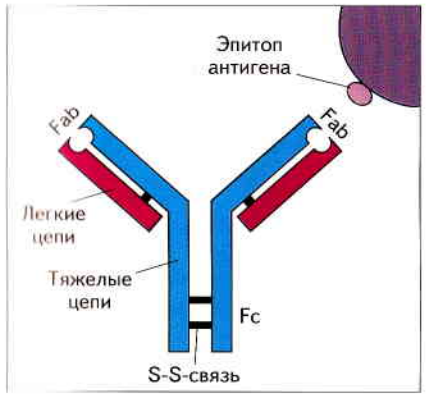


Рис. 14. Схема молекулы IgG:

Fab (fragment antigen bihding) — антигенсвязывающий участок (активный центр антитела); Fc (fragment cristallizable) связывает комплемент (при образовании комплекса антиген — антитело), взаимодействует с мембранами различных клеток (макрофагов, полиморфно-ядерных лейкоцитов и др.) и участвует в переноса IgG через плаценту

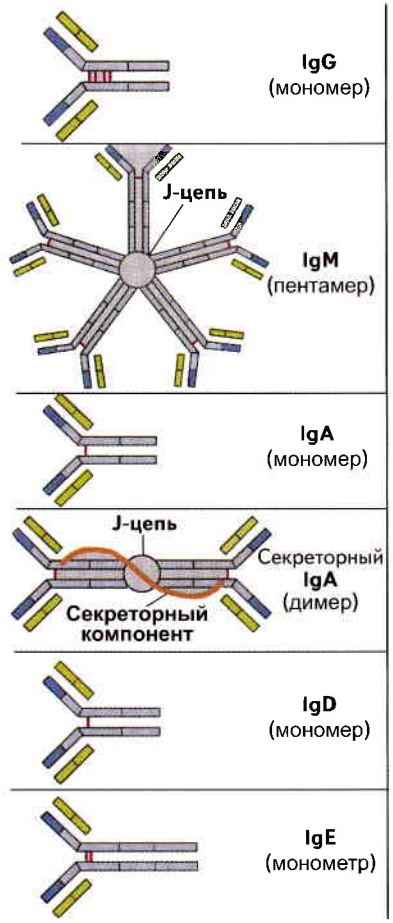


Рис. 15. Схема строения иммуноглобулинов классов G, M, A, D и E:

J-цепь — гликопептидная молекула, обеспечивающая полимеризацию IgA и IgM; секреторный компонент-полипептид, происходящий из поли-Ig-рецептора и включаемый в структуру IgA в эпителиальных клетках, что обеспечивает транспорт через эпителии и секрецию в кишечник, слюну, слезную жидкость, молоко и др., где IgA является преобладающим

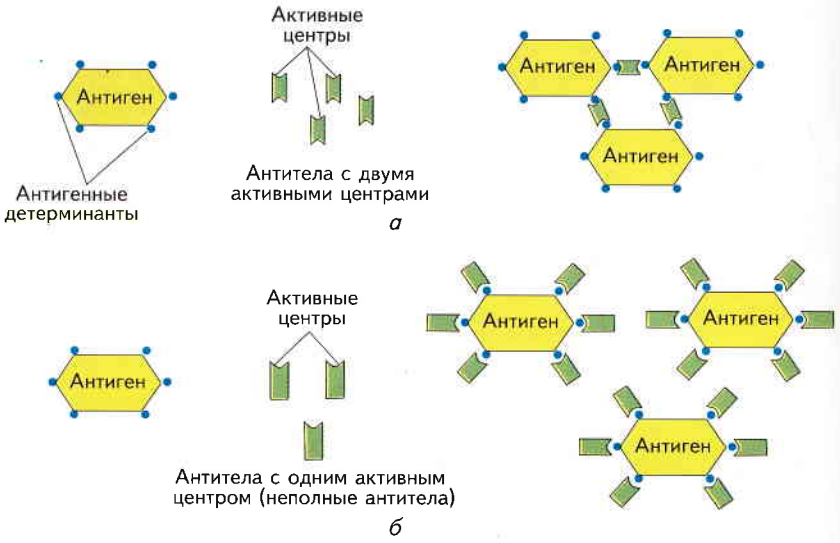


Рис. 16. Схема взаимодействия полных (*а*) и неполных (*б*) антител с антигеном

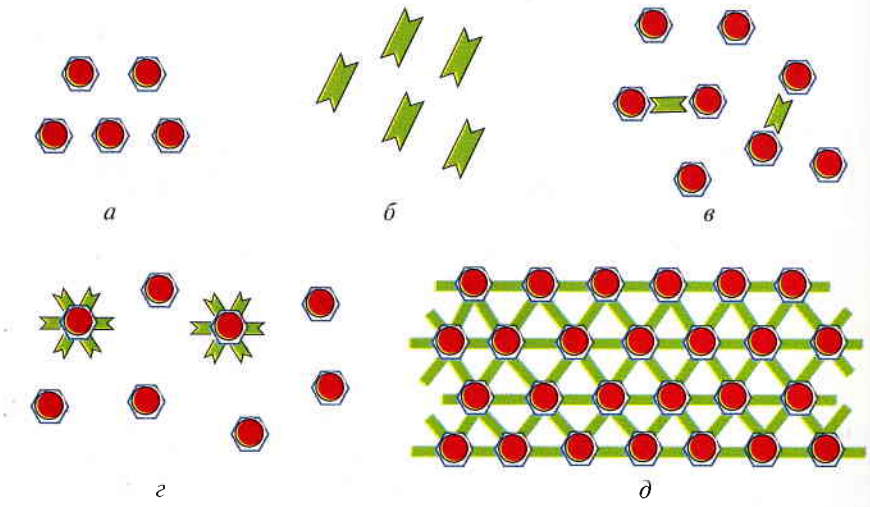
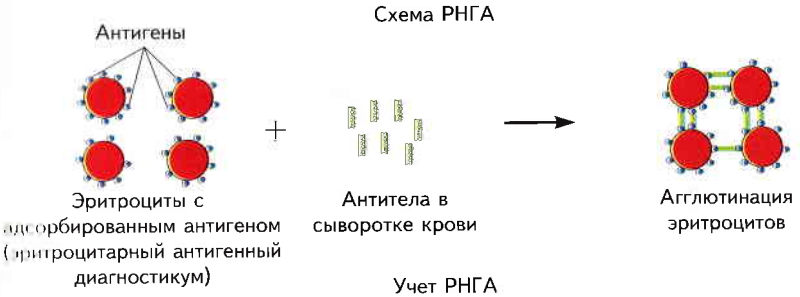


Рис. 17. Схема взаимодействия антигенов и антител:

а — антигены с шестью антигенными детерминантами (эпитопы); *б* — антитела с двумя активными центрами; *в* — избыток антигена, макроагрегата нет, реакция не визуальна; *г* — избыток антител, макроагрегата нет, реакция не визуальна; *д* — оптимальное количество антител и антигена; образуется макроагрегат (хорошо виден в форме преципитата)



Учет РНГА

Разведения сыворотки крови							Контроли диагностикума			
1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1—на самоагглютинацию	2—на активность	3—на специфичность	4—контроль сыворотки
Агглютинация				Нет агглютинации						
Титр антител 1:160										

Рис. 18. Схема и учет РНГА:

1 — диагностикум с разбавителем; *2* — диагностикум с гомологичными антителами; *3* — диагностикум с гетерологичными антителами; *4* — исследуемая сыворотка с эритроцитами

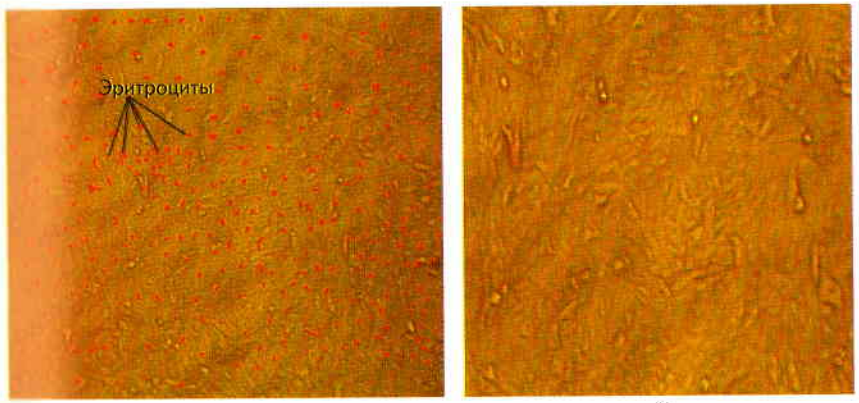


Рис. 19. РГАд:

а — культура клеток, инфицированная вирусом ПГ-3 крупного рогатого скота; *б* — культура клеток, неинфицированная вирусом

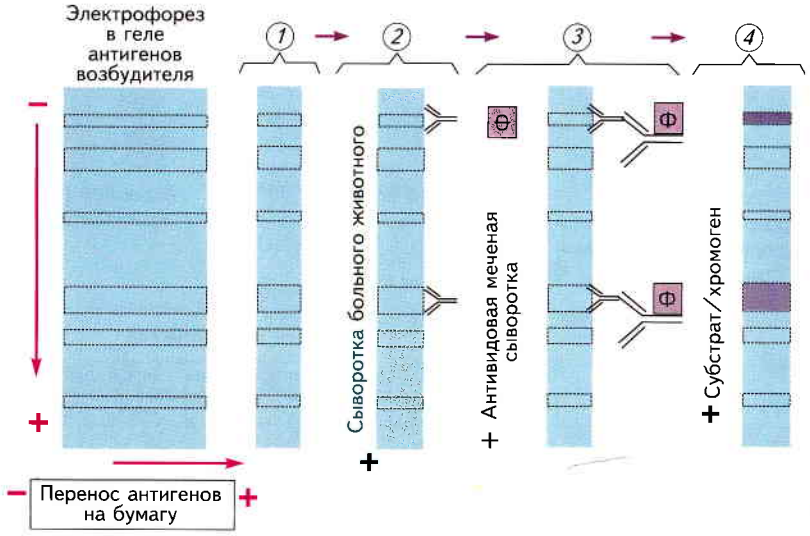


Рис. 20. Схема иммуноблоттинга:

Ф — фермент

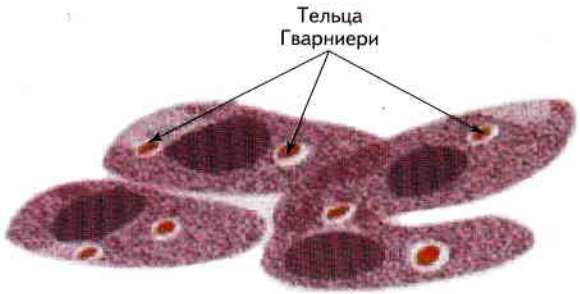


Рис. 21. Тельца Гварниери — цитоплазматические (околоядерные) включения

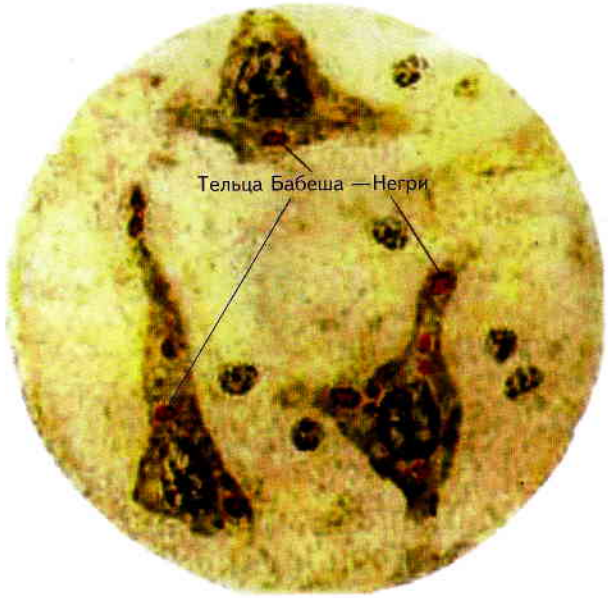


Рис. 22. Тельца Бабеша—Негри (цитоплазматические включения)

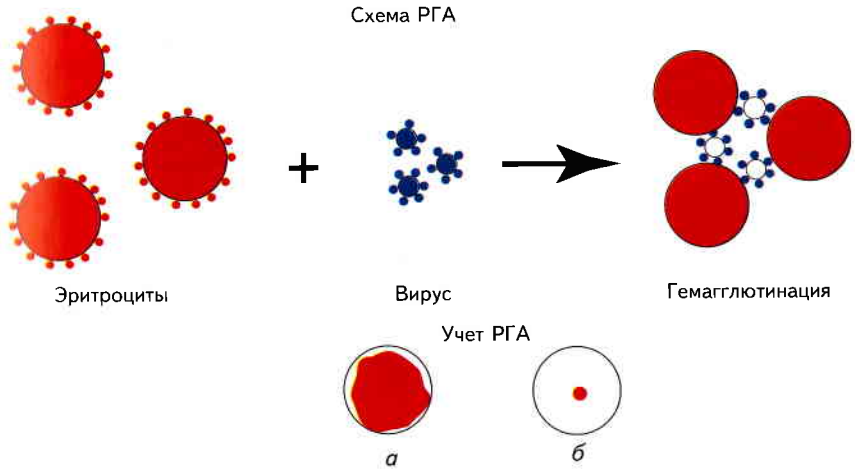


Рис. 23. Схема и учет РГА:

а — положительной; *б* — отрицательной

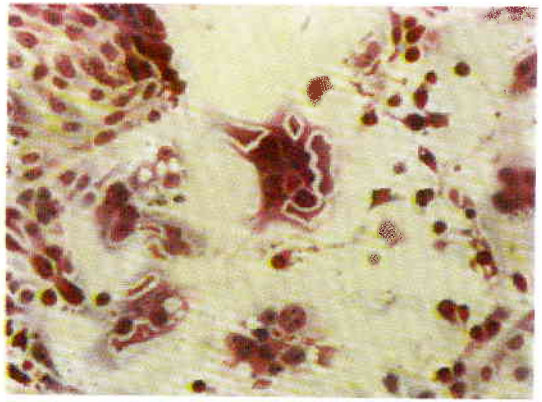


Рис. 24. Перевиваемая культура почки теленка через 7 дней после заражения вирусом чумы крупного рогатого скота:

виден небольшой синцитий с ацидофильными цитоплазматическими включениями (гематоксилин-эозин)

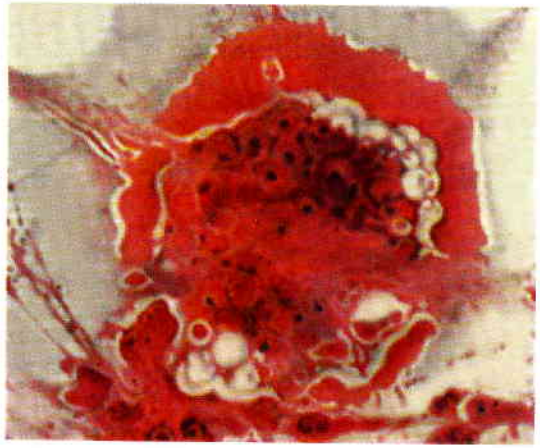


Рис. 25. Субкультура почки щенка через 12 дней после заражения вирусом чумы плотоядных:

многоядерный синцитий содержит ацидофильные включения (гематоксилин-эозин)

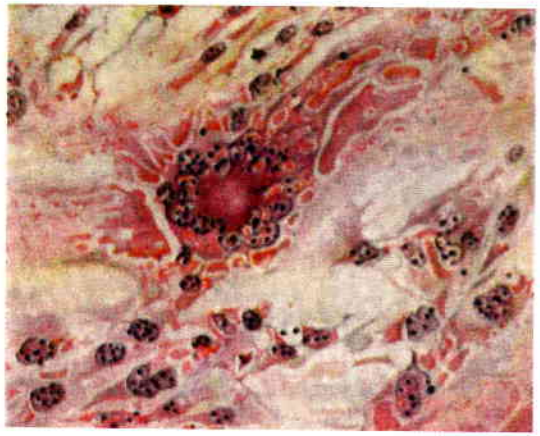
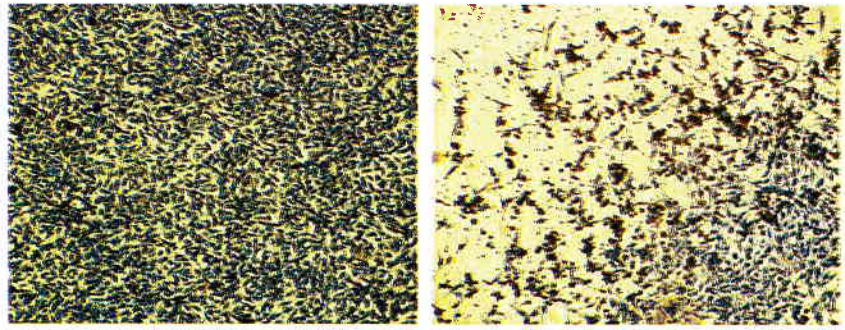


Рис. 26. Поражение культуры клеток почки теленка вирусом парагриппа крупного рогатого скота:

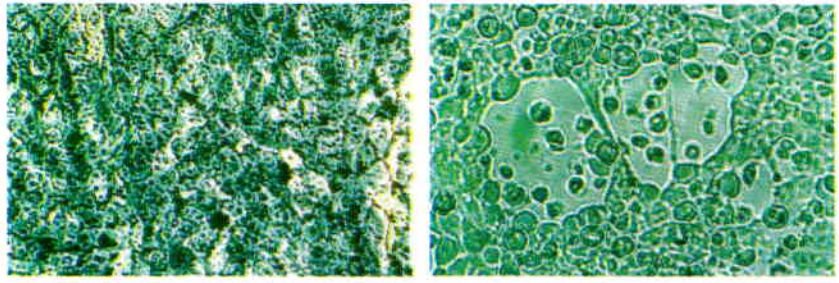
виден большой синцитий, содержащий ацидофильные цитоплазматические включения разного размера и небольшие внутриядерные включения



а *б*

Рис. 27. Перевиваемая культура клеток (почка кошки):

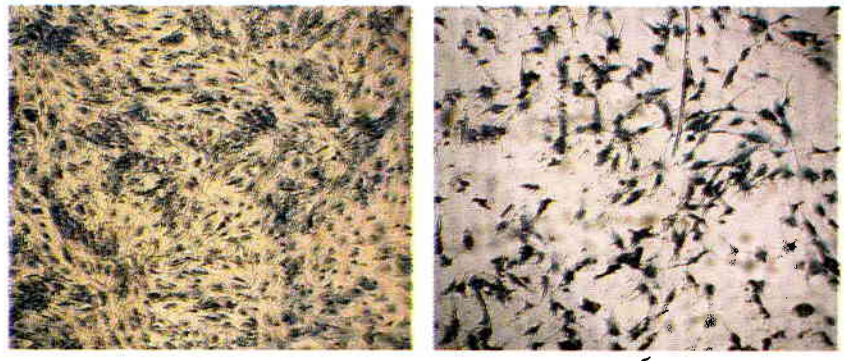
а — незараженная (контроль); *б* — зараженная вирусом ринотрахеита кошек



а *б*

Рис. 28. Перевиваемая культура клеток (почка теленка, ПТ80):

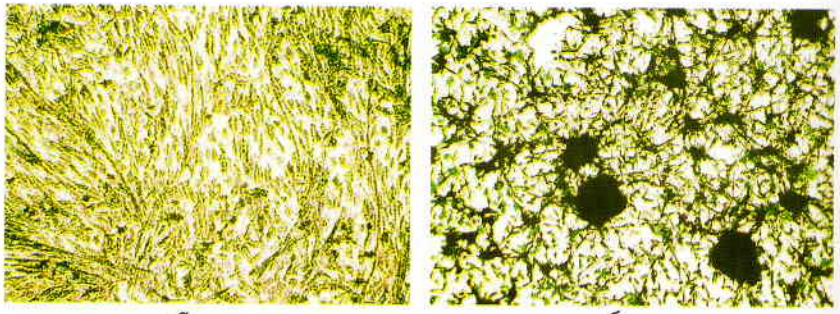
а — незараженная (контроль); *б* — зараженная респираторно-синцитиальным вирусом крупного рогатого скота



а *б*

Рис. 29. Перевиваемая культура клеток (легкое эмбриона коровы):

а — незараженная (контроль); *б* — зараженная вирусом парагриппа-3 крупного рогатого скота



а б

Рис. 30. Первичная культура клеток (куриные фибробласты):

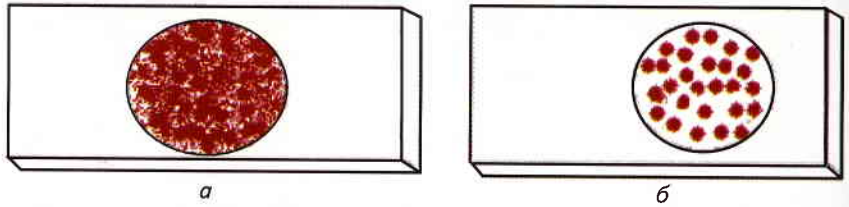
а — незараженная (контроль); *б* — зараженная вирусом гриппа А (H9N2)



а б

Рис. 31. «Бляшки»:

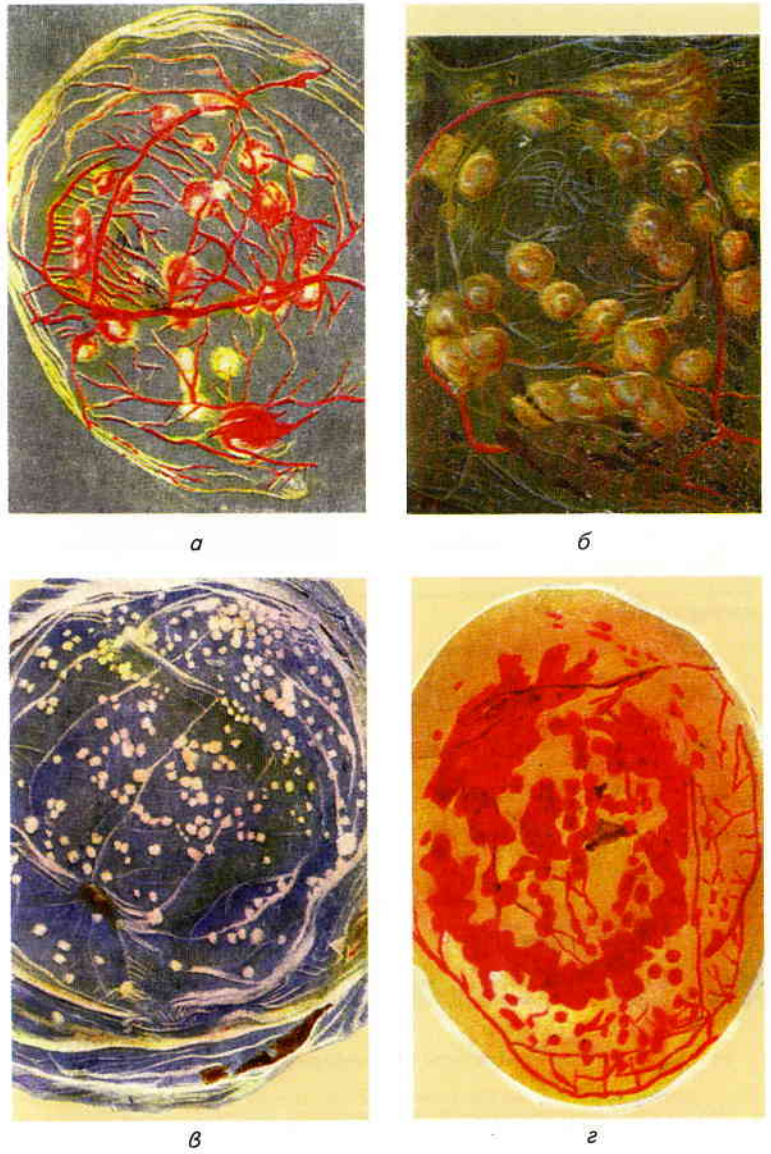
а — контроль-культура клеток, незараженная вирусом; *б* — «бляшки» — культура клеток, зараженная вирусом



а б

Рис. 32. Капельная реакция гемагглютинации:

а — гомогенная взвесь эритроцитов после смешивания их с вируссодержащей жидкостью; *б* — хлопья агглютинированных эритроцитов после смешивания их с вируссодержащей жидкостью



а б в г

Рис. 33. Культивирование вирусов на хорион-аллантоисной мембране развивающихся куриных эмбрионов после пяти дней инкубации:

а — поражения, вызываемые вирусом оспы птиц; *б* — поражения, вызываемые вирусом ларинготрахеита птиц; *в* — множественные мелкие фокусы на мембране, вызываемые вирусом болезни Аусски; *г* — геморрагические оспенные фокусы на хорион-аллантоисной мембране, зараженной вирусом оспы коров



Рис. 34 Оспенные поражения гребня кур после экспериментального заражения



Рис. 35. Оспенный фолликулит на голени кур после экспериментального заражения



Рис. 36. Основные компоненты полимеразной цепной реакции (ПЦР):

праймеры (синтетические полинуклеотиды 20—30 н. п.) — комплементарные последовательностям ДНК на границах определяемого специфического фрагмента; смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (дНТФ) — материал для синтеза новых цепей ДНК; фермент Tag — полимераза синтезирует цепи ДНК в присутствии ионов магния; буферный раствор поддерживает активность системы; минеральное масло для предотвращения испарения содержимого

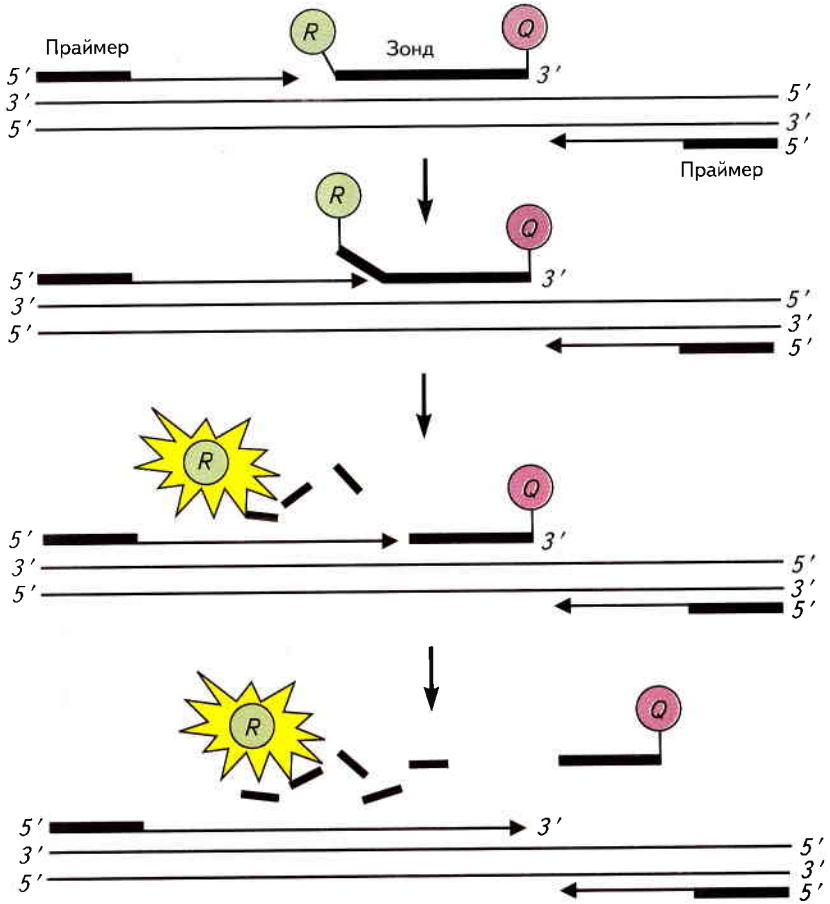
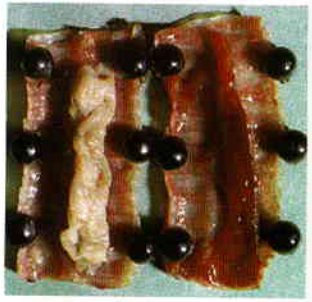


Рис. 37. Полимеразная цепная реакция в реальном времени:

R — флуорофор (репортер); *Q* — тушитель (блокатор)



Рис. 38. Синдром снижения яйценоскости: деформация скорлупы



а б

Рис. 39. Инфекционный ларинготрахеит птиц:

а — геморрагическое; *б* — дифтеритическое воспаление трахеи

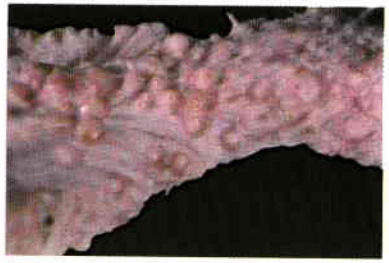


Рис. 40. Болезнь Марека: кожный лейкоз



Рис. 41. Болезнь Марека: утолщение седалищного нерва





Рис. 42. Оспа кур:

а — дифтеритические образования в гортани; *б* — эпителиоподобные образования на голове



Рис. 43. Ящур: эрозия на языке больной коровы



Рис. 44. Ящур: афты на сосках больной коровы (*по Мареку, Моги и др.*)



Рис. 45. Поражения в области межкопытной щели у коровы при ящуре (*по А. Л. Скоморохову*)



Рис. 46. Афты и эрозии на пятачке больной свиньи (*по А. Л. Скоморохову*)



Рис. 47. Схема реакции радиальной иммунодиффузии:

A, O, C — типы антигена. Положительная реакция с антигеном типа О



Рис. 48. Инфекционный бронхит кур: геморрагическое воспаление гортани и трахеи



Рис. 49. Инфекционный бронхит кур: нефроз



Рис. 50. Эрозии и отслоение эпителия слизистой губ при чуме



Рис. 51. Ньюкаслская болезнь. Кровоизлияния на границе железистого и мышечного желудков

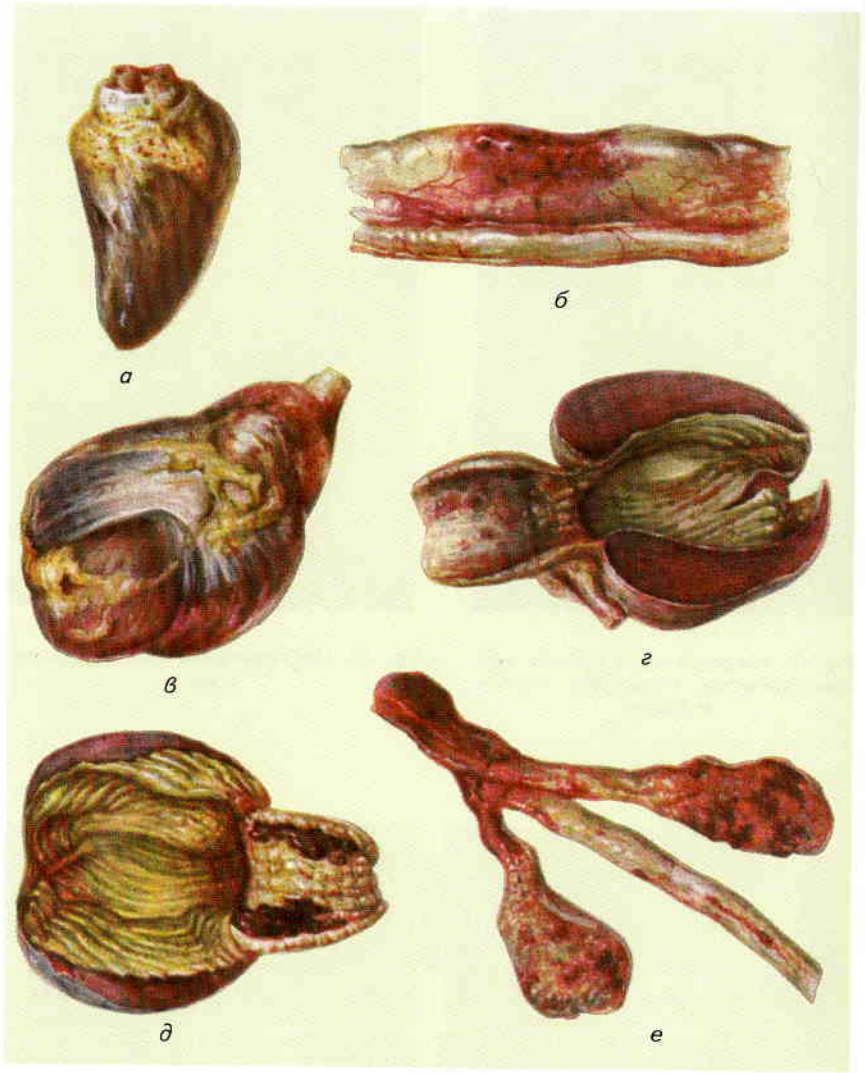


Рис. 52. Патологоанатомические изменения органов птиц при гриппе:

а — множественные точечные кровоизлияния на сердце; *б* — кровоизлияния на серозной оболочке кишечника *в* — кровоизлияния на серозной оболочке железистой и мускульной частей желудка; *г* — кровоизлияния на слизистой оболочке железистой и мускульной частей желудка; *д* — кровоизлияния в мускульной и железистой частях желудка; *е* — кровоизлияния в слепых отростках

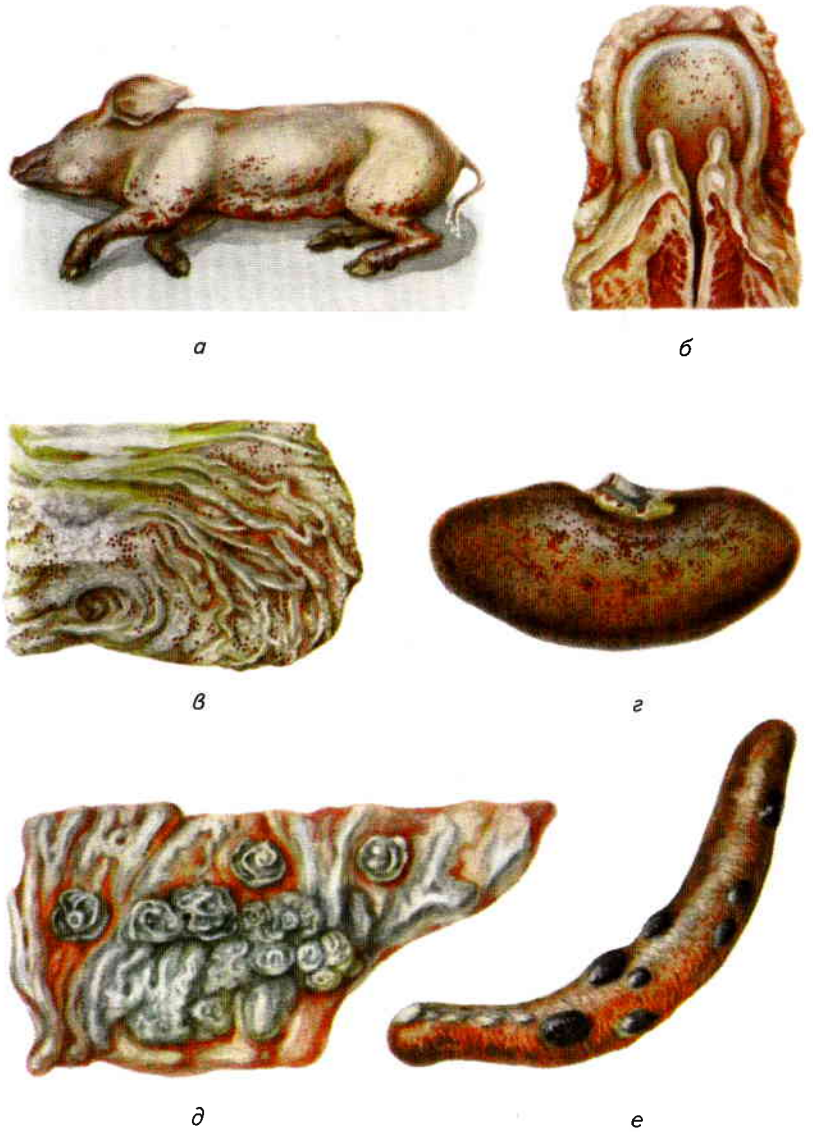


Рис. 53. Патологоанатомические изменения органов при классической чуме свиней:

а — множественные кровоизлияния на коже; *б* — кровоизлияния на слизистой оболочке надпочечника; *в* — множественные кровоизлияния на слизистой оболочке желудка; *г* — множественные точечные кровоизлияния под капсулой почки; *д* — слоисто-концентрические возвышающиеся струпья (бутоны) на слизистой оболочке толстых кишок; *е* — геморрагические инфаркты в селезенке



Рис. 54. Поражение фабрициевой сумки при инфекционной бурсальной болезни

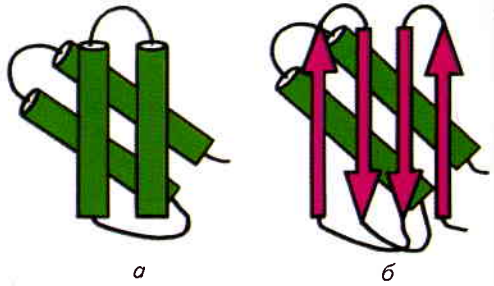


Рис. 55. Предполагаемая третичная структура нормального (*а*) и аномального (*б*) прионного белка. Цилиндрами обозначены a-спирали, стрелками — b-складчатые структуры

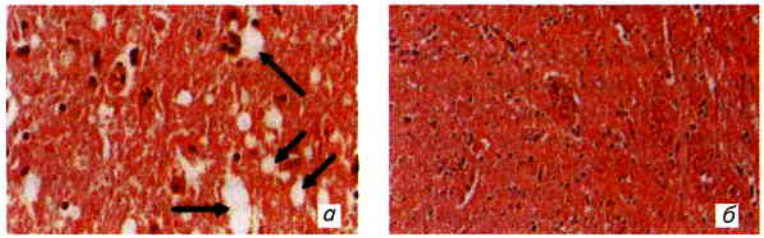


Рис. 56. Губчатая энцефалопатия крупного рогатого скота. Гистологическое исследование:

а — вакуолизация и гибель нейронов при ГЭ КРС (вакуоли указаны стрелками); *б* — контрольный препарат от здорового животного (*С. С. Рыбаков и др., 1998*)

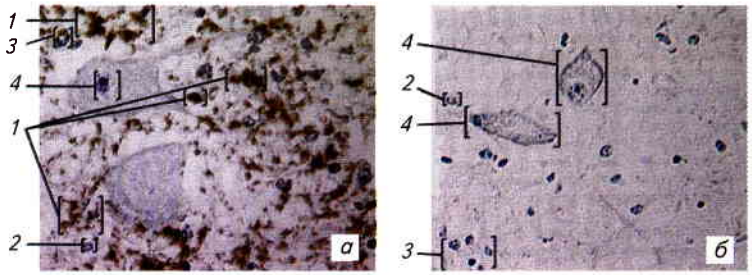


Рис. 57. Иммунно-гистохимическое исследование. Типичная локализация скоплений патогенной изоформы прионного белка PrP^{sc} в ткани продолговатого мозга животного, имевшего клинические признаки губчатой энцефалопатии. Препараты получены из области задвижки продолговатого мозга КРС в центральной научной ветеринарной лаборатории (Дублин, Ирландия):

а — участок с высокой концентрацией PrP^{sc}; *б* — участок с низкой концентрацией PrP^{sc}: *1* — скопления PrP^{sc}; *2* — ядро нейрона; *3* — ядра глиальных клеток; *4* — нейроны

В состав вирионов аденовирусов входит 86—88 % белка и 12—14 % ДНК. Основная масса белков вириона приходится на капсид, на долю сердцевины — около 20 %. Молекулярная масса вирионов 170—175 МД, плавучая плотность в CsCl 1,328—1,390 г/см^3, коэффициент седиментации около 560S.

Подразделение аденовирусов на серотипы основано на результатах реакции нейтрализации и торможения гемагглютинации (если вирус обладает гемагглютинирующей активностью).

Различные штаммы аденовирусов крупного рогатого скота обладают неодинаковой гемагглютинирующей активностью, которая зависит от вида и концентрации эритроцитов, температуры и pH среды.

По гемагглютинирующему признаку аденовирусы человека разделены на три подгруппы (A, B, C). Пока нет доказательств роли аденовирусов в возникновении опухолей у людей и домашних животных. В то же время доказано, что некоторые аденовирусы онкогенны для различных грызунов. Аденовирусы человека по онкогенным свойствам Хюбнер разделил на три группы: высокоонкогенные — A, слабоонкогенные — B и неонкогенные — C, соответственно их способности индуцировать злокачественные опухоли при инокуляции новорожденным хомякам.

В клетках аденовирусы размножаются с участием ядра клетки. Нити пентона отвечают за адсорбцию на клетку вируса, который проникает внутрь клетки путем виропексиса (эндоцитоза). После проникновения вирионы теряют пентоны с отростками и быстро достигают околоядерной зоны, где они освобождаются от капсида, и дезоксирибонуклеопротеид проникает в ядро через поры ядерной мембраны. Транскрипция и трансляция ДНК происходят в ядрах инфицированных клеток с участием клеточных полимераз. Структурные белки аденовирусов, синтезированные в цитоплазме (на рибосомах) клетки, мигрируют в ядра, где осуществляется сборка вирионов. Аденовирусы выходят из клеток в незначительном количестве. Даже при полном разрушении монослоя в культуральной жидкости находят около 10 % синтезированного вируса. В зараженных клетках наряду с полными вирионами синтезируются и дефектные частицы, ДНК которых оказалась на 3 % короче стандартной вирусной ДНК. Аденовирусы индуцируют образование внутриядерных телец-включений.

К семейству аденовирусов относятся: вирус синдрома снижения яйценоскости (ССЯ-71); вирус «болезни мраморной селезенки» фазанов; вирус геморрагического энтерита индеек.

Семейство Adenoviridae включает два рода: Mastadenovirus и Aviadenovirus.

Род *Mastadenovirus* (от греч. mastos — молочная железа). В состав рода входят аденовирусы млекопитающих: человека — 51 се-

ротип; обезьян — 27; крупного рогатого скота — 10; свиней — 5; овец — 6; коз — 1; лошадей — 2; собак — 2; мышей — 2; землеройки — 1 серотип. Прототипный вирус — аденовирус С человека.

Род *Aviadenovirus* (от лат. avis — птица). В состав рода входят аденовирусы птиц: кур — 12 серотипов; индеек — 3; уток — 2, фазанов — 1 серотип. Прототипный вирус — аденовирус 1 (CELO) кур.

2.1.1. АДЕНОВИРУСЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота (аденоинфекция) — остропротекающая болезнь, преимущественно телят. Характеризуется поражением органов дыхания, пищеварения и конъюнктивитами. У взрослых животных протекает обычно латентно.

Болезнь широко распространена во многих странах мира, в том числе и в России. Чаще болеют телята от 2-недельного до 4-месячного возраста. Более взрослые животные поражаются реже.

Характеристика возбудителя. Впервые вирус изолировал Клейн в 1959 г. (США).

Вирус относится к семейству Adenoviridae, роду Mastadenovirus. Вирионы вируса представляют собой лишенный суперкапсидной оболочки двадцатигранник кубической симметрии диаметром 70—90 нм. Каждый вирион состоит из 252 капсомеров, из которых 240 являются гексонами (капсомер в окружении шести капсомеров), 12 — пентонами (капсомер в окружении пяти капсомеров) и длинного отростка с утолщением на вершине. Геном аденовирусов содержит одну линейную молекулу двуспиральной ДНК.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирусы во внешней среде (в пределах pH 5,0—9,0) более устойчивы, чем другие вирусы: при 4 °С сохраняют активность в течение 90 дней; при 24 °С — 1—3 мес;, при 36 °С — 15—60 дней; при 50 °С — инактивируются за 30—60 мин. Устойчивы к эфиру, хлороформу, трипсину, повторному замораживанию и оттаиванию, длительно сохраняются в лиофилизированном состоянии (более 5 лет). Абсолютный этиловый спирт и формалин в конечной концентрации 0,1—0,3 % инактивируют вирусы. УФ-лучи полностью инактивируют их за 30—60 мин.

Антигенная структура. У аденовирусов различают антигены трех видов: А, В и С.

Антиген А (связан с гексонами) — группоспецифичен, при иммунизации стимулирует образование группоспецифических комплементсвязывающих, преципитирующих антител, антител, реагирующих в реакции РНГА, а также вируснейтрализующих антител против гомологичного вируса.

Антиген В (связан с пентонами) — токсический фактор, ответственный за ранний цитопатический эффект.

Антиген С (связан с нитевидными структурами вирусного капсида) — типоспецифичен, он стимулирует выработку только типоспецифических антител, выявляемых в рН и РТГА.

В культуре клеток, инфицированной онкогенными вирусами, выявляют Т (трансплантационный) антиген. Вирусы первой подгруппы содержат в геноме родоспецифическую детерминанту, общую для вирусов млекопитающих.

Антигенная вариабельность. У крупного рогатого скота установлено 10 серотипов аденовирусов. Все 10 типов аденовирусов крупного рогатого скота на основании общих комплементсвязывающего и преципитирующего антигенов, выявляемых в РСК, РДП и РИФ, делят на две подгруппы. К первой подгруппе относят серотипы 1, 2 и 3, остальные типы — ко второй подгруппе. Вирусы первой подгруппы по антигенным и биологическим свойствам ближе к аденовирусам человека.

Антигенная активность. Вирус индуцирует в организме животных образование вируснейтрализующих, комплементсвязывающих и преципитирующих антител.

Культивирование вирусов. Для культивирования аденовирусов крупного рогатого скота используют культуры клеток из тканей этих животных: почки эмбриона коровы (ПЭК), тестикулы бычка (ТБ), легкие эмбриона коровы (ЛЭК). Вирусы вызывают в клетках характерный цитопатический эффект (округление клеток и образование из них гроздевидных скоплений).

Аденовирусы крупного рогатого скота не размножаются в куриных эмбрионах и непатогенны для лабораторных животных, кроме некоторых онкогенных штаммов (3 серотипа), которые вызывают опухоли у новорожденных хомячков.

Вирусы первой подгруппы хорошо репродуцируются в культуре клеток ПЭК, ЛЭК и ТБ с образованием в них одного ядерного включения неправильной округлой формы.

Для вирусов второй подгруппы используют культуру клеток ТБ или ЛЭК, в которых они продуцируют множественные внутриядерные включения правильной округлой формы.

В последние годы для культивирования аденовирусов первой и второй подгрупп предложена перевиваемая культура клеток почки теленка Т-1 (Таурус-1).

Гемагглютинирующие свойства. Гемагглютинирующая активность установлена у аденовирусов первой подгруппы в отношении эритроцитов белых крыс и в низких титрах — эритроцитов белых мышей. Некоторые штаммы вирусов второй подгруппы приобретали гемагглютинирующие свойства после предварительной их концентрации. Более четкие результаты РГА получают при температуре 4 °С. Спектр гемагглютинирующей активности многих штаммов аденовирусов еще не изучен.

Гемадсорбирующие свойства. Не установлены.

Онкогенные свойства. Обнаружены у штамма WBR-1 для новорожденных хомячков.

Экспериментальная инфекция. Воспроизводится только на телятах 15—30-дневного возраста, лучше на безмолозивных. У животных старшего возраста болезнь протекает хронически.

Клинические признаки. Инкубационный период болезни длится 4—7 дней. Течение болезни зависит от условий кормления, содержания, возраста телят. Наиболее остро она протекает у молодняка15—20-дневного возраста, сопровождается подъемом температуры тела до 41,5 °С, слезотечением, слизистыми, затем слизисто-гнойными истечениями, кашлем, затрудненным дыханием. У телят наблюдают слабость, понос, иногда с примесью крови в фекалиях. Смертность может достигать 60 %. У животных старшего возраста болезнь часто приобретает хроническое течение. Переболевшие телята отстают в росте и долго кашляют. Таким образом, для аденовирусной инфекции характерно преобладание респираторного, конъюнктивального или кишечного синдрома.

Патологоанатомические изменения. При вскрытии обнаруживают признаки катарально-геморрагического гастроэнтерита, изменения в органах дыхания (очаговые уплотнения, ателектаз и эмфизему легких). Регионарные лимфатические узлы увеличены. В клетках легочной ткани, слизистых оболочек трахеи, бронхов, кишечника и паренхиматозных органов находят внутриядерные включения.

Локализация вируса. От клинически больных животных аденовирусы изолируют из проб с конъюнктивы, носовой полости, миндалин, из крови и фекалий, а также из паренхиматозных органов и лимфатических узлов погибших телят. Переболевшие животные длительное время остаются вирусоносителями. Характерное биологическое свойство аденовирусов — тропизм к лимфоидной ткани.

Источники инфекции. Основной источник аденовирусной инфекции — больные животные, которые выделяют вирус в окружающую среду с истечениями из носа и фекалиями, а также вирусоносители. Заражение происходит воздушно-капельным, алиментарным путем и через конъюнктиву. Передача инфекции возможна через корма, подстилку, загрязненные выделениями больных животных.

Диагностика. Диагноз ставят, основываясь на анализе эпизоотологических, клинических данных, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований. При этом решающее значение имеют лабораторные исследования, так как сходную патологию могут вызвать вирусы ПГ-3, инфекционного ринотрахеита, диареи, респираторно-синтициальной инфекции, а также хламидии и другие агенты. Поэтому поступивший материал исследуют в лаборатории параллельно на все вышеуказанные инфекции, используя диагностические наборы, выпускаемые биологической промышленностью.

Взятие и подготовка материала. В лабораторию отправляют патологический материал от больных животных, взятый в первые 2—3 дня болезни при выраженной клинической картине или от животных, убитых с диагностической целью в острой стадии заболевания.

От больных животных берут: смывы со слизистых оболочек носа, глаз и прямой кишки с помощью стерильного ватно-марлевого или поролонового тампона; кровь в первые 3 дня заболевания (не менее чем от 10 животных) и через 3 нед от тех же животных (для получения парных сывороток).

От животных, убитых с диагностической целью, берут кусочки легких, селезенки, слизистые оболочки носовой полости, трахеи, кишечника, регионарные лимфатические узлы.

Кусочки органов массой до 20 г помещают в стерильную посуду (пробирки или пенициллиновые флаконы с резиновыми пробками); ватно-марлевые тампоны (смывы) — во флаконы с раствором Хенкса или физиологическим раствором. Материал в термосе с охлаждающей смесью и сопроводительное письмо доставляют в лабораторию с нарочным.

В лаборатории флаконы с тампонами встряхивают 2—3 мин, отжимают и удаляют, а содержимое флаконов центрифугируют. Надосадочную жидкость используют для выделения вируса, из осадка клеток делают мазки для РИФ.

Из кусочков органов убитого животного готовят мазки-отпечатки для РИФ и 10%-ную суспензию вируса для его выделения.

Лабораторная диагностика. Индикация вируса. В патологическом материале ее проводят путем обнаружения вирусного антигена в серологических реакциях: РИФ, ИФА, РСК, РДП. Для этой цели в РИФ используют флуоресцирующие антитела (из диагностических наборов) к вирусам ПГ-3, ВД, ИРТ, РС, аденовирусам первой и второй подгрупп. Кроме того, для индикации аденовирусов иногда проводят обнаружение в мазках-отпечатках внутриядерных телец-включений, выявление которых имеет ориентированный характер.

Для обнаружения вирусной нуклеиновой кислоты в смывах и фекалиях используют ДНК-зонд, разрабатывают ПЦР.

Изоляция вируса. Выделение вирусов проводят в первично-трипсинизированных культурах клеток эмбрионов крупного рогатого скота (почки, легкие) и тестикул бычка. В последние годы чаще используют перевиваемые линии клеток (почки, легкие), довольно успешно выделяют вирусы на перевиваемой культуре клеток почки теленка (Т-1), а вирус диареи — на эпителии коронарных сосудов теленка (КСТ). Зараженные и контрольные культуры клеток инкубируют при 37 — 38 °С до 7—14 дней, ежедневно просматривая под микроскопом для выявления цитопатического действия. Специфические изменения в клетках, зараженных аденовирусами, начинаются с периферии монослоя,

который разрывается, клетки округляются и собираются в конгломераты, похожие на грозди винограда. Цитопатический эффект сопровождается образованием внутриядерных включений.

Изолят считают выделенным, если он вызывает стабильное, однотипичное ЦПД не менее чем в трех последовательных пассажах. В этом случае возможно его последовательное идентифицирование. При отсутствии ЦПД в трех пассажах проводят четвертый пассаж с попыткой выявления вируса в монослойной культуре клеток на покровных стеклышках методом РИФ. При отрицательной реакции выделение вирусов прекращают.

Выделение вирусов на естественно-восприимчивых лабораторных животных и на куриных эмбрионах не применяют.

Идентификация выделенного вируса. Ее проводят в серологических реакциях: РИФ, РСК, РДП, РН, РТГА. Чаще всего используют РИФ с двумя флуоресцирующими сыворотками, соответствующими двум подгруппам (первой и второй). Типирование аденовирусов осуществляют в научно-исследовательских учреждениях, имеющих типоспецифические сыворотки и вирусы 10 типов аденовирусов. Для этой цели используют РН, а если выделенный вирус обладает гемагглютинирующей активностью, ставят РТГА по общепринятым методам.

Ретроспективная диагностика. Ее проводят с целью обнаружения специфических антител в сыворотке крови переболевших животных в РНГА, ИФА, непрямой РИФ, РСК и РДП, используя парные сыворотки крови, взятые в первые 2—3 сут болезни и через 2—4 нед. Диагностическое значение имеют обнаружение 4-кратного и большего нарастания титра антител во второй сыворотке переболевшего животного и увеличение серопозитивных проб.

Дифференциальная диагностика. На основании эпизоотологических, клинических данных и патологоанатомических изменений точный диагноз на аденовирусную инфекцию поставить трудно из-за сходства ее с парагриппом-3, вирусной диареей, инфекционным ринотрахеитом, респираторно-синтициальной инфекцией, хламидиозом и другими заболеваниями, поражающими респираторно-кишечный тракт животных. Кроме того, аденовирусная инфекция очень часто протекает в ассоциации с вышеназванными заболеваниями. Поэтому только лабораторные исследования, проводимые с использованием диагностических наборов к указанным болезням, помогут правильно поставить диагноз.

Иммунитет и специфическая профилактика. Вопросы иммунитета при аденовирусной инфекции изучены недостаточно. Это, очевидно, связано с множеством типов возбудителя и латентным течением самой инфекции у взрослых животных. Установлено,

что переболевшие и вакцинированные телята приобретают иммунитет к заражению вирусом гомологического типа и вирусам, относящимся к аналогичной антигенной подгруппе. Пассивный иммунитет создают антитела молозива в пределах 2—2,5 мес. Высокой эффективностью обладают секреторные антитела слизистой оболочки респираторного тракта.

В нашей стране применяют инактивированную димерэтиленаэросил вакцину из штаммов двух подгрупп аденовирусов крупного рогатого скота, а также бивалентную вакцину, содержащую аденовирусы двух подгрупп и возбудитель пастереллеза. У вакцинированных коров титр антител в крови на достаточно высоком уровне сохранялся в течение 6 мес после отела, у вакцинированных телят — более 4,5 мес.

2.1.2. АДЕНОВИРОЗ СОБАК (CAV-2)

Аденовироз собак (АВС, инфекционный ларинготрахеит) характеризуется воспалительными явлениями в респираторном тракте. В естественных условиях болеют собаки всех возрастов. Помимо собак антитела к вирусу удавалось обнаруживать у пушных зверей, енотов, скунсов, медведей.

Характеристика возбудителя. Возбудитель аденовироза собак относится к семейству Adenoviridae и представляет собой серотип 2 аденовируса собак (CAV-2).

Клинические признаки. У больных животных наблюдается депрессия, отказ от корма, сухой кашель, фарингит, увеличение миндалин, а также истечения из глаз.

Патологоанатомические изменения. У животных с тяжелым течением болезни при вскрытии находят венозный застой крови и кровоизлияния в респираторном тракте, особенно в легких. Вирусологическими исследованиями установлен гепатотропизм возбудителя аденовироза собак, размножение его в клетках эпителия слизистой оболочки тонкого кишечника и протока поджелудочной железы.

Локализация вируса. Главным образом вирус локализуется в клетках респираторного тракта. Успешно проводилось выделение вируса из тканей гортани и легких. Удалось выделить вирус из тонкого кишечника и печени больных животных.

Источники инфекции. В основном это больные собаки, выделяющие вирус с носовой слизью, конъюнктивальными выделениями, мочой и калом. Заражение происходит при контакте здоровых животных с больными, а также аэрогенно.

Диагностика. Диагностика заболевания включает в себя изучение эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований.

Основным методом обнаружения возбудителя аденовироза собак является ИФА. Основу его составляет иммунологическая реакция взаимодействия антигена с антителом в лунках планшета. Полученный комплекс выявляют иммунопероксидазным конъюгатом, вызывающим разложение субстрат-индикаторного раствора и окрашивание содержимого лунок планшета в случае положительной реакции. Менее результативны для обнаружения вирусного антигена РИФ, РДП и РСК.

Гистологическими исследованиями выявляют ацидофильные внутриядерные включения в эпителиальных клетках бронхов и в альвеолярных клетках.

Выделение возбудителя аденовироза собак возможно в культуре клеток щенка собаки, где вирус проявляет характерное цитопатическое действие.

Аденовирусы собак CAV-2 (возбудитель аденовироза собак) и CAV-1 (возбудитель гепатита собак) могут быть идентифицированы в РН и РДП.

Серодиагностика и ретроспективная серологическая диагностика. Основаны на обнаружении в РДП специфических антител в парных сыворотках.

Иммунитет и специфическая профилактика. Специфическую профилактику аденовироза осуществляют введением животному живой лиофилизированной вакцины (Мультикан-2, -4, -6, -8) или жидких инактивированных вакцин (гексаканивак, дипентавак). Будучи введена внутримышечно, вакцина создает иммунитет сроком до 1 года. Экспресс-профилактику и лечение больных животных проводят введением либо специфической поливалентной сыворотки, либо иммуноглобулина. Их вводят подкожно или внутримышечно. Наибольший терапевтический эффект достигается при использовании препаратов в начальной стадии болезни. С лечебной целью их вводят 1—3 раза с интервалом 12—24 ч, в зависимости от тяжести патологического процесса.

В нашей стране разработана и внедрена вакцина, содержащая инактивированный штамм аденовируса собак серотипа 2. Она обеспечивает напряженный иммунитет продолжительностью до 1 года, исключает возможность выделения вируса в окружающую среду. Эта вакцина результативна для животных разных возрастных групп.

Получен аттенуированный штамм аденовируса собак типа 2, на основе которого в нашей стране получают живую вакцину. Вакцину против аденовирусных инфекций в Российской Федерации и за рубежом чаще всего ассоциируют с другими компонентами в разных сочетаниях — вирусами чумы плотоядных, парвовирусного энтерита собак, бешенства и возбудителем лептоспироза двух серогрупп.

Разработана технология получения поливалентной сыворотки и иммуноглобулина для профилактики и лечения чумы плотоядных, аденовирусных инфекций, парвовирусного и коронавирусного энтеритов.

2.1.3. ВИРУС ИНФЕКЦИОННОГО ГЕПАТИТА СОБАК

Инфекционный гепатит собак (ИГС, болезнь Рубарта, вирусный гепатит) — высококонтагиозное заболевание, характеризующееся лихорадкой, конъюнктивитом, гастроэнтеритом, воспалительными процессами в печени и желчном пузыре; иногда наблюдаются признаки нарушения деятельности ЦНС.

ИГС — одно из проявлений аденовирусной инфекции собак.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Adenoviridae, роду Mastadenovirus, виду аденовирус собак серотипа 1 (CAV-1). Вирионы CAV-1, как и все аденовирусы, представляют собой изометрические частицы кубического типа симметрии с диаметром вириона 70—90 нм. На вершинах икосаэдра имеются отростки (фиберы). Капсид вириона включает 252 капсомера без суперкапсидной оболочки. Капсид содержит 12 структурных белков. Имеется также белок сердцевины, связанный с вирионной ДНК. Нуклеиновая кислота вириона представлена двуспиральной линейной ДНК.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Сохранение инфекционной активности вируса максимально выражено при pH 6,0—9,0. Вирус весьма термолабилен — 56 °С быстро инактивирует его. При 22 °С вирус сохраняется во внешней среде до 4 мес; на шерсти переболевшего животного при 17 °С — до 1; при 0—2 °С — до 6 мес. При замораживании, высушивании и хранении в 50%-ном растворе глицерина не теряет инфекционной активности в течение 3—5 лет.

Антигенные вариабельность и активность. Возбудители ИГС (CAV-1) и аденовироза собак (CAV-2) проявляют частичную перекрестную нейтрализацию антисыворотками и различаются тропизмом в организме собак. Антигенного родства вируса ИГС с аденовирусом человека не обнаружено. Штаммы вируса ИГС, выделенные в разных регионах страны, антигенно-родственны. Штаммы вируса, выделенные от песцов и лисиц, идентичны штаммам вируса ИГС по антигенным свойствам. Вирус ИГС содержит преципитирующий, гемагглютинирующий и комплементсвязывающий антигены и индуцирует образование соответствующих антител.

Культивирование вируса. Вирус ИГС успешно культивируется в культуре клеток почки щенков собак, песцов, лисиц. Из перевиваемых культур к этому вирусу оказалась чувствительной МДСК

(почка собаки) — цитопатогенное действие достигает максимума через 48 ч и характеризуется округлением клеток и образованием конгломератов, напоминающих гроздья винограда. В клетках обнаруживаются внутриядерные тельца-включения.

Гемагглютинирующие свойства. Большинство эпизоотических штаммов вируса ИГС обладают гемагглютинирующей активностью в отношении эритроцитов морской свинки и человека.

Клинические признаки. Инкубационный период болезни составляет 3—9 дней. Течение болезни может быть сверхострым, острым, хроническим и инапарантным (бессимптомным).

Сверхострое течение. Наблюдают чаще у молодых собак. Смерть животных наступает без каких-либо клинических проявлений, за исключением иногда судорог перед гибелью.

Острое течение. Начинается угнетением, снижением аппетита при нормальной температуре. Появляется конъюнктивит, слезоточение, светобоязнь. Признаками гепатита служит рвота с примесью желчи, жажда, болезненность при пальпации в области мечевидного отростка, кал беловатого цвета, понос, моча цвета темного пива. При желтушной форме болезни слизистые и кожные покровы имеют желтоватый оттенок.

Дополнительный признак инфекционного гепатита — наличие кератита с помутнением роговицы («голубой глаз»). Появившись на второй-третий день болезни, этот признак через несколько дней исчезает. При осмотре зева видны ярко-красные увеличенные миндалины, которые мешают собаке глотать. В первые дни болезни температура тела обычно в норме, а затем повышается до 41—41,7 °С и на таком уровне держится, как правило, до гибели животного. Болезнь длится 5—8 дней, иногда 2—3 нед и 40—50 % животных выздоравливает.

Хроническое течение. Не имеет выраженных признаков болезни. Наблюдают временное снижение аппетита, исхудание, поносы, запоры, кратковременные подъемы температуры тела. Хронически больные самки часто абортируют.

У взрослых животных клинические признаки имеют более стертый характер: рвота, чередование запоров и поносов, желтушность видимых слизистых оболочек, временами судороги отдельных мышц, конечностей и шеи.

Патологоанатомические изменения. При остром течении болезни на вскрытии находят отек подкожной клетчатки, вилочковой железы и желчного пузыря. Печень увеличена, с дольчатым рисунком, темно-красная, желто-коричневая, или ярко-охренно-желтая. Селезенка и почки увеличены. Паренхима почек пронизана точечными и полосчатыми кровоизлияниями, граница между корковым и мозговым слоями сглажена. На слизистой оболочке желудка и кишечника возможны геморрагии, а на висцеральной

стороне кишечника и печени — фибринозно-геморрагические наложения.

При хроническом течении ИГС у животных отмечают истощение и дегенеративные изменения паренхиматозных органов, особенно печени, сердца, почек, иногда скелетной мускулатуры. Печень увеличена, уплотнена, с мускатным рисунком и выраженной жировой дистрофией.

Гистологическими исследованиями обнаруживают увеличение размера клеток с каплями жира в них, диффузные дистрофические изменения печеночных клеток, вплоть до некроза. При тяжелом течении болезни ткань печени малокровна, наряду с очаговыми некрозами бывают обширные некрозы с гибелью значительных участков паренхимы. В клетках печени выявляют внутриядерные тельца-включения. В головном мозге отмечают инъекцию сосудов мягкой мозговой оболочки, иногда тяжелые дистрофические изменения в нервных клетках.

Локализация вируса. Первичное размножение возбудителя ИГС происходит в клетках ретикулоэндотелиальной ткани мезенхимы и подчелюстных лимфоузлов, откуда вирус с лимфой и кровью разносится по всему организму. Вторичное размножение вируса происходит в клетках печени, почек, кишечника. Выделяется вирус с мочой, носовой слизью, конъюнктивальным отделяемым. В кале вирус обнаруживают редко. Выздоровление собак наблюдается в среднем на 10-е сутки. Из всех органов, кроме почек, вирус выделить в этот период уже не удается.

Источники инфекции. Основной источник инфекции — больные собаки, выделяющие вирус с мочой, носовой слизью, конъюнктивальным секретом и калом.

Вирус передается алиментарно, контактно, в том числе половым путем, и трансмиссивно при участии вшей и блох. Проникает в организм через слизистые оболочки.

Эпизоотии инфекционного гепатита чаще наблюдаются весной и летом при появлении молодняка. Однако как результат обострения латентного и хронического течения болезни инфекционный гепатит может встречаться в любое время года. Заболеваемость и летальность тоже значительно колеблются и зависят от состояния сопротивляемости организма и условий содержания животных.

Для вируса ИГС характерно длительное вирусоносительство. Самки-вирусоносители в течение ряда лет могут заражать своих щенков, а также самцов-производителей во время случки.

В естественных условиях к инфекционному гепатиту восприимчивы собаки всех возрастов и пород. Возбудитель ИГС вызывает также заболевание у лисиц, койотов, медведей.

Диагностика. ИГС диагностируют на основании эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных, а также

результатов лабораторных исследований. Для лабораторных исследований от больных собак в первые дни болезни берут смывы с конъюнктивы и миндалин, мочу, кал, парные сыворотки крови. От трупа в лабораторию направляют асцитную жидкость и печень.

Лабораторная диагностика. Индикация вируса. В исследуемом материале ее проводят следующими экспресс-методами: РДП, прямым и непрямым вариантами РИФ, ИФА, РСК.

В нашей стране широко используют набор для диагностики ИГС в реакции диффузионной преципитации. С помощью набора вирус обнаруживают в 10%-ной суспензии печени больных животных. Реакция проходит при температуре 37 °С в течение 48—72 ч. Специфическую гипериммунную сыворотку, полученную иммунизацией собак или от реконвалесцентов, добавляют в лунки агара дробно, через каждые 12 ч.

Гистологическими исследованиями обнаруживают внутриядерные тельца-включения в купферовских клетках печени.

Выделение вируса. Вирус ИГС выделяют в первичных или перевиваемых культурах клеток почки собаки.

Идентификация вируса. Идентифицировать выделенный вирус возможно в РН, РТГА, РСК, однако в лабораторной практике для этой цели, как правило, используется РДП с компонентами, входящими в диагностический набор.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. Они основаны на обнаружении и титровании специфических антител с помощью РДП. Эту реакцию используют не только для диагностики, но и для оценки поствакцинального иммунитета.

Обнаружением антител к вирусу ИГС с помощью РСК установлено их присутствие у 70—100 % клинически здоровых щенков. Это указывает на широкое распространение ИГС среди взрослых собак.

Иммунитет и специфическая профилактика. У переболевших собак независимо от тяжести перенесенного инфекционного процесса наступает продолжительный, практически пожизненный иммунитет. Антитела появляются на 15—21-й день болезни и количество их достигает максимума на 30-й день. Колостральный иммунитет к вирусу ИГС у щенков сохраняется до 6 нед, поэтому их впервые вакцинируют в 6 нед, а ревакцинируют в 4 мес.

2.1.4. ВИРУС СИНДРОМА СНИЖЕНИЯ ЯЙЦЕНОСКОСТИ-76

Синдром снижения яйценоскости-76 (ССЯ-76, аденовирусная болезнь птиц) — вирусная болезнь кур-несушек, характеризующаяся размягчением, отсутствием или депигментацией скорлупы яиц и сопровождающаяся значительным снижением яйценоскости.

Болезнь, получившая название «синдрома снижения яйценоскости-76», впервые описана голландскими учеными в 1976 г.

У кур, проявляющих характерные для заболевания признаки, обнаруживались антитела к аденовирусу, а в 1978 г. был выделен вирус и подтверждена его эпизоотологическая роль. Заболевания, вызываемые этим вирусом, регистрировались в Европе, Италии, Ираке, США, Японии и России.

Характеристика возбудителя. Возбудитель ССЯ-76 — ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Adenoviridae, роду Aviadenovirus, является аденовирусом уток, патогенным для кур. Как и у всех аденовирусов, вирионы ССЯ-76 представляют собой лишенные суперкапсидной оболочки изометрические частицы диаметром 70—90 нм. Белок вириона представлен 252 капсомерами, уложенными по кубическому типу симметрии и формирующими длинные отростки.

Антигенная структура. Вирус имеет группоспецифический антиген, общий для всех аденовирусов птиц, который обнаруживается в РДП, РСК. Имеется также типоспецифический антиген, присущий вирусам определенного серотипа и определяемый в РИФ. В то же время вирус ССЯ-76 не имеет антигенного родства ни с одним из вирусов 12 серотипов аденовируса кур.

Антигенная активность. Проявляется синтезом антигемагглютинирующих антител у кур через 2—3 нед после инфицирования, а также у цыплят, вылупившихся из яиц, снесенных больными курами.

Гемагглютинирующая активность. Вирус ССЯ-76 проявляет гемагглютинирующую активность с эритроцитами кур, уток и гусей.

Культивирование вируса. Оптимальной системой для культивирования вируса ССЯ-76 являются утиные эмбрионы и культуры клеток утиного происхождения. После адаптации возможно культивирование на эмбрионах кур и культуре клеток печени эмбрионов кур. Оптимальная температура культивирования этого вируса — 40 °С. В культуре клеток вирус вызывает образование внутриядерных включений и проявляет себя гемагглютинирующей активностью.

Эпизоотологические особенности. Антитела к вирусу ССЯ-76 были выявлены у 51 % обследованных уток, у 66 % гусей и у 1 % кур. Учеными высказано предположение, что вирус ССЯ-76 персистирует в организме уток без клинического проявления. Прямой передачи вируса при контакте уток с курами не установлено. Предполагается, что инфицирование куриных стад в Голландии произошло в результате широкого применения живой вакцины против болезни Марека, полученной с использованием культуры клеток утиных фибробластов.

В настоящее время антитела к вирусу ССЯ-76 обнаружены не только у домашних, но и у диких птиц. Очевидно, происходит перекрестное инфицирование дикой и домашней птицы, а выделение вируса с фекалиями делает возможным его распространение на большие расстояния.

Клинические признаки. Признаки болезни обычно проявляются на 30-й неделе, при наступлении пика яйценоскости. Очевидно, латентное течение болезни переходит в острое на фоне физиологического стресса — возрастания яйценоскости и увеличения содержания гормонов.

У кур клинические признаки, как правило, не проявляются. У 10—70 % больных птиц наблюдалась синюшность сережек и гребня, анорексия, анемия и диарея. Основной же характерный признак — снижение яйценоскости, которая восстанавливается через 4—6 нед, но первоначального уровня уже не достигает. Изменяется не только скорлупа снесенных яиц (деформирована, с кольцами на экваторе, депигментирована), но и внутреннее качество: белок становится водянистым, мутным, с беловатыми хлопьями.

Патологоанатомические изменения. Болезнь сопровождается отеками и инфильтрацией тканей матки и яйцеводов, незначительным катаральным энтеритом. При гистологическом исследовании установлена дегенерация кальцифицирующих желез, их мононуклеарная инфильтрация, лимфоидная гиперплазия в печени, селезенке и других органах. Маточные железы в состоянии атрофии, отечны, инфильтрированы. Атрофии подвержена и фабрициева сумка.

Механизмы повреждения яичной скорлупы, которые непостоянны, связывают не с гистологическими изменениями яйцеводов, а с ферментативными нарушениями в организме (цв. вкл., рис. 38).

Локализация вируса. Вирус в организме инфицированной птицы может находиться в латентном состоянии до ее половой зрелости или начала яйцекладки. В органах и тканях экспериментально зараженных цыплят он сохранялся до 5 нед. Установлена локализация вируса в клетках слизистой оболочки кишечника, трахеи, в селезенке, матке, прямой кишке. Выделение вируса больной птицей наблюдалось в течение 2 нед после заражения.

Источник инфекции. Источник инфекции — больные куры. При передаче вируса аэрогенно, алиментарно, контактно (горизонтально) для заболевания характерна его невысокая контагиозность. Проникший в организм вирус разносится с кровью и размножается в слизистой оболочке кишечника, персистирует до 12 мес в яйцеводах, печени.

Установлено, что вертикальная передача (через яйцо) существует лишь в первые дни после инфицирования. Несколько дольше, до 2 нед, вирус выделяется с фекалиями. Возможно выделение вируса с экскрементами из носа и рта. Вирусоносительство длится до 5 нед после переболевания.

Диагностика. Диагноз ставят на основании лабораторных исследований с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков и патологоанатомических изменений.

Лабораторная диагностика. Материалом для исследований служат взятые от больной птицы в первые дни болезни носоглоточные смывы, кровь, фекалии. От трупа исследуют клоаку, яйцеводы, печень, селезенку.

Обнаружение вируса в патологическом материале возможно в РИФ, биопробе на однодневных цыплятах (редко) или в культуре клеток. Причем вирус может быть обнаружен и выделен в культуре клеток после 2—3 «слепых» пассажей. ЦПД проявляется через 48—96 ч.

Идентифицируют выделенный вирус с помощью РИФ, РТГА, РН. РН применяют в сомнительных случаях. Ставят ее на утиных эмбрионах, в культуре клеток печени и почек эмбрионов уток.

Серодиагностика. Проводят ее с целью установления инфекции в стаде, для чего исследуют парные сыворотки. Парные сыворотки берут у птицы в 5—6-месячном возрасте, считая этот период началом болезни. Сыворотки исследуют в РТГА, ИФА, РНГА, РДП. Если РТГА выявляет в сыворотках антигемагглютинины в титрах 1 : 8 — 1 : 512, то это считается косвенным признаком циркуляции в хозяйстве эпизоотического штамма вируса ССЯ-76. Максимальные титры антител обнаруживают у птиц в 8-месячном возрасте.

Дифференциальная диагностика. ССЯ-76 необходимо отличать от болезни Ньюкасла, инфекционного бронхита кур, инфекционного ларинготрахеита птиц, инфекционной бурсальной болезни и микоплазмоза.

Иммунитет и специфическая профилактика. Переболевшие куры приобретают продолжительный напряженный иммунитет. Для специфической профилактики применяют главным образом инактивированные вакцины — моно-, бивалентные и комбинированные.

Показаниями к вакцинации служит определенный уровень антител в сыворотках и процент сероположительной птицы в стаде. При проведении мер специфической профилактики необходимо учитывать свойства вакцинного штамма, а также высокий уровень трансовариальных антител у цыплят, препятствующих формированию напряженного активного иммунитета.

В России и за рубежом разработаны живые, инактивированные и генно-инженерные вакцины.

2.2. СЕМЕЙСТВО ГЕРПЕСВИРУСОВ

Герпесвирусы поражают животных многих видов и человека. Вирионы герпесвирусов сферической формы включают в себя ядро (кор), капсид, тегумент и оболочку. Кор содержит геном вируса, упакованный в капсид. Матриксный капсид представляет

собой икосаэдрическую (двадцатигранную) структуру 100—110 нм в диаметре; состоит из 162 капсомеров.

Герпесвирус человека 1 как типовой вид вируса имеет протеиновую оболочку толщиной 16 нм, содержащую многочисленные выступы длиной около 8 нм; внешний диаметр вириона 125 нм. Структура тегумента слабо изучена, однако он вместе с поверхностной оболочкой, не содержащей капсид, может покидать клетку одновременно с полноценными вирионами. Оболочка представляет собой липидный бислой с различными гликопротеинами.

Геном вириона представлен двуспиральной линейной ДНК, состоит из 125 — 240 тыс. пар оснований и составляет 10 % от массы вириона.

Герпесвирус человека 1 имеет более 30 полипептидов: 6 протеинов входит в зрелый капсид, 15 — в состав тегумента и не менее 10 — в состав оболочки.

Количество открытых рамок считывания у герпесвирусов варьирует от 70 до 200 и более. У герпесвирусов млекопитающих и птиц около 40 консервативных генов, организованных в 7 блоков. Внутри блоков гены располагаются в определенном порядке с определенной полярностью.

В клетку вирион проникает путем слияния мембран оболочки вируса и клетки. Нуклеокапсид транспортируется в ядро, а тегумент предположительно ингибирует синтез клеточных протеинов и активирует вирусные гены, ответственные за синтез ранних белков. Синтез вирусной ДНК начинается с одного и более участков начала репликации. Вновь синтезированная ДНК упаковывается внутри ядра в незрелый капсид. Нуклеокапсид отпочковывается через внутреннюю ядерную мембрану в перинуклеарное пространство, а образующийся таким образом оболочечный вирион транспортируется к клеточной поверхности.

Конкретным видам герпесвирусов соответствуют определенные восприимчивые хозяева, но возможна передача вирусов от хозяина одного вида хозяину другого вида. Тяжелопротекающие инфекции встречаются в основном у молодых или иммуносупрессированных организмов, а также у плодов. Большинство герпесвирусов вызывают системные инфекции. Отличительным признаком герпесвирусов, определяющим их сохранение, является их способность к длительной латенции.

Семейство Herpesviridae делится на подсемейства Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae и Gammaherpesvirinae.

Подсемейство Alphaherpesvirinae включает в себя 4 рода.

Varicellovirus содержит 16 видов вирусов с типовым видом герпесвируса человека 3. Кроме того, в подсемейство входят вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, герпесвирус собачьих 1, вирусы инфекционного аборта лошадей, ринопневмонии лошадей, ринотрахеита кошек, болезни Ауески и герпесвирусы других млекопитающих.

Marek's disease — like viruses включает вирусы болезни Марека типов 1 и 2, а также герпесвирус индеек.

Infectious laryngotracheitis — like viruses включает всего один вид вируса — герпесвирус куриных 1 (вирус инфекционного ларинготрахеита).

Представитель *Simplexvirus* — герпесвирус человека 1. Многие члены рода инфицируют человека и приматов. Могут проявлять перекрестную реактивность в серологических реакциях с вирусами других родов подсемейства.

Подсемейство Betaherpesvirinae включает три рода.

Типовой вид *Cytomegalovirus* — герпесвирус человека 5.

Типовой вид *Roseolovirus* — герпесвирус человека 6.

Типовой вид *Muromegalovirus* — герпесвирус мышиных 1.

Все представители подсемейства имеют строгую специфичность виду и типу культур клеток.

Подсемейство Gammaherpesvirinae имеет два рода.

Типовой вид *Lymphocryptovirus* — герпесвирус человека 4. Вирусы инфицируют В-лимфоциты.

Типовой вид *Rhadinovirus* — герпесвирус человека 2. Вирусы выделены от млекопитающих многих видов. Они продуктивно инфицируют культуры клеток животных многих видов.

Все представители семейства Herpesviridae отличаются широким разнообразием, но в то же время имеют сходную морфологию.

2.2.1. ВИРУС ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота (ИРТ) — остропротекающая контагиозная болезнь, характеризующаяся главным образом поражением органов дыхания (катарально-некротические поражения дыхательного тракта), конъюнктивитами, пустулезными вульвовагинитами и абортами.

Болезнь широко распространена во многих странах мира, в том числе и в России.

Характеристика возбудителя. Вирус впервые выделен в США в 1956 г. В нашей стране болезнь была диагностирована в 1968 г., вирус выделен в 1969 г. Вирус относится к семейству Herpesviridae, к подсемейству Alphaherpesvirinae, роду Varicellovirus. Вирионы вируса округлой формы, диаметром 120—200 нм. Состоят из нуклеоида, упакованного в состоящий из 126 капсомеров капсид кубической симметрии, мембраны (тегумента), покрывающей капсид, и наружной оболочки с шипиками. Геном вируса содержит одну непрерывную линейную двуспиральную ДНК.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Неоднократное замораживание и оттаивание вируса снижает его вирулент-

ность и иммуногенность. Температура 56 °С инактивирует его через 20 мин, 22 °С — через 50 сут. Вирус быстро теряет активность в кислой среде. Ацетон, эфир, хлороформ и этиловый спирт инактивируют его немедленно. В сперме быков, хранящейся при температуре сухого льда, вирус сохраняется в течение 4—12 мес, а в жидком азоте — в течение года. Лиофилизация вируса незначительно снижает его инфекционную активность. При температуре 4 °С вирус сохраняется в течение 8 мес. При температуре минус 70 °С инфекционная активность вируса не снижается в течение 7 мес, тогда как при минус 20 °С титр снижается в 2 раза.

Антигенная структура. Изучена недостаточно. Выделено и охарактеризовано 9 структурных белков, за индукцию вируснейтрализующих антител ответственны 4 оболочечных гликопротеина. Гемагглютинирующая активность вируса связана с гликопротеином, расположенным в наружной оболочке вириона.

Антигенная вариабельность. Установлено, что резких антигенных отличий в выделенных штаммах вируса ИРТ нет. Однако отдельные штаммы могут различаться по вирулентности. Показано некоторое антигенное отличие новозеландских штаммов от американских и австралийских. Имеется сообщение об антигенном родстве изолятов герпесвируса коз с вирусом ИРТ крупного рогатого скота.

Антигенная активность. При естественном и экспериментальном заражении вирус индуцирует образование вируснейтрализующих, комплементсвязывающих и преципитирующих антител, которые выявляются в реакциях РН, РСК, РДП, РНГА.

Культивирование вируса. Вирус ИРТ легко культивируется как в первично-трипсинизированных культурах клеток: ПЭК, ЛЭК, ПТ, ТБ и других, так и в перевиваемых линиях клеток: ППЭК, ПЛЭК, ПТ-80, Таурус-1 и др. Цитопатический эффект наступает через 48—96 ч. В некоторых случаях используют и органные культуры слизистых оболочек верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, конъюнктивы и других органов.

Гемагглютинирующие свойства. В 1982 г Н. Н. Крюков с соавт. впервые сообщил, что концентрированный вирус ИРТ с титром не ниже 10^7 ТЦД50/мл гемагглютинирует эритроциты белых мышей, белых крыс, морских свинок, хомячков и человека. В дальнейшем это было подтверждено и зарубежными исследованиями.

Интерфероногенная активность. Установлена способность интактного и облученного УФ- лучами вируса ИРТ индуцировать синтез интерферона в культурах клеток различных тканей крупного рогатого скота in vitro и в организме животных. Непатогенные или аттенуированные штаммы вирусов обладают наилучшей интерфероногенной способностью.

Экспериментальная инфекция. Она лучше воспроизводится на телятах. Клиническое проявление болезни зависит от метода заражения, вирулентности вируса и возраста животных. При интра-

трахеальном, интраназальном, алиментарном и интравенозном методах заражения болезнь чаще протекает в виде ринотрахеита с конъюнктивитом. При введении вируса в половые органы появляется вульвовагинальная инфекция. Иногда при заражении полевыми штаммами вируса интраназально удавалось у телят вызвать клиническую картину менингоэнцефалита. У нетелей, зараженных в вымя, развивается некроз эпителиальных клеток альвеол и молочных протоков.

Экспериментально зараженные телята выздоравливают, как правило, через 1—2 мес. Экспериментально заражаются и козы. На кроликах удается воспроизвести латентную инфекцию ИРТ, других лабораторных животных заразить не удалось.

В естественных условиях инфекционным ринотрахеитом болеет крупный рогатый скот независимо от породы и возраста. Молодые животные более восприимчивы, и болезнь у них протекает тяжелее. Молочный скот болеет легче, чем мясной. Нет особой разницы в восприимчивости у животных разного пола. Овцы и козы могут переболевать в латентной форме. Вопрос об естественной резервации данного вируса среди диких животных еще не ясен, что представляет важную в эпизоотологическом отношении проблему. Есть сообщение о наличии антител в сыворотках крови у оленей, косуль, бегемотов, буйволов, газелей и бородавочников. В естественных условиях вирус ИРТ часто вызывает острые вспышки заболевания в ассоциации как с другими вирусами (ПГ-3, ВД, РС, аденовирусами), так и с хламидиями и пастереллами. Болезнь провоцируют стрессовые факторы.

Клинические признаки. В зависимости от локализации вируса, степени его вирулентности, возраста и физиологического состояния животного наблюдают разные формы проявления болезни: респираторную, генитальную, конъюнктивиты, энцефалиты, артриты, иногда энтериты. Заболеваемость в стаде может достигать 100 %, гибель зависит от возраста, формы болезни, условий содержания животного и составляет 2—15 %. Инкубационный период продолжается в среднем 2—7 дней.

Наиболее часто встречается респираторная форма болезни, сопровождающаяся повышением температуры тела до 42 °С, лихорадкой постоянного типа обычно в течение 3—5 дней. Животные отказываются от корма, быстро худеют, у лактирующих резко снижается удой; дыхание учащено, выражен сухой, болезненный кашель. Наблюдают гиперемию слизистой оболочки носа и конъюнктивы, затем обильные серозные, а позднее серозно-фибринозные и гнойные истечения из носа; выделение пенистой жидкости изо рта; у некоторых животных понос. Гиперемия распространяется на носовое зеркальце (красный нос). На слизистой оболочке носа могут быть очаги некроза и фибринозные наложения, после удаления которых обнаруживают язвы. При респираторной форме

болезни среди стельных коров наблюдаются аборты (чаще в последнем триместре стельности).

При генитальной форме поражаются наружные половые органы. У коров эта форма болезни известна под названием инфекционный пустулезный вульвовагинит, а у быков — баланопостит. Иногда у коров развивается эндометрит, у быков может быть экзантема в области промежности и мошонки. У стельных животных плод гибнет на 3—5-й неделе после заражения, через 2—3 дня наблюдается аборт. Иногда интервал между гибелью плода и его изгнанием может быть до 10 дней. Генитальная форма у быков и коров часто протекает субклинически и иногда остается незамеченной, поэтому представляет опасность в распространении инфекции.

Конъюнктивиты обычно сопровождают респираторную форму ИРТ. Часто болезнь осложняется вторичной бактериальной инфекцией (Moraxella bovis, микоплазмы и др.), при этом может возникнуть кератит.

Энцефалиты наблюдают редко и, как правило, у молодняка в виде нервных явлений (внезапное возбуждение, буйство, нарушение координации движения, паралич конечностей). Температура тела нормальная. Животные обычно погибают через 4—5 дней после появления первых признаков болезни.

Вирус ИРТ у телят раннего возраста нередко вызывает остропротекающее заболевание желудочно-кишечного тракта, иногда наблюдают артриты.

Патологоанатомические изменения. Зависят от формы болезни. Наиболее часто отмечают признаки воспалительных процессов в органах верхних дыхательных путей (ларингит, трахеит), скопление пенистой жидкости в трахее и бронхах, часто обнаруживают катаральную бронхопневмонию и гастроэнтерит. Регионарные лимфатические узлы отечны, гиперемированы, увеличены, на разрезе — сочные, с кровоизлияниями.

Локализация вируса. Вирус ИРТ обладает тропизмом к клеткам органов дыхания, размножения и пищеварительного тракта. От больных животных выделяется в течение первых двух недель из носовых полостей, с конъюнктивы глаз, со слюной, кровью, мочой и фекалиями, а также из влагалищных выделений и со спермой. После острого периода болезни вирус длительное время сохраняется в организме без каких-либо клинических признаков болезни животного. Данные относительно сроков вирусоносительства разноречивы. У некоторых животных оно продолжается 6—12 и даже до 19 мес. Быки-вирусоносители могут заражать коров при случке. Серонегативность при ИРТ не обязательно свидетельствует об отсутствии вирусоносительства. Вирус обычно персистирует в регионарных ганглиях.

Факторами, способствующими переходу латентной инфекции в острую, могут быть стрессы различной природы (отелы, транспортировка, резкое нарушение содержания, кормления, а в некоторых случаях неправильно проведенная вакцинация животных живой вакциной, наличие других инфекционных агентов). Всех животных, имеющих антитела к вирусу ИРТ, следует считать носителями вируса, находящегося в состоянии латенции. Вакцинация не предотвращает установление в организме вакцинированных животных латенции вирулентного вируса.

Источник инфекции. Основным источником инфекции служат больные животные и вирусоносители, особенно опасны быки-производители. Установлена возможность контактного, воздушно-капельного заражения животных, а также через инфицированную сперму, корма. В механическом разносе вируса могут участвовать люди, невосприимчивые животные, в том числе птицы и насекомые. Возможен вертикальный путь передачи вируса от матери потомству. Быстрому распространению заболевания способствует формирование сборного поголовья и скученность животных.

Диагностика. На основании эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных ставят предварительный диагноз, так как сходные признаки могут быть при других вирусных респираторных болезнях. Окончательно диагноз устанавливают лабораторными методами, при этом патологический материал параллельно исследуют на ПГ-3, ВД, РС- и аденовирусную инфекции.

Взятие и подготовка материала. Для исследования берут материал на ранней стадии болезни, при этом учитывают форму клинического проявления болезни. Берут тот материал, в котором предполагается наибольшая концентрация вируса.

При респираторной и генитальной формах обычно используют стерильные ватно-марлевые (или поролоновые) тампоны для сбора носовых, глазных и генитальных секретов в период, когда они серозные, а не слизисто-гнойные. Иногда берут и смывы с прямой кишки. Тампоны помещают в пробирки или пенициллиновые флаконы со средой или физиологическим раствором (3—5 мл) с антибиотиками (500—1000 ЕД на 1 мл среды).

При убое или гибели животных берут (не позднее чем через 1 ч после смерти) небольшие кусочки слизистых оболочек носа, гортани, трахеи, кусочки легких, региональных лимфатических узлов, селезенки, пораженных участков желудочно-кишечного тракта. От абортированных плодов исследуют кусочки печени, селезенки, легких, а также кусочки котиледонов плаценты, при нервной форме — кусочки из различных отделов головного мозга. Кровь для серологических анализов берут от 10—15 больных, причем дважды от одного и того же животного (первая проба — на 1—2-й день болезни, вторая проба — через 2—3 нед) для получения парных сывороток, в которых исследуют уровень антител. Собранный материал доставляют в лабораторию в термосе с охлаж-

дающей смесью. Пробы спермы до проведения исследования допускается хранить при температуре минус 20 °С не более 5 дней. Сперму исследуют в течение 24 ч после размораживания.

Лабораторная диагностика. Заключается она в следующем:

1) индикация вируса в патологическом материале путем: а) обнаружения вирусного антигена с помощью РИФ или ИФА; б) обнаружения вирусной нуклеиновой кислоты с помощью ДНК-зонда или ПЦР;

2) изоляция вируса из патологического материала в первичных культурах клеток (ПЭК, ТБ, ЛЭК, ПТ) или в перевиваемых линиях клеток (ППЭК, ПТ-80, Тауру-1 и др.). Методика общепринятая. Изолят считают выделенным, если он вызывает стабильный однотипный цитопатический эффект не менее чем в трех последовательных пассажах.

ЦПД вируса характеризуется образованием очагов округлившихся клеток с последующим отслоением от поверхности стекла. Выделение вируса на естественно-восприимчивых животных практически не проводят.

Лабораторные животные и куриные эмбрионы не восприимчивы к данному вирусу;

3) идентификацию выделенного вируса проводят в серологических реакциях: РН, РИФ, ИФА, реже в РТГА.

Ретроспективная диагностика. Для этой цели используют парные сыворотки крови, взятые с интервалом в 3 нед, и исследуют в серологических реакциях (РНГА, ИФА и РН) с эталонным вирусом ИРТ. Прирост титра антител во вторых пробах в 4 раза и более, а также возрастание числа серопозитивных животных гарантирует достоверный диагноз.

Дифференциальная диагностика. Исключают ящур, вирусную диарею, парагрипп-3, респираторно-синтициальную и аденовирусную инфекции, пастереллез.

Иммунитет и специфическая профилактика. Иммунитет у переболевших животных длится не менее 1,5—2 лет. Однако у реконвалесцентов, имеющих антитела, состояние абсолютной иммунности бывает редко, и их следует рассматривать как потенциальный источник инфицирования животных, так как они практически пожизненно остаются вирусоносителями, периодически выделяя вирус в окружающую среду, особенно после воздействия на них неблагоприятных стрессовых факторов.

Для профилактики ИРТ применяют живые и инактивированные вакцины, гипериммунные сыворотки и сыворотки реконвалесцентов.

В нашей стране для профилактики ИРТ применяют живую вакцину ТК-А (ВИЭВ), «Монори» и бивалентную вакцину «Бивак», содержащую два вакцинных штамма — ИРТ и ПГ-3. Кроме того, успешно используют вакцины против трех-четырех возбудителей.

Живые вакцины лучше применять в откормочных хозяйствах. Интраназальная вакцинация в связи с ранней выработкой местных (секреторных) антител и интерферона, что сокращает срок наступления невосприимчивости, более эффективна, чем подкожная или внутримышечная. Живые вакцины у стельных коров могут вызвать аборты и способствовать появлению латентной инфекции.

Инактивированные вакцины рекомендуют использовать в племенных и молочных хозяйствах. Они могут быть как в виде моно-, так и комбинированных препаратов. Продолжительность поствакцинального иммунитета 6—12 мес, наступает он через 2 нед после второй прививки. В невосприимчивости животных к ИРТ клеточный иммунитет более эффективен, чем гуморальный.

2.2.2. ВИРУС БОЛЕЗНИ АУЕСКИ

Болезнь Ауески (псевдобешенство, бешеная чесотка) — остропротекающая болезнь сельскохозяйственных животных всех видов, пушных зверей и грызунов. Для заболевания характерны признаки поражения головного и спинного мозга, сильный зуд и расчесы (у всех животных, кроме свиней).

БА впервые описана в 1813 г. в США как заболевание телят, а в 1902 г. венгерский ученый А. Ауески установил небактериальную природу возбудителя этого заболевания, определенного позже как герпесвирус. Заболевание встречается на всех континентах, протекает в форме энзоотии, и наибольший экономический ущерб приносит свиноводству и пушному звероводству.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Herpesviridae, содержит двуспиральный линейный ДНК-нуклеоид. Нуклеоид окружен икосаэдрическим капсидом диаметром 100—110 нм, содержащим 162 частично-полых капсомера. Капсид покрыт содержащей липиды оболочкой и наружной оболочкой с выступами (шипами). Диаметр вириона 150—180 нм.

В составе вириона определено до 32 белков. Установлена роль отдельных белков в вирулентности и индукции иммунного ответа.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус чувствителен к эфиру и хлороформу. Быстро (за 15—20 мин) инактивируется дезинфицирующими растворами: горячим 3%-ным раствором гидроксида натрия, 20%-ной взвесью свежегашеной извести, 1%-ным раствором формальдегида. Растворы креолина и карболовой кислоты обладают слабым вирулицидным действием. В навозной жиже летом вирус сохраняет активность в течение 1 мес, зимой — около 3 мес, в гниющих трупах — до 1 мес. Ультрафиолетовые лучи обезвреживают ВБА за 1 мин.

Антигенная активность. В оболочке вируса болезни Ауески различают 3 основных гликопротеина, на которые при инъекции

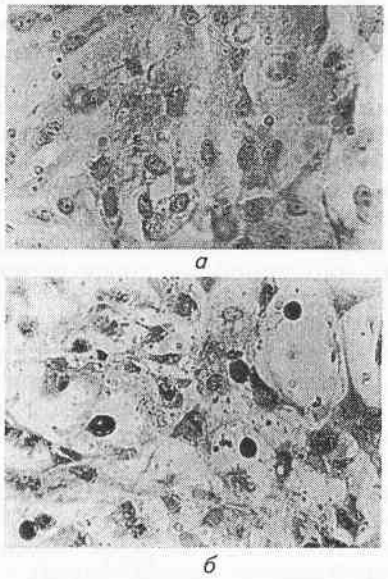
свиньям образуются антитела. Их обнаруживают в РН, РСК и РДП. Комплементсвязывающие антитела появляются в сыворотке крови через 3 дня после заражения, и титр их удерживается до 30—40 дней. Вируснейтрализующие антитела появляются на 5—7-й день, количество их достигает максимума через 3—4 нед, титр их сохраняется до 1,5 лет.

Антигенная вариабельность. Не установлена. Установлено антигенное родство вируса болезни Ауески с вирусом простого герпеса.

Гемагглютинирующие свойства. Гемагглютинин вируса сорбируется на мышиных эритроцитах при температуре 4, 22 и 37 °С.

Культивирование вируса. Вирус болезни Ауески успешно пассируется на кроликах, молодых белых мышах, в первичных культурах клеток куриных эмбрионов, почек крупного рогатого скота, свиней, перевиваемых клетках HeLa, КЭМ-Ла, L, ПЭС с образованием некротических фокусов — бляшек. Наиболее чувствительна к вирусу болезни Ауески первичная культура клеток куриных эмбрионов, в которой вирус вызывает ЦПЭ с округлением клеток, образованием гигантских клеток и телец-включений (рис. 52).

После предварительной адаптации вирус удается культивировать в куриных эмбрионах при инокуляции на ХАО. Эмбрионы



а

б

Рис. 52. Болезнь Ауески:

а — культура клеток незараженная; *б* — цитопатическое действие вируса Ауески в той же культуре клеток (гематоксилин-эозин) (*по Э. А. Преображенской*)

гибнут через 24—96 ч, на ХАО наблюдаются специфические фокусы поражения.

Клинические признаки. Инкубационный период болезни колеблется от 1,5 сут до 15—20 дней, что зависит от метода заражения, вирулентности вируса и устойчивости животного.

У свиней заболевание протекает без самого характерного признака болезни — зуда. У новорожденных поросят наблюдаются спазмы глотки, икота, слюнотечение, животные не могут сосать, лежат и погибают в течение суток после появления симптомов болезни. Иногда гибели предшествуют судороги.

Особенно тяжело болеют поросята-сосуны и отъемыши. В возрасте от 10 дней до 3 мес болезнь начинается с лихорадки (40—42 °С), угнетения, слизистого истечения из носа. Позже появляются признаки поражения ЦНС: беспокойство, манежные движения, стремление вперед, животные упираются головой в стену. Нередко возникают судороги, параличи глотки, гортани, конечностей (рис. 53, 54). Животное принимает позу сидящей собаки. В течение 3 сут погибает 70—100 % заболевших.

У свиней в возрасте 5 мес и старше болезнь Ауески протекает в течение 3—4 дней в форме доброкачественного гриппоподобного синдрома. Признаки поражения ЦНС проявляются редко. Супоросные матки могут абортировать.

У крупного рогатого скота заболевание проявляется лихорадкой и сильным зудом в области ноздрей, губ, щек и глаз. Животные трутся зудящими местами об окружающие предметы. Нарастает возбуждение, но агрессивности не наблюдается. Нередки судорожные сокращения жевательных и шейных мышц. Смерть наступает через 1—2 сут с момента появления первых признаков болезни.

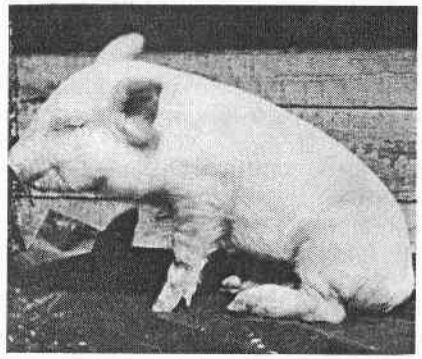


Рис. 53. Болезнь Ауески. Парез задних конечностей. Поза сидящей собаки (*по Э. А. Преображенской*)

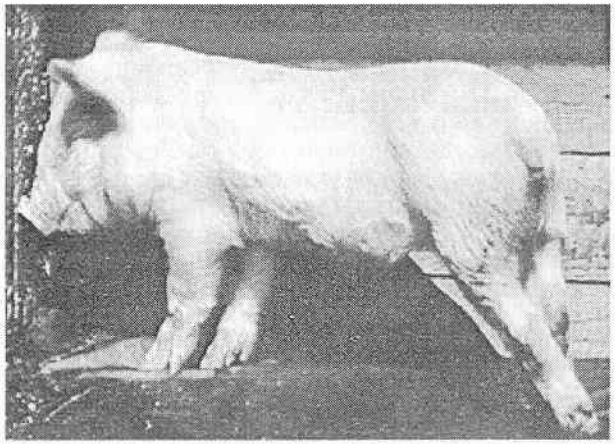


Рис. 54. Болезнь Ауески. Парез задних конечностей (*по Э. А. Преображенской*)

У овец и коз болезнь Ауески проявляется сходно с течением ее у крупного рогатого скота. При наиболее тяжелых случаях ягнята первых суток жизни гибнут.

У лошадей заболевание протекает всего 2—4 дня доброкачественно, без признаков поражения ЦНС.

У плотоядных животных (пушные звери, кошки, собаки) отмечают сильный зуд, беспокойство, извращение аппетита. Отмечается нападение на других животных, но не на людей. Гибель наступает на 2—3-й день болезни.

Патологоанатомические изменения. На трупах животных, погибших при явлениях зуда, видны расчесы и разрывы кожи. Легкие темно-вишневого цвета с пенистой кровянистой жидкостью на разрезе. Слизистая желудочно-кишечного тракта покрыта кровоизлияниями и дифтеритическими пленками. На поверхности паренхиматозных органов видны точечные кровоизлияния. Кровеносные сосуды мозга и его оболочек расширены, мозговое вещество отечно.

При вскрытии павших свиней обнаруживают крупозные дифтеритические пленки и некротические фокусы на слизистых оболочках глотки, желудочно-кишечного тракта, в паренхиматозных органах; в сердечной мышце — сильные дистрофические изменения.

Гистологические изменения характеризуются очаговым некрозом клеток в миндалинах, глотке, печени и селезенке. В головном и спинном мозге наблюдается картина негнойного менингоэнцефалита. У поросят-сосунов и отъемышей в головном и спинном мозге значительно выражены воспалительные процессы.

Локализация вируса. Локализация вируса зависит от пути проникновения его в организм, штамма, а также возраста животного. Вирус, попав в организм аэрогенным путем, первично локализуется на слизистой оболочке носа и глотки и обнаруживается здесь до двух недель. Далее он проникает через слизистые оболочки и распространяется нейролимфогенным путем. Через 48 ч достигает головной и спинной мозг, где и обнаруживается.

При проникновении вируса через кожу он активно размножается в месте внедрения в жировой, соединительной и мышечной тканях. Затем с кровью и лимфой распространяется по всему организму. Вирусемия сопровождается развитием лихорадки, сосудистыми нарушениями.

Поскольку вирус пантропен, он может размножаться и накапливаться в верхних дыхательных путях и легких, в головном мозге, селезенке, печени, почках, миндалинах, лимфоузлах и слюнных железах.

Источник инфекции. Обычно это больные животные или бессимптомные вирусоносители, что особенно часто встречается среди свиней, когда легко переболевшие взрослые свиньи становятся вирусоносителями и могут заражать как свиней, так и животных других видов. Источником инфекции могут быть боенские отходы и субпродукты, полученные от больных свиней или животных-вирусоносителей.

В естественных условиях восприимчивы все сельскохозяйственные животные, пушные звери, дикие плотоядные и грызуны. Наиболее восприимчивы свиньи. Реже болеют рогатый скот и лошади. Птицы и приматы к вирусу болезни Ауески не чувствительны.

Резервуар вируса в природе — мыши, крысы, еноты. Чувствительны к болезни собаки и кошки, которые чаще заражаются от свиней и гибнут на 2—3-й день болезни. Передача животными этих видов вируса свиньям обычно ведет к возникновению заболевания лишь на отдельных фермах.

В условиях ферм заражение животных происходит чаще респираторным путем, алиментарно, через воду и корма, загрязненные выделениями больных животных. При прямом контакте больных животных со здоровыми заражение происходит через поврежденную кожу и слизистые оболочки. Распространение вируса болезни Ауески в стаде может происходить при искусственном осеменении животных. Возможны внутриутробное заражение плода и заражение поросят-сосунов через инфицированное молоко.

Переболевшие животные, чаще взрослые свиньи, остаются вирусоносителями с переходом в латентную форму, при которой вирус может пожизненно персистировать в ЦНС, миндалинах и лимфоузлах. При стрессовых воздействиях такие животные выделяют вирус и могут быть источником инфекции.

Диагностика. Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований.

Для лабораторной диагностики от больных свиней направляют носовые секреты, плоды и плаценту от абортировавших животных. От трупов наилучшим материалом для выделения вируса являются миндалины, головной мозг, кусочки легких, селезенки, печени, лимфоузлов. От латентно инфицированных свиней вирус может быть выделен из ганглиев тройничного нерва.

Лабораторная диагностика. Индикацию вируса в патологическом материале можно проводить с помощью экспресс-методов (ПЦР, РИФ, РНГА, ИФА) и биопробой.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) как метод индикации вируса обладает 100%-ной чувствительностью и 94,2%-ной специфичностью. РИФ дает возможность видеть при малом увеличении широкие полоски флуоресцирующих нейронов коры головного мозга с отдельными флуоресцирующими клетками. В РНГА при использовании эритроцитарного иммуноглобулинового диагностикума обнаруживают вирусный антиген. ИФА прямым иммунопероксидазным методом обнаруживает антиген вируса болезни Ауески в мазках-отпечатках из мозга и слизистой оболочки гортани.

Активный вирус в патологическом материале можно обнаружить путем биопробы на лабораторных животных и в культуре клеток. Из лабораторных животных наиболее чувствительны к вирусу кролики массой 2—2,5 кг, которым внутримышечно или подкожно вводят по 1 мл 10%-ной суспензии исследуемого материала. Биопробу считают положительной, если кролики погибают с признаками болезни Ауески (нервная форма, зуд, расчесы) через 2—10 дней после заражения. Если кролики погибают без признаков болезни, биопробу повторяют, используя патологический материал второго пассажа. Гибель кроликов при биопробе без признаков зуда и расчесов может свидетельствовать о выделении вакцинных штаммов вируса болезни Ауески.

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

Биопроба в первично-трипсинизированных культурах клеток (почек и щитовидной железы свиней, семенников телят, фибробластов КЭ), перевиваемых культурах клеток (РК-15, ВНК-21) эффективна даже при диагностике атипичного течения болезни, при которой биопроба на кроликах может дать отрицательный результат.

Идентификацию выделенного вируса осуществляют РН в той же живой системе, на которой был выделен вирус. Могут быть использованы более быстрые методы идентификации: РНГА, РИФ, РДП, ИФА.

Ретроспективная диагностика. Определяют титры антител в парных сыворотках с помощью РН в культуре клеток. В сыворотках переболевших свиней их иногда удается обнаружить в течение 4,5 лет. Для обнаружения и титрования антител, кроме РН, применяют РНГА, РДП, РСК, ИФА, РЛА (реакцию латексагглютинации).

Аллергическая проба позволяет в короткий срок ставить диагноз непосредственно в хозяйствах. Чувствительность реакции достаточно высокая: 72 % переболевших животных реагируют положительно.

Дифференциальная диагностика. Болезнь Ауески у свиней следует дифференцировать от болезни Тешена, чумы, бешенства, гриппа, сальмонеллеза, отечной болезни, пастереллеза, стрептококкоза, гипогликемии, солевого отравления, аскаридоза, авитаминоза.

Иммунитет и специфическая профилактика. Гуморальный и клеточный иммунитет проявляется на 8—10-й день после инфицирования или вакцинации, достигает пика через 30 дней и сохраняется 5—6 мес.

У поросят, родившихся от иммунных свиноматок, выраженный колостральный иммунитет продолжается, как правило, не менее трех недель после рождения. Активная иммунизация свиноматок за две недели до опороса способствует защите подсосных поросят от заражения.

Для специфической профилактики болезни Ауески у животных многих видов в нашей стране применяют живые вакцины (ВГНКИ, штаммы БУК 628 и УНИИЭВ-18) и инактивированную культуральную вакцину. Живые вакцины, в отличие от инактивированных, обеспечивают напряженный клеточный и относительно слабый гумморальный иммунитет. С учетом этого строится стратегия специфической профилактики.

2.2.3. ВИРУС РИНОПНЕВМОНИИ ЛОШАДЕЙ

Риноппевмония лошадей (РПЛ, вирусный аборт кобыл, ринотрахеит лошадей) — остропротекающая контагиозная болезнь, характеризующаяся острым респираторным заболеванием жеребят и абортами у кобыл во второй половине жеребости.

Болезнь впервые описана в США, позже в странах Европы, СНГ.

Характеристика возбудителя. Возбудитель РПЛ впервые выделили Димок и Эдвардс в 1933 г. Он отнесен к семейству Herpesviridae герпесвирусу первого типа, который имеет два подтипа. Вирус РПЛ первого подтипа выделяли из абортированных плодов и новорожденных жеребят, а второго подтипа — при респираторном заболевании животных. Подтипы различаются между собой по способности репродуцироваться в различных культурах

клеток (эмбриона кошки, морской свинки, почки кролика и теленка), выделяться из носоглотки, вызывать аборты у жеребых кобыл.

Вирионы вируса РПЛ, как и другие герпесвирусы, сферической формы, состоят из сердцевины, капсида, мембраны, покрывающей капсид, и оболочки. Диаметр вириона около 100 нм, а сердцевины 60 нм. Сердцевина вириона окружена икосаэдрическим капсидом, содержащим 162 капсомера.

Геном вируса РПЛ представлен непрерывной линейной двуспиральной молекулой ДНК. Встречаются вирионы вируса РПЛ с оболочкой, которые содержат 20 полипептидов, и без оболочки — с 14 полипептидами. Полные вирионы содержат также липопротеид и гликопротеин.

Установлена роль дефектных вирионов герпесвируса лошадей типа онкогенной трансформации и персистентной инфекции.

В естественных условиях РПЛ болеют лошади всех возрастов и пород независимо от пола, а также ослы, мулы и пони.

Экспериментальная инфекция может быть получена на молодых жеребятах, жеребых кобылах, беременных крольчихах и морских свинках. Заражением новорожденных хомячков, котят, мышей воспроизводится картина энцефаломиелита.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус сохраняет инфекционность в диапазоне pH от 4 до 10. В инфицированной ткани, замороженной при минус 18—20 °С, сохраняет активность до 2 лет. В солевых растворах он активен при 4 °С до 2 нед только при условии добавления до 20 % нормальной сыворотки лошади. Вирус чувствителен к эфиру и хлороформу.

Антигенная активность. У переболевших животных обнаруживают комплементсвязывающие и вируснейтрализующие антитела.

Культивирование вируса. Вирус РПЛ можно культивировать на мышатах-сосунах, хомячках, куриных эмбрионах, предварительно адаптировав его к этим системам выращивания. Из культур клеток наиболее чувствительны к вирусу клетки почки лошади, хотя его можно культивировать и на клетках почки животных других видов. В этих культурах на 3—5-е сут после заражения вирус проявляет ЦПД с очагами округлых клеток и последующим разрушением всего клеточного пласта. В заряженных клетках обнаруживают ацидофильные внутриядерные включения.

Гемагглютинирующие свойства. Вирус агглютинирует эритроциты лошади и морской свинки при 4 и 37 °С. Гемагглютинин нейтрализуется гипериммунными сыворотками крови кроликов, но не сыворотками лошадей-реконвалесцентов. В инфицированной культуре клеток с выраженным ЦПД наблюдается, хоть и непостоянно, очаговая гемадсорбция с эритроцитами лошади.

Клинические признаки. Инкубационный период болезни составляет 3—4 нед. Респираторная форма болезни встречается чаще

у жеребят в возрасте 6—9 мес и, как правило, осенью и в начале зимы. Она характеризуется подъемом температуры тела, анорексией, конъюктивитом, ринитом и ринофарингитом. Наблюдаются истечения из носа, увеличение подчелюстных лимфоузлов. Легкие поражаются редко и через две недели животное выздоравливает. В случае осложнения болезни за счет бактериальной инфекции у животного развивается перипневмония, что нередко заканчивается гибелью.

Жеребые кобылы одновременно с респираторной формой или без нее абортируют на 8—10-м мес жеребости. Абортируют до 90 % больных животных. После аборта общее состояние кобыл быстро нормализуется. В последующие годы у таких животных, за редким исключением, аборты не наблюдаются. Иногда бывают осложнения в виде параличей, заканчивающиеся гибелью.

Патологоанатомические изменения. Слизистые оболочки плода, особенно конъюнктива, желтушны. У абортированных плодов или павших новорожденных жеребят наблюдают признаки острого и хронического гепатита, являющегося причиной гибели. В печени находят очажки некроза. В грудной полости обнаруживают серозно-геморрагическую жидкость, выпот фибрина, отек легких. В мышцах, под капсулой селезенки и печени, на плевре, брюшине перикарде и эпикарде видны точечные кровоизлияния.

Гистологическими исследованиями в пораженных органах по периферии очагов некроза обнаруживают внутриядерные включения типа А Коудри.

У абортировавших кобыл вирус вызывает рассеянный менингоэнцефалит, характеризующийся некротизирующим васкулитом, очаговыми размягчениями в головном и спинном мозге. В околопозвоночных ганглиях обнаруживают скопление лимфоцитов и нейтрофилов, т. е. клеток воспаления.

Локализация вируса. Вирус РПЛ обладает тропизмом к эпителиальной и эндотелиальной тканям. Чаще всего он проникает в организм через органы дыхания, размножается и накапливается в слизистых оболочках конъюнктивы и дыхательных путей. Распространяясь по организму, вирус РПЛ поражает также клетки матки, плода, околоплодных оболочек, накапливаясь в них, вызывая патологию, приводящую к аборту. Аборт наступает через 1—4 мес после респираторной формы болезни.

Выделение вируса переболевшими животными происходит с истечениями из носа и половых органов в течение 2 мес.

Источник инфекции. Источник инфекции — больное животное, выделяющее вирус через дыхательные пути и с абортированным плодом. Вирус передается преимущественно аэрогенным путем. Факторами передачи инфекции служат загрязненные вирусом корма, вода, подстилка, инвентарь. Вирус может передаваться также половым путем. Распространять вирус в соседние хозяйства могут собаки, лисицы и птицы с кусками абортированных плодов.

Диагностика. Диагноз на РПЛ ставят на основе анализа эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований. Для лабораторной диагностики от больных жеребят берут смывы со слизистой оболочки носовой полости и парные сыворотки крови. От абортировавших кобыл получать парные сыворотки нецелесообразно, так как аборту предшествует длительный инкубационный период (до 3 мес), и к моменту аборта титры антител уже существенно снижены.

От абортированных плодов или павших новорожденных жеребят берут для исследований кусочки легких, печени, тимуса. От взрослых лошадей в случае параличей и гибели берут кусочки спинного и головного мозга.

Лабораторная диагностика. Гистологическими исследованиями мазков-отпечатков и гистологических срезов ткани печени абортированных плодов обнаруживают некротические фокусы и эозинофильные внутриклеточные тельца-включения.

Вирусный геном обнаруживают с помощью ПЦР. Вирусные белки (антигены) выявляют в РИФ, устанавливая ярко-зеленое свечение в перинуклеарной зоне зараженных клеток, а также с помощью ИФА и РСК.

Активный вирус РПЛ выявляют биопробой на беременных морских свинках (они абортируют и погибают) или на хомячках, которые после интрацеребрального заражения погибают с признаками энцефаломиелита, а после внутрибрюшинного заражения — гепатита. Биопроба на куриных эмбрионах требует адаптации вируса к этой биосистеме. Возможна биопроба на культуре клеток.

Наиболее чувствительный объект для биопробы — естественно-чувствительные животные: жеребята и кобылы на 7—10-м мес жеребости. Но такая биопроба ставится редко.

Выделение вируса осуществляют заражением чувствительных к РПЛ живых систем.

Идентифицируют выделенный вирус с помощью ПЦР и серологических реакций: ИФА, РИФ, РТГАд, РН. В перечисленных реакциях идентифицируют вирус, выделенный в культуре клеток. Кроме того, идентификация возможна в РДП и РТГА. В РТГА используют свежеприготовленные и формалинизированные эритроциты лошади.

Ретроспективная диагностика. Для ретроспективной диагностики по парным сывороткам используют РН и РСК. У переболевших жеребят комплементсвязывающие антитела сохраняются до 4 мес, а вируснейтрализующие антитела — до 1 года. Для титрования антител могут быть использованы также РТГА с 0,2%-ной взвесью эритроцитов лошади и ИФА. Ценность массовых серологических исследований не только диагностическая, но и в том, что они позволяют получить данные о степени инфицирования этой популяции лошадей.

Дифференциальная диагностика. РПЛ следует дифференцировать у кобыл от аборта паратифозной природы, а также от аборта, вызываемого вирусом артериита лошадей. Клиническое проявление РПЛ у жеребят сходно с признаками при аденовирусной инфекции и гриппе. Дифференцируют эти заболевания лабораторными исследованиями.

Иммунитет и специфическая профилактика. Иммунитет у переболевших РПЛ животных краткосрочный: в случае респираторной формы болезни — до 4 мес, а при абортивной форме — несколько продолжительнее.

Для профилактики РПЛ применяют живые и инактивированные вакцины. В нашей стране используют живую вакцину из штамма RAC-H, полученного адаптацией вируса к сирийским хомячкам, а затем длительно (360 раз) пассированным в первичной культуре клеток почки телят. Вакцинацию жеребых кобыл проводят двукратно на третьем и шестом месяцах жеребости.

Используют моновалентные или бивалентные (с герпесвирусом лошадей серотипа 4) живые вакцины, которые создают иммунитет до 1 года.

Инактивированные вакцины, введенные 2—3 раза жеребым кобылам, обеспечивают высокий уровень поствакцинальных антител у кобыл сроком до 6 мес и обеспечивают защиту жеребят от заражения.

Гипериммунная сыворотка не всегда эффективна, так как респираторные заболевания у жеребят вызывают большое количество возбудителей бактериальной и вирусной природы.

2.2.4. ВИРУС ИНФЕКЦИОННОГО ЛАРИНГОТРАХЕИТА ПТИЦ

Инфекционный ларинготрахеит (ИЛТ) — высококонтагиозное заболевание кур, протекающее с симптомами кашля, удушья и часто конъюнктивита. В естественных условиях к инфекционному ларинготрахеиту восприимчивы еще и фазаны, а экспериментальными исследованиями доказана чувствительность индеек всех возрастов, гусят и голубей. Вирус ИЛТ кур удавалось выделять от галок, воробьев и крыс, обитающих на территории неблагополучных по этому заболеванию птицеводческих хозяйств. Следовательно, птицы и грызуны этих видов играют определенную роль в эпизоотологии данной болезни.

Заболевание широко распространено во всем мире и особенно там, где развито промышленное птицеводство. Экономический ущерб от заболевания складывается из гибели птицы (15—60 %), снижения продуктивности, расходов на проведение специфической и неспецифической профилактик.

Характеристика возбудителя. Возбудитель инфекционного ларинготрахеита — ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Herpesviridae. Имеет форму икосаэдра, состоящего из 162 капсомеров и имеющего суперкапсидную оболочку. Размер вирионов достигает 200 нм.

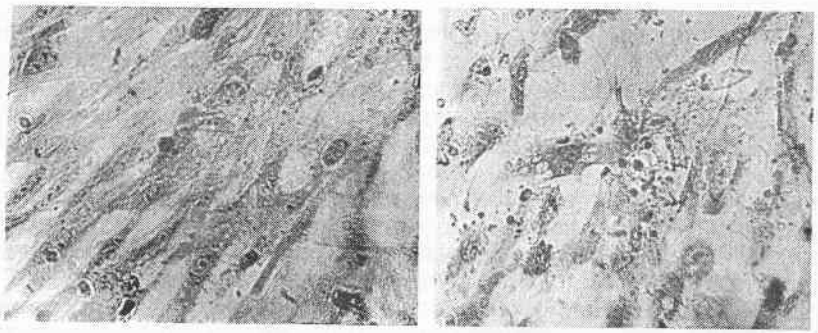
Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус малоустойчив к физическим и химическим воздействиям: быстро инактивируется дезинфицирующими растворами, но до 24 ч сохраняется в воде, до 9 дней — на предметах во внешней среде, что необходимо учитывать при организации мероприятий по ликвидации заболевания в хозяйствах.

Антигенная вариабельность. У вируса ИЛТ она не установлена, но отдельные штаммы различаются по вирулентности, тропизму и способности нейтрализоваться антителами.

Антигенная активность. Проявляется способность вируса вызывать образование преципитирующих и вируснейтрализирующих антител, максимальное количество которых обнаруживается через 30 дней после заражения. В организме они сохраняются 1—2 года. О наличии у вируса гемагглютинирующих свойств имеются разноречивые сообщения.

Культивирование вируса. Вирус ИЛТ с успехом культивируют с образованием крупно- и мелкоузелковых очагов некроза на куриных эмбрионах при заражении их на ХАО. ЦПД наблюдается в культурах клеток куриных фибробластов, почек цыплят, утят, эмбрионов свиней, крольчат (рис. 55). В зараженных клетках образуются внутриядерные включения, а иногда возникают гигантские клетки.

Клинические признаки. Инкубационный период болезни в зависимости от вирулентности возбудителя, его дозы и физиологического состояния птицы составляет 2—30 дней. Течение болезни



а *б*

Рис. 55. Инфекционный ларинготрахеит птиц (*по Э. А. Преображенской*):

а — первичная незараженная культура клеток куриного эмбриона; *б* — цитопатическое действие вируса инфекционного ларинготрахеита в этой культуре клеток

может быть острым, подострым и хроническим. В различных возрастных группах цыплят инфекционный ларинготрахеит протекает в разных формах. Конъюнктивальная форма наблюдается у 1—4-месячных цыплят и проявляется катаральным или фибринозным воспалением конъюнктивы, под третьим веком скапливаются казеозные массы, изменяется форма глаза. Гибель цыплят незначительна. Ларинготрахеальную форму болезни встречают чаще у 4—6-месячных цыплят. Она протекает остро и сопровождается кашлем, хрипами, в тяжелых случаях птица гибнет от асфиксии.

Патологоанатомические изменения. Они чаще наблюдаются в трахее. (цв. вкл., рис. 39). Гиперемия и кровоизлияния на слизистой, желтоватые наложения как признак фибринозного воспаления на ней суживают просвет трахеи и образуют казеозные пробки. Фибринозные воспаления могут быть обнаружены также на слизистой оболочке носа, в фабрициевой сумке, реже в кишечнике.

Гистологические изменения соответствуют картине вскрытия. В гортани и трахее находят серозно-катаральное или фибринозно-геморрагическое воспаление слизистой оболочки. В начале болезни выявляют гиперемию сосудов, дистрофию покровного эпителия и отек слизистой, в более поздние сроки — некроз и десквамацию респираторного эпителия, инфильтрацию слизистой и периваскулярные кровоизлияния. Вирус размножается в эпителиальных клетках слизистой гортани, трахеи, конъюнктивы, легких, воздухоносных мешков, клоаки. Наряду с воспалительной реакцией образует внутриядерные включения. Их обнаруживают до наступления некроза эпителия — между 1—5-м днями после заражения. Форма их округлая, овальная или продолговатая, количество в ядре 1—4, окружены светлым ободком. В гистиоцитах и лимфоцитах тимуса, селезенки и в фабрициевой сумке также обнаружены одиночные, крупные внутриядерные тельца-включения.

Локализация вируса. Вирус локализуется в дыхательных путях, в меньшей степени в печени и селезенке. У птиц-реконвалесцентов установлено длительное вирусоносительство. Из трахеи переболевших птиц вирус выделяли в течение 2 лет. После острой фазы ИЛТ может наступить латентный период с персистенцией вируса в организме птицы. При каких-то неблагоприятных для организма воздействиях возможна реактивация инфекции с выделением вируса во внешнюю среду.

Источники инфекции. Источник болезни — больная и переболевшая птица, которая длительное время (более 2 лет) остается вирусоносителем. Вирус передается аэрогенно, алиментарно, контактно и на скорлупе яиц. После размножения его в клетках эпителия соответствующих слизистых оболочек и наслоения бактериальной инфекции вирус с током крови попадает во внутренние органы, вызывая воспаление. Чаще это происходит в кишечнике, откуда вирус выделяется во внешнюю среду с отделяемым слизистых и с калом.

Благоприятным фактором в плане искоренения инфекции в хозяйствах являются высокая степень видоспецифичности вируса, генетическая стабильность его, отсутствие размножения в трахее при наличии местного специфического иммунитета, а также исключение тесного контакта кур.

В естественных условиях вирус поражает кур всех видов. Фазаны и индейки также чувствительны к вирусу ИЛТ. Наиболее чувствительны к заражению ИЛТ цыплята 1—6-месячного возраста, взрослая птица болеет редко.

Диагностика. Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков заболевания, патологоанатомических изменений и лабораторных исследований. Часто болезнь протекает атипично, и тогда решающее значение в диагностике приобретают лабораторные методы исследований.

Лабораторная диагностика. Для исследования направляют 4—5 больных кур на 2—7-й день болезни (или трупов). Материалом для исследования служат полученные от них слизистые оболочки трахеи, гортани, конъюнктивы и носовых ходов.

Индикацию вируса в патологическом материале осуществляют с помощью РИФ, чаще прямого метода. Также в период острого течения болезни в эпителиальных клетках слизистой оболочки при использовании краски Гимза могут быть обнаружены специфические тельца-включения — красные внутриядерные образования.

Индикация вируса ИЛТ возможна с помощью биопробы на цыплятах 1—3-месячного возраста путем аппликации вируссодержащего материала на скарифицированную оболочку гортани и клоаки. Положительная реакция на заражение проявляется на 6—12-й день в виде катарального, геморрагического или фибринозного воспаления.

Выделение вируса проводят на куриных эмбрионах 9—10-дневного возраста при заражении на ХАО и на культурах клеток; характерные изменения появляются на 3—4-й день.

Идентификацию выделенного вируса проводят в РН на куриных эмбрионах или в культуре клеток. Для этой же цели могут быть использованы ИФА, РИФ и РДП. Наиболее результативен ИФА с моноклональными антителами.

Ретроспективная диагностика. В нетипичных случаях, особенно при хроническом течении болезни, необходима диагностика установлением роста титра антител при исследовании парных сывороток. Пробы сывороток от 5—10 птиц получают дважды — на 14-й и 28-й дни болезни. Повышение титра антител к вирусу и числа положительно реагирующих птиц в стаде свидетельствует о наличии и распространении инфекции в хозяйстве.

Для выявления специфических антител к вирусу ИЛТ в сыворотках крови переболевших или вакцинированных птиц может быть использована РН на куриных эмбрионах или в культуре клеток. РН выявляет специфические антитела у 96—98 % инфицированных птиц. Разработанный в последние годы твердофазный ИФА обеспечивает бóльшую, чем в РН чувствительность и быстрое получение результатов.

Иммунитет и специфическая профилактика. Заболевание сопровождается длительным или пожизненным вирусоносительством.

При ИЛТ установлено важное значение клеточного иммунитета, что подтверждается наступлением поствакцинального иммунитета раньше, чем появляются гуморальные антитела.

Для специфической профилактики в нашей стране используют живые вирусвакцины из штаммов ЦНИИПП, ВНИИБП и ЦНИИПП клон НТ. Вакцины вводят клоачным или аэрозольным методом. Однако вакцинация аэрозолем, содержащим вакцины вируса, при наличии в хозяйстве микоплазменной инфекции может давать осложнения. Кроме того, применение вирусвакцин сопровождается длительным носительством вакцинного вируса, что может быть причиной возникновения латентной формы инфекции. Латентная инфекция при различных стрессовых состояниях может перейти в острую и обусловить вспышку заболевания в хозяйстве.

2.2.5. ВИРУС БОЛЕЗНИ МАРЕКА

Болезнь Марека (нейролимфоматоз, паралич птиц) — высококонтагиозная вирусная болезнь кур и индеек, проявляющаяся в двух формах: классической (поражение периферической и ЦНС) и острой (лимфоидный лейкоз). Наиболее восприимчивы куры и особенно, цыплята в первые 2 нед жизни. Но болеют также индейки, фазаны, утки, гуси, лебеди.

Болезнь Марека распространена по всему миру, но в основном в районах промышленного птицеводства.

Характеристика возбудителя. Вирус болезни Марека относится к семейству Herpesviridae, ДНК-содержащий, имеет капсид в форме икосаэдра, состоящего из 162 капсомеров, мембрану и суперкапсидную оболочку. Диаметр вириона 85—170 нм. В организме птиц находится в двух формах: клеточно-связанной и свободной от интеграции с клеточными структурами. Созревшие с суперкапсидной оболочкой вирионы, способные к заражению, находят только в эпителиальных клетках перьевых фолликул.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Устойчивость как клеточно-связанной, так и свободной формы вируса различна. Так, клеточно-связанный вирус, содержащийся в крови, в опухолевом материале сохраняет активность только при условии структурной целостности клеток, что обеспечивается хранением материала при минус 196 °С, свободный же вирус с чешуйками эпителия перьевых фолликул в помете, в воздухе птичника патогенен до 12 мес.

Антигенная вариабельность. У вируса болезни Марека она совпадает с его серологической классификацией. Серотип 1 включает все онкогенные вирусы и аттенуированные варианты, серотип 2 — все неонкогенные вирусы, серотип 3 — антигенно-родственный вирусу болезни Марека вирус герпеса индеек.

Изучением патогенности установлено, что птицы, зараженные одним штаммом вируса, были устойчиво защищены от заражения другим штаммом. Кроме того, у одной и той же птицы состояния виремии и невиремии чередовались.

Онкогенные свойства проявляются не у всех штаммов вируса. Считают, что вирус болезни Марека трансформирует только Т-лимфоциты. Онкогенные варианты вируса, по-видимому, кодируют характерные для них антигенные детерминанты, отсутствующие у неонкогенных вариантов.

Транскрибированная вирусспецифическая РНК в разных клетках кодируется одним и тем же фрагментом РНК.

Антигенная активность. Ее изучали у больной птицы в эпителии перьевых фолликул. Исследование экстракта из перьевых фолликул в РДП может служить простым тестом для обнаружения онкогенной инфекции цыплят. В то же время обнаружение иммунофлуоресцирующих и преципитирующих антигенов в очинах перьев представляет собой надежный метод лабораторной диагностики.

Гемагглютинирующие и гемадсорбирующие свойства. Не установлены.

Экспериментальная инфекция. Болезнь Марека была успешно и неоднократно воспроизведена лишь в начале 1960-х годов. Оказалось, что кровь или опухолевый материал, содержащий живые интактные клетки, могут передавать заболевание чувствительным 1-дневным цыплятам. Чувствительность к экспериментальному заражению выше у цыплят суточного возраста, чем у 2-, 3- и 10-недельных. Все цыплята, зараженные в суточном возрасте, как правило, погибают, в то время как гибель 2-, 3- и 10-недельных цыплят составляет соответственно 60, 30 и 10 %.

Культивирование. Его осуществляют в организме 1-дневных цыплят и в куриных эмбрионах 4- и 10—12-дневного возраста при заражении на ХАО и в желточный мешок. Заражение куриных эмбрионов в желточный мешок ведет к образованию характерных бляшек на ХАО. Кроме того, вирус хорошо репродуцируется в культуре фибробластов и почечных клеток куриных и утиных эмбрионов. В культурах клеток вирус образует характерные бляшки.

Клинические признаки. Инкубационный период болезни длится от 3 нед до нескольких месяцев. Смертность колеблется от единичных случаев до 80 %. При классической форме поражается до 10 % птиц, а при острой — 20—30 %.

Классическое течение болезни Марека обычно проявляется хромотой, парезами, параличами конечностей, крыльев, шеи, хвоста и зоба. Больная птица погибает в 3—5-месячном возрасте от дегидратации и истощения, что считают следствием отека мозга. Болезнь протекает остро и хронически.

Острое течение болезни Марека проявляется внезапно, характеризуется массовыми «транзитными» параличами — в течение 5—7 дней переболевают почти все цыплята 1—2-месячного возраста. Через 2—6 нед падеж сильно увеличивается в результате поражения внутренних органов лимфоидными опухолями. Лимфомы поражают паренхиматозные органы, фабрициеву сумку, тимус, мышцы, кожу. Болезнь длится около 30 дней и имеет неспецифические проявления: угнетение, анемия, кашель, расстройство пищеварения.

При хроническом течении наблюдают окулярную форму болезни, так называемый «глазной лейкоз». При этом в процесс вовлекается радужная оболочка глаза, которая становится бледной («сероглазие»), зрачок не реагирует на свет. При некоторых вспышках преобладают поражения кожи, называемые кожным лейкозом (цв. вкл., рис. 40).

Есть предположение, что классическое и острое течения вызывают две разновидности вируса болезни Марека, локализация которых в организме различна.

Патологоанатомические изменения. Вирус болезни Марека вызывает лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся клеточной инфильтрацией нервной системы, а также опухолями в паренхиматозных органах. Изменения в ЦНС определяются как негнойный диффузный энцефалит. Наблюдаются односторонние поражения белого вещества спинного мозга. Нервные волокна отечны, исчезает полосатость, они становятся сероватыми.

При классическом течении болезни в головном и спинном мозге отмечают периваскулярные и перицеллюлярные отеки, пикноз нервных клеток, пролиферацию глиальных и лимфоидных элементов. Часто в процесс вовлекаются яичники и семенники, где устанавливают образование лимфом из лимфоцитов, гистиоцитов и плазматических клеток.

В случае острого течения болезни неопластический процесс характеризуется образованием лимфом в тканях и органах. Лимфомы могут поражать гонады, печень, легкие, мышцы, кожу, селезенку, почки, фабрициеву сумку, тимус. Опухоли могут быть в виде фокусов, ограниченные или диффузные. Пораженный орган увеличен и бледен, так как инфильтрируется лимфоидной опухолевой тканью. Гонады, печень, селезенка, почки увеличены, с гладкой или бугристой поверхностью, усеяны диффузными или очаговыми узелками светло-серого цвета.

Иммуноморфологическим методом установлено, что при остропротекающей болезни Марека лимфомы состоят преимущественно из популяций Т-лимфоцитов.

Патологоанатомические изменения при болезни Марека иногда носят отчетливо выраженный воспалительный характер.

Локализация вируса. Вирус передается от больных птиц и вирусоносителей аэрогенно, прямым и непрямым контактом, трансовариально (на скорлупе) и даже трансмиссивно жуком чернотелкой. Через слизистые оболочки вирус проникает в кровь и, адсорбируясь на лейкоцитах, разносится по организму. Размножается в клетках с образованием опухолевых очагов в лимфоидных органах, эпителии почечных канальцев и перьевых фолликул. Возбудитель прорывает гемоэнцефалический барьер, поражает головной и спинной мозг со стволами и сплетениями. Строма нервов прорастает соединительной тканью; нерв утолщается (цв. вкл., рис. 41), нарушается нервная трофика, обменные процессы, наступают истощение и гибель.

От больной птицы вирус выделяется с десквамированным эпителием кожно-перьевых фолликулов, с секретом респираторного тракта, с калом. Переболевшая птица пожизненно остается вирусоносителем и вирусовыделителем.

Источник и пути передачи инфекции. Главный источник болезни — больная птица, которая выделяет вирус через дыхательный и пищеварительный тракты, с шелушащимся эпителием перьевых фолликул и перхотью (клеточно-свободный вирус). Входные ворота — респираторные пути.

Сохранение вируса в окружающей среде и его передача аэрогенным путем — причина высокой контагиозности заболевания. Инфекционный вирус передается по воздуху с первой недели жизни цыпленка-донора и продолжается в течение 3 нед пребывания в контакте со здоровой птицей. Начиная со 2-й или с 3-й нед после заражения цыплята выделяют вирус во внешнюю среду. Исход БМ зависит от вирулентности эпизоотического штамма, возраста зараженной птицы и ее генетически обусловленной резистентности.

Виремия, вирусоносительство и вирусовыделение после переболевания сохраняются всю жизнь, несмотря на устойчивость и присутствие преципитирующих и вируснейтрализирующих антител.

Больная птица выделяет вирус через органы дыхания и пищеварения, а также с десквамированным эпителием кожно-перьевых фолликул, эпителий которых служит местом размножения вируса.

Установлена прямая связь между созреванием вируса в клетках фолликул и контагиозностью болезни.

Вирусоносительство отмечено у клинически здоровой птицы во время инкубационного периода и клинического проявления болезни. Кроме того, вирусоносительство отмечено и через 16—24 мес после переболевания, т. е. одновременно с вируснейтрализирующими и преципитирующими антителами.

Таким образом, вирусный антиген может длительно сохраняться в перьевых фолликулах, в то время как в висцеральных органах или невральных вирусиндуцированных опухолях в поздние сроки он либо отсутствовал вовсе, либо обнаруживался в небольшом количестве клеток.

Диагностика. Предварительный диагноз основан на анализе эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных. Для постановки окончательного диагноза от больных птиц берут кровь и очины вырванных перьев, от трупов — селезенку, печень, тимус и опухолевые образования.

Лабораторная диагностика. В лаборатории проводят гистологические исследования.

Вирусный антиген в эпителии перьевых фолликул обнаруживают в РДП (эффективность метода 98,7 %).

Вирус болезни Марека может быть выделен из патологического материала на куриных эмбрионах. Заражение на ХАО суспензией очинов пера сопровождается образованием на оболочке очагов клеточной пролиферации. Заражение куриных эмбрионов в желточный мешок кровью и опухолевым материалом больных кур вызывает гибель эмбрионов. Возможно выделение вируса на культуре клеток.

Выделенный вирус идентифицируют в РДП. Патогенность его может быть изучена на суточных цыплятах.

Антитела в сыворотке крови больной птицы обнаруживают в РДП, а при массовых исследованиях в ИФА.

Дифференциальная диагностика. Для дифференциальной диагностики болезни Марека и лейкоза птиц, которые клинически сходны, сыворотки крови больной птицы (5 мес и старше) исследуют в РНГА на наличие группоспецифического антигена вирусов лейкоз-саркомной группы с помощью препарата для диагностики лейкоза птиц.

Иммунитет и специфическая профилактика. Болезнь Марека — единственная поддающаяся вакцинопрофилактике опухолевая болезнь. Наиболее широкое распространение в мире получила вакцина на основе герпесвируса индеек (ГВИ) штамма FC-126. Причиной тому послужило то, что вирус не требовал аттенуации, не опасен в плане реверсии и подвергается стабилизации во внеклеточном состоянии. Вакцина из ГВИ предотвращает заболевание и развитие опухолей. В то же время она не препятствует инфицированию патогенным вирусом и его выделению во внешнюю среду. Положительным фактором является и то, что аэрозольная вакцинация кур ГВИ оказалась также эффективной, как и внутримышечные введения препарата.

Установлено, что наиболее высокие защитные свойства имеют поливалентные вакцины, включающие штаммы группы ВБМ-ГВИ серотипов 1, 2 и 3. Причем в этом случае возрастание эффекта оказалось не возникновением интерференции, а протективным синергизмом.

Хорошие результаты получены авторами как от природно-ослабленного (полевого), так и от модифицированного (аттенуированного) штаммов вируса.

Установлена корреляция между способностью аттенуированных штаммов вируса болезни Марека передаваться горизонтально и иммуногенно. Поствакцинальная виремия, особенно уровень размножения вируса в эпителиальных клетках перьевых фолликул привитых цыплят, служит хорошим тестом иммуногенности вакцин. При иммунизации против болезни Марека клеточно-опосредованный иммунитет и гуморальный ответ в отдельности не могут обеспечить защиту. Функциональная роль антивирусных антител заключается в нейтрализации свободного от клеток вирулентного вируса болезни Марека и в кооперации с нормальными лимфомами хозяина в лизисе клеток, инфицированных вирусом.

Получены инактивированные вакцины из цельного вируса различной степени очистки и с добавлением разных инактивантов и адъювантов. Показана возможность получения иммуногенных препаратов, не содержащих нуклеиновую кислоту, но имеющих соответствующие протеины. Препараты клеточных мембран, зараженных герпесвирусом индеек, эмульгированных с адъювантом Фрейнда, оказались высокоиммуногенными в отношении патогенных штаммов вируса болезни Марека. Иммунизация кур растворимыми антигенами, экстрагированными из клеток, зараженных аттенуированным штаммом вируса болезни Марека, снижала заболеваемость птицы в 2—5 раз.

Одно из наиболее перспективных направлений — создание рекомбинантных вирусных вакцин, экспрессирующих антиген вируса болезни Марека. Так, например, патентуется использование рекомбинантного вируса оспы птиц с генами, соответствующими одному или нескольким антигенам вируса болезни Марека. Патентуется и другой способ создания новых вакцин против болезни Марека, который основан на изучении последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующей иммуногенные полипептиды 18 и 20 вируса болезни Марека.

Таким образом, накопилось много данных, свидетельствующих в пользу гипотезы двухступенчатого вакцинального иммунитета при болезни Марека. На первой ступени он направлен против вирусных антигенов, на второй — против опухолевых клеток — носителей поверхностного опухолеассоциированного антигена.

2.2.6. ВИРУС РИНОТРАХЕИТА КОШЕК

Ринотрахеит кошек (РТК, вирусный инфекционный ринит кошек, герпес кошек) — заразная вирусная болезнь, характеризующаяся поражением органов дыхания. Основные признаки заболевания — повышение температуры тела, ринит, конъюнктивит, бронхит, трахеит и реже пневмония. Летальность достигает 30 %.

Характеристика возбудителя. Вирус впервые выделили Кранделл и Маурер в США и идентифицировали как вирус группы герпес (1956). Позже описан новый вирус герпеса кошек, который, будучи ассоциирован с клетками, сходен с цитомегаловирусом.

Морфологические свойства возбудителя РТК характерны для вирусов семейства Herpesviridae. Вирионы представляют собой частицы сферической формы, состоящие из четырех структурных компонентов: нуклеоида, капсида диаметром 120—150 нм, содержащей липиды суперкапсидной и наружной оболочек. Наружная оболочка вирионов содержит многочисленные выступы (шипы) длиной около 8 нм. Диаметр вирионов вируса РТК 151—225 нм. Капсид сформирован 162 продолговатыми и полыми капсомерами. Капсомеры расположены по кубическому типу симметрии.

Вирусный геном представлен линейной двуспиральной ДНК с молекулярной массой 70—85 × 106 МД. В составе вириона определяют до 20 белков.

Устойчивость вируса к физико-химическим воздействиям. Она характеризуется чувствительностью его к хлороформу и низким значениям pH. Так, если при 4 °С и pH 7,2 вирус инактивировался через 154 дня, то при pH 4 — через 24 ч. Во внешней среде вирус сохраняет инфекционность до 18 ч. Он чувствителен к воздействию высоких температур и дезинфицирующих средств, хорошо инактивируется раствором хлорной извести. Формальдегид в 0,2%-ном растворе инактивирует его в течение суток.

Антигенная структура. Не изучена.

Антигенная активность. Проявляется синтезом вируснейтрализующих антител у животных-реконвалесцентов.

Антигенная вариабельность и родство. Вирус РТК (или герпесвирус кошек типа 1—ГВК-1) иммунобиологически един. В РН и РСК ГВК-1 отличается от других кошачьих вирусов. Установлено антигенное родство ГВК и герпесвируса собак с помощью поливалентных антител в РН, РИФ и ИФА. Гликопротеиды оболочки, дававшие перекрестные реакции, обладали гемагглютинирующей активностью.

Гемагглютинирующая активность вируса. Полностью не изучена.

Культивирование вируса. Вирус РТК с успехом культивируется в культурах клеток почек, тестикул, легких кошек и фибробластов эмбрионов. Цитопатогенные изменения в зараженной культуре развиваются уже через одни сутки и характеризуются образованием больших, рефрактильных клеток синцития с 10—20 ядрами и внутриядерными тельцами-включениями. Титр вируса в таких культурах к 3—4-му дню инкубации составляет $10^{5,5}$ $ТЦД_{50}$/мл.

В клетках естественно резистентных организмов (крупного рогатого скота, человека, обезьяны) вирус РТК также может репродуцироваться с образованием гигантских клеток и внутриклеточных включений, однако инфекционного вируса из таких клеток выделить не удается.

Возможно репродуцирование вируса РТК в организме кошек 4—6-месячного возраста. У животных развивается типичный респираторный синдром верхних дыхательных путей и появляются вируснейтрализующие антитела. У беременных кошек происходят аборты или рождаются мертвые котята, содержащие вирус. У котят при внутривенном заражении в местах остеогенеза в костях отмечаются остеомиелические поражения и может быть выделен вирус.

Клинические признаки. Инкубационный период длится 3—8 дней. При остром течении ринотрахеит характеризуется серозным конъюнктивитом, ринитом, чиханием, слюнотечением, отказом от корма и питья. Температура тела повышается до 39,5—40 °С. Повышается чувствительность при надавливании в области гортани и трахеи. Позже слюнотечение прекращается, истечения из носовой полости и с конъюнктивы становятся гнойными или исчезают. Выздоровление при таком течении болезни наступает через 10—14 дней. У некоторых кошек в острой фазе заболевания наблюдается выраженный некроз и образование язв на слизистых оболочках.

При затяжном течении болезни развиваются некрозы кончика языка, изъязвления на слизистой оболочке ротовой полости, язвенный кератит, иногда с прободением роговицы, одышка, сильный кашель, первичная пневмония. Наблюдается расстройство ЦНС, выражающееся дрожанием конечностей, атаксией и манежными движениями. Развивается атония кишечника, появляется сильный запор. Гибель животных наступает в результате обезвоживания и бронхопневмонии, как результат вторичной бактериальной инфекции.

Патологоанатомические изменения. На фоне серозного и серозно-гнойного воспаления слизистых оболочек носовой и ротовой полостей, конъюнктивы появляются зоны многоточечного некроза эпителиальных тканей. Одновременно наблюдается нейтрофильная инфильтрация и экссудация фибрина. Ко 2—3-й неделе болезни происходит регенерация эпителиальных тканей.

Локализация вируса. Вирус локализуется в клетках эпителия слизистой оболочки носа, гортани и трахеи.

Источники инфекции. РТК — основное респираторное заболевание кошек, встречающееся у 50—75 % животных. Болезнь встречается в США, Канаде, Европе, Австралии и Новой Зеландии. Эпизоотии ее носят сезонный характер, достигая максимума в июле—августе. Болеют кошки всех возрастов. Смертность составляет 5—20 %, чаще гибнут маленькие котята и животные с ослабленным иммунитетом.

Источник инфекции — больные кошки. Заражение происходит аэрогенно и контактно. От больных животных вирус поступает во внешнюю среду с назальными, оральными и конъюнктивальными выделениями. Выздоровевшие животные остаются но-

сителями вируса до 50 дней и могут передавать его при контакте со здоровыми котятами. Выделение вируса от клинически здоровых животных указывает на возможность латентного носительства вируса РТК.

Диагностика. Диагноз ставят на основе результатов анализа эпизоотологических данных, клинических признаков болезни, патологоанатомических изменений и лабораторных исследований.

Лабораторная диагностика. Для лабораторных исследований направляют мазки-отпечатки и смывы с конъюнктивы, слизистой оболочки носоглотки, миндалин, а также парные сыворотки крови. От павших животных для исследования берут кусочки пораженных слизистых оболочек, а также лимфоузлы нижней челюсти и верхнего отдела трахеи.

Индикацию вируса в патологическом материале проводят с помощью ПЦР, РИФ и биопробой в культуре клеток почек или фибробластов эмбрионов кошек. ЦПД наблюдают уже через одни сутки.

Идентификацию выделенного вируса осуществляют с помощью РН в культуре клеток.

Ретроспективная серологическая диагностика. Проводят, титруя антитела в парных сыворотках в РН.

Дифференциальная диагностика. Ее выполняют с учетом возможности возникновения клинических проявлений при заражении животных пикорна-, реовирусами, микоплазмой и хламидией.

Иммунитет и специфическая профилактика. Переболевшие животные приобретают кратковременную невосприимчивость. Максимальный ее уровень формируется к 21-му дню после заражения с существенным снижением через 5 мес.

Титры антител невысокие, растут медленно и даже к 40-му дню могут выявляться только у 70 % кошек. В некоторых случаях вирусы герпеса способны к ассоциированию с клеткой и переходу из клетки в клетку, минуя межклеточное пространство. В связи с этим при развитии вызванной ими болезни большое значение имеет клеточный иммунитет.

Получаемые от матери антитела могут присутствовать у котят в течение 2—10 нед на среднем уровне, падая ниже определенного уровня к 6—9-недельному возрасту.

Для профилактики РТК используют три типа вакцин: живую аттенуированную для парентерального введения; живую для интраназального введения и инактивированную. Живой вакциной прививают животных в возрасте от 3 мес до 3 лет с ревакцинацией через 3 нед. Иммунитет после вакцинации сохраняется не менее 1 года.

Инактивированную вакцину получают инактивацией культурального ГВК-1 β-пропиолактоном. После 2-кратного введения вакцины вируснейтрализующие антитела синтезировались в высоких титрах и сохранялись до 10 мес.

2.3. СЕМЕЙСТВО ПОКСВИРУСОВ

Семейство Poxviridae (от лат. pox — пустула, язва) объединяет большую группу вирусов, поражающих позвоночных и насекомых.

Вирионы плеоморфные, чаще всего имеют форму параллелепипеда с размерами (220—450) × (140—260) нм, но возможна и овальная форма с размерами (250—300) × (160—190) нм. Снаружи они окружены липопротеидной мембраной (суперкапсид) толщиной 12 нм, имеющей белковые трубчатые структуры (филаменты). В центральной части вириона находится нуклеопротеидный комплекс (нуклеоид), имеющий двояковогнутую форму. Он состоит из ДНК и белков и окружен внутренней мембранами толщиной 9 нм. Между поверхностной и внутренней мембраной в вогнутостях расположены 1—2 латеральных тела. Масса частицы 5×10^{-15} г, плавучая плотность в сахарозе 1,25 г/см^3, в CsCl — 1,30 г/см^3, коэффициент седиментации 500S.

Геном представлен двуспиральной линейной молекулой ДНК размером 375 kb (килобаз), что составляет 3 % от массы вириона. Концы ДНК ковалентно связаны и образуют концевые шпильки (флип-флоп формы).

Протеины вириона составляют около 90 % от массы частицы. Геном кодирует 150—300 белков, из которых структурных только около 100. С нуклеотидом вириона связаны 15 белков (ферменты), некоторые из которых участвуют в транскрипции иРНК и ее модификации.

В состав вириона входят липиды и углеводы, которые составляют соответственно 4 и 3 % от массы вириона.

Репродукция вирусов происходит в цитоплазме клеток и заканчивается формированием двух форм инфекционных вирусных частиц — внутриклеточной и внеклеточной (оболочечной). После адсорбции вирион проникает в клетку путем слияния с клеточной мембраной и последующего высвобождения нуклеоида в цитоплазму. В результате последовательных этапов раздевания с обеих цепей ДНК в присутствии вирусной РНК-полимеразы синтезируются иРНК-транскрипты (ранние, промежуточные, поздние). Вирусные структурные белки транслируются в основном с поздних иРНК и проходят посттрансляционную модификацию. Репликация вирусных ДНК происходит с образованием промежуточных репликативных форм, которые специфически разрезаются до одинаковых по размерам дочерних ДНК и ковалентно закрываются. Сборка вирионов происходит в несколько этапов. Сначала формируются незрелые вирусные частицы, которые созревают до внутриклеточных зрелых частиц. После их слияния с клеточной мембраной вирионы выходят из клетки путем почкования с образованием внеклеточных оболочечных вирионов. Во время естественной инфекции распространение вируса происходит в основном за счет вирусных частиц, высвобождающихся из клеток (внеклеточные вирионы).

В процессе морфогенеза вирионов оспы в клетках образуются включения разных типов: ацидофильные (тип А), базофильные (тип В) или вироплазмы.

Вирусы оспы распространяются аэрозольным и контактным путями, а также механически через переносчиков. В природе спектр патогенности узок (в пределах вида хозяина), хотя в лабораторных условиях спектр восприимчивости биологических систем значительно шире. Многие вирусы позвоночных вызывают папулезно-везикулярную сыпь.

Семейство Poxviridae состоит из двух подсемейств: Chordopoxvirinae и Entomopoxvirinae. Подсемейство Chordopoxvirinae включает 8 родов: Orthopoxvirus, Parapoxvirus, Avipoxvirus, Capripoxvirus, Leporipoxvirus, Suipoxvirus, Molluskpoxvirus и Yatapoxvirus. Подсемейство Entomopoxvirinae включает 3 рода: Entomopoxvirus A, Entomopoxvirus B и Entomopoxvirus C.

Подсемейство Chordopoxvirinae. Включает вирусы позвоночных, вирионы которых имеют форму параллелепипеда или овоида. В пределах родов имеется широкое биологическое родство, которое менее выражено у авипоксвирусов. Внутри каждого рода подсемейства отмечается значительная перекрестная реактивность. Нейтрализующие антитела специфичны только внутри одного рода. Антитела к белкам нуклеоидного комплекса обладают широкой перекрестной реактивностью. Ортопоксвирусы имеют гемагглютинирующие антигены, которые в других родах встречаются редко.

Род Orthopoxvirus (типовой вид — вирус-вакцины) включает 9 видов. Среди них вирусы оспы верблюдов, коров, мышей, обезьян, енотов, вирус-вакцины, вирус человека (в природе искоренен), буйволов, кроликов. Вирионы имеют форму параллелепипеда размерами 200 × 200 × 250 нм. Устойчивы к воздействию эфира. Имеют антиген гемагглютинин, который обладает гемагглютинирующей и гемадсорбирующей активностью в отношении эритроцитов птиц некоторых видов. Между видами рода имеется антигенное родство. Спектр патогенности в естественных условиях узкий, в лабораторных условиях число восприимчивых систем (животных и культур клеток) значительно выше.

Род Parapoxvirus (типовой вид — вирус контагиозной эктимы) включает 5 видов, среди которых вирусы оспы крупного рогатого скота, человека, овец, коз, оленей. Вирион овоидных форм размерами (200—300) × (140—170) нм. Большинство видов имеет перекрестное родство, реагируют в серологических реакциях и в ДНК-гибридизации. Как правило, все вирусы выделены от копытных (чаще одомашненных). Имеют узкий спектр восприимчивости культур клеток.

Род Avipoxvirus (типовой вид — вирус оспы кур) включает 10 видов, среди которых вирус оспы кур, канареек, голубей, попуга-

ев, перепелов, воробьев, скворцов, индеек и фазанов. Вирион кирпичеобразной формы, размером 330 × 280 × 200 нм. Устойчив к действию эфира. Вирусы вызывают поражения у птиц по типу пролиферативных кожных (кожная форма) или респираторных (дифтеритическая форма) поражений. Перекрестная защита существует в основном внутри вида, реже — между несколькими видами хозяев. Вирусы распространяются повсеместно в основном аэрозольно, при прямом контакте, при участие переносчиков — членистоногих (механически). В серологических реакциях установлена перекрестная реактивность. При репродукции вирусы образуют тельца-включения типа А. Продуктивную инфекцию вызывают в культурах клеток птиц, абортивную — в культурах клеток млекопитающих.

Род Capripoxvirus (типовой вид — вирус оспы овец) включает 3 вида, среди которых вирусы оспы коз, овец и крупного рогатого скота. Вирион имеет форму параллелепипеда размером 300 × 270 × 200 нм. Чувствителен к эфиру и хлороформу. Распространяются контактно и механически членистоногими. Наблюдается иммунобиологическое родство и перекрестная активность на антигенном и генетическом уровнях.

Род Leporipoxvirus (типовой вирус — вирус миксомы) включает 4 вида, среди которых вирус фибромы зайцев, кроликов и белок, вирус миксомы кроликов. Вирион имеет форму параллелепипеда размером 300 × 250 × 200 нм. Чувствителен к эфиру. Распространяется контактно и членистоногими. Вирусы миксомы и фибромы вызывают у хозяев образование локальных доброкачественных опухолей, у европейских кроликов — тяжелопротекающую болезнь (вирус миксомы). Антигенная и генетическая перекрестная реактивность хорошо выражены. Существует иммунобиологическое родство.

Род Suipoxvirus (типовой вид — вирус оспы свиней) включает один вид. Вирион имеет форму параллелепипеда размером 300 × 250 × 200 нм. Вирус распространен повсеместно и передается контактным путем и членистоногими. Вызывает бессимптомное генерализированное поражение кожи у свиней с локализацией в эпителии и региональных лимфоузлах. Обычно вируснейтрализирующие антитела не обнаруживаются. При репродукции вирус образует бляшки в клетках почки и тестикул свиней. Экспериментальная инфекция воспроизводится на кроликах.

Род Molluskpoxvirus (типовой вид — вирус контагиозного моллюска) включает один вид, внутри которого возможны два варианта. Вирион имеет форму параллелепипеда размером 320 × 250 × 200 нм. Отмечается перекрестная ДНК-гибридизация. Вирус распространяется контактно среди детей и подростков, чаще половым путем. Инфекция протекает с рецидивами в сочетании с бактериальными инфицированиями. Вирус слабо накапливается в культурах нервных клеток (из органов человека и животных) и образует цитоплазматические тельца-включения.

Род Yatapoxvirus (типовой вид — yaba monkey tumor virus) включает 2 вида, которые циркулируют у приматов. Вирион имеет кирпичеобразную форму размером 300 × 250 × 200 нм. Отмечается перекрестная ДНК-гибридизация, хотя и существуют значительные различия в рестрикционных анализах между двумя видами. Вирус распространяется контактно и путем механического переноса насекомыми. Инфекция сопровождается развитием у приматов гистиоцитом. Вирус удавалось выделить от обезьян и кроликов.

Подсемейство Entomopoxvirinae. Входящие в него роды *Entomopoxvirus A, B, C* включают вирусы, поражающие насекомых. Вирионы различной формы со средним размером 70 × 250 × 300 нм и содержат 1—2 латеральных тела. Не имеют антигенного родства (в серологических реакциях) с хордопоксвирусами. Реплицируются в культурах клеток насекомых (жировые клетки, гемоциты) и формируют цитоплазматические включения — сфероиды с белком сфероидином.

2.3.1. ВИРУСЫ ОСПЫ ПТИЦ

Оспа птиц — контагиозная болезнь птиц разных видов (кур, голубей, канареек, скворцов, перепелов, индюков, фазанов, попугаев), протекающая с поражением слизистых оболочек ротовой, носовой полостей и кожных покровов преимущественно неоперенных участков тела.

Болезнь распространена повсеместно. Отмечается ее сезонное осенне-весеннее усиление. Экономический ущерб заключается в снижении яйценоскости и вынужденном убое больных и переболевших птиц.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Poxviridae, подсемейству Chordopoxvirinae и роду Avipoxvirus. Вирионы овальной или прямоугольной формы, размером в среднем 140—450 нм и со сложным типом симметрии. Состоят из нуклеоида, содержащего геном, боковых тел и наружной липопротеидной оболочки, образующей выступы. Геном представлен двуспиральной линейной ДНК.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус разрушается при высоких температурах. Высушивание и холод консервируют его. В лиофилизированном виде сохраняется до 8 лет, в патологическом материале (оспенные корочки) при температуре минус 15 °С сохраняет инфекционность более 2 лет. Чувствителен к жирорастворителям и быстро инактивируется в гниющем материале.

Антигенная структура. Вирионы вируса оспы содержат наружный протеидный антиген в составе поверхностных ворсинок (филаментов). Наружный антиген индуцирует образование антигемагглютинирующих вируснейтрализующих антител, которые

обеспечивают развитие иммунитета. Внутренние полипептиды индуцируют комплементсвязывающие и преципитирующие антитела.

Антигенная вариабельность и родство. Штаммы вируса оспы кур идентичны в антигенном отношении, но различаются по спектру патогенности, вирулентности и гемагглютинирующей активности.

Между вирусами оспы кур, голубей и индеек существует антигенное родство. Вирусы оспы канареек, перепелов и попугаев в иммунобиологическом отношении отличаются от вирусов оспы кур и голубей.

Антигенная вариабельность у вида вируса оспы кур не установлена. Однако штаммы вируса оспы различаются по спектру патогенности и по вирулентности.

Межродовое антигенное родство установлено между вирусами оспы кур и оспы овец и коз, а также между вирусами оспы птиц и миксоматоза кроликов, оспы коров и эктромегалии мышей (в РСК, РДП)

В иммунобиологическом отношении вирус оспы кур родственен вирусу оспы голубей и индеек, а также овец и коз, однако не родственен вирусам оспы канареек, перепелов и попугаев.

Культивирование вируса. Вирусы оспы кур и голубей хорошо размножаются на ХАО куриных эмбрионов, в первичной культуре клеток куриных фибробластов, вызывая ЦПД и образование симпластов, и в перевиваемой культуре клеток QT-35.

Гемагглютинирующие свойства. Вирус оспы птиц способен агглютинировать эритроциты кур некоторых пород (0,5%-ная взвесь эритроцитов на физиологическом растворе, pH 7,2—7,4; 37 °С). Суспензия вируса при консервировании 0,5%-ным формалином и хранении при 4 °С сохраняет гемагглютинирующую активность более 8 мес и может быть использована в РГА и РТГА.

Экспериментальная инфекция. Воспроизводится на неиммунных цыплятах и курах при заражении в скарифицированный гребень, бородки и перьевые фолликулы. Оспенный фолликулит удается получить и при заражении голубей разного возраста.

Клинические признаки. Инкубационный период болезни длится в среднем 15—20 дней. В дальнейшем у больной птицы ухудшается аппетит, появляется вялость, снижается яйценоскость. Болезнь может приобретать кожную, дифтеритическую или смешанную формы течения.

При кожной форме чаще на гребне, бородках, сережках, основании клюва, щеках, клоаке, иногда по всему туловищу развиваются бородавчатые образования (оспины). Течение чаще доброкачественное, летальность низкая.

При дифтеритической форме развивается дифтеритическое воспаление слизистых оболочек ротовой и носовой полостей, а также гортани, трахеи, бронхов и глаз. Прогноз неблагоприятный, летальность в холодное время года может достигать 70 %.

Патологоанатомические изменения. Они достаточно специфические и зависят преимущественно от формы течения болезни. Чаще всего у павшей птицы на характерных участках можно обнаружить одновременно и желтовато-белые возвышающиеся пятна разного размера, иногда покрытые красно-кровянистым струпом, и творожистые массы или дифтеритические пленки в дыхательных путях и кишечнике (цв. вкл., рис. 42).

Локализация вируса. В организме больной птицы вирус локализуется в оспинах бесперьевых участков головы, на слизистой глотки, гортани, трахеи. На 17—20-й день после инфицирования вирус можно обнаружить в крови, почках, яичниках, селезенке, головном мозге.

У переболевшей птицы остается длительное вирусоносительство (более 10 мес).

В окружающую среду вирус выделяется с содержимым оспин и корочками от больных птиц.

Источник инфекции — больная птица. Переносчиками возбудителя служат клещи и клопы. Вирус передается контактным путем через загрязненные инвентарь, одежду персонала, непосредственно через поврежденную кожу, а также воздушно-капельным и алиментарным путями через загрязненные корм и воду.

В естественных условиях некоторые штаммы вируса оспы кур патогенны только для кур, другие — для кур, голубей и индеек. Есть штаммы, патогенные не только для птиц, но и для других видов животных, например кроликов. По спектру патогенности вирусы оспы птиц можно расположить в следующем порядке: голуби, индейки, куры, канарейки.

Диагностика. Диагноз на оспу птиц ставят на основании эпизоотических, клинических, патологоанатомических и лабораторных данных. Результаты лабораторных исследований являются решающими в диагностике.

Взятие и подготовка материала. От больной птицы срезают оспины (корочки) которые помещают в 50%-ный раствор глицерина и в термосе с охлаждающей смесью транспортируют в лабораторию. Или непосредственно из оспин делают маски-отпечатки, высушивают, фиксируют в спиртоэфирной смеси и отправляют на исследование. От трупов берут дифтеритически пораженные гортань и трахею.

В лаборатории готовые мазки-отпечатки окрашивают и исследуют в световом микроскопе. Из консервированных оспин (корочек) готовят 10%-ную суспензию, которую используют для выделения вируса.

Лабораторная диагностика. Включает индикацию вирионов оспы (элементарных телец) методом световой микроскопии, вы-

деление вируса на куриных эмбрионах или на цыплятах и идентификацию выделенного вируса методом световой микроскопии, вирусоскопии, РИФ и РДП (дополнительно).

Индикацию вируса проводят методом световой микроскопии (вирусоскопия). Для этого готовят мазки-отпечатки из патологического материала или используют уже готовые, привезенные из очага инфекции.

Окрашивают их методом серебрения по Морозову. Мазок покрывают жидкостью Руге (реактив № 1: 1,0 мл ледяной уксусной кислоты, 2,0 мл 40%-ного формальдегида и 100 мл дистиллированной воды) на 1 мин; промывают дистиллированной водой; протравливают раствором танина (реактив № 2: 1 г танина и 5 мл дистиллированной воды) в течение 1—2 мин, подогревая до появления паров; промывают и наносят раствор аммиачного серебра (реактив № 3: 5 г кристаллов аммиачного серебра растворяют в 100 мл дистиллированной воды, и к 80 мл полученного раствора добавляют по каплям 25%-ный раствор аммиака до растворения осадка; для окрашивания полученный реактив разводят дистиллированной водой 1 : 10); слегка прогревают до темно-коричневой окраски мазка; промывают дистиллированной водой и просматривают под иммерсионным маслом в световом микроскопе.

Вирусоскопия считается положительной только при наличии характерных образований (элементарных телец Борреля — вирионов оспы) темно-коричневого цвета, в массовом количестве расположенных по всему мазку. При отрицательной вирусоскопии проводят биопробу на куриных эмбрионах или цыплятах. Обнаружение специфических телец-включений (телец Боллингера) в цитоплазме инфицированных клеток является ориентировочным методом индикации вируса оспы.

РИФ является дополнительным экспресс-методом диагностики оспенных антигенов в патологическом материале и позволяет получить результат через 5—7 ч после поступления материала на исследования.

Выделение вируса оспы из патологического материала проводят на 10—12-дневных куриных эмбрионах, которые заражают на ХАО и инкубируют 5—6 дней. Признаком размножения вируса следует считать отдельные или сливные оспины на ХАО, а также значительное утолщение или желеобразный отек всей ХАО (при высокой заражающей дозе). При отсутствии оспин делают три слепых пассажа.

Из оспин на ХАО делают мазки-отпечатки и проводят вирусоскопию (как указано выше).

Биопробу на цыплятах проводят на неиммунных к вирусу оспы 3—4-месячных цыплятах, которым инокулируют 10%-ную суспензию из патологического материала методом втирания (накожно) в скарифицированную поверхность гребня, бородок или в перьевые фолликулы голени. При наличии в материале вируса на месте втирания на 5—6-й день развиваются оспенные поражения. Специфичность этих поражений идентифицируют методом вирусоскопии мазков.

Идентификация выделенного вируса обычно ограничивается вирусоскопией, однако в дополнение к ней можно использовать и серологические реакции (РДП и РИФ), которые проводят по общепринятым методикам.

Ретроспективная диагностика. Проводится редко. В случае стертого течения болезни у кур, не имеющих видимых клинических признаков, исследуют парные сыворотки в РДП. Однако преципитирующая сыворотка реконвалесцентов часто оказывается слабоактивной, и у 15 % больных оспой кур антитела не выявляются.

Разрабатываются диагностические наборы на обнаружение специфических антител против вируса оспы птиц методами РНГА и ИФА, которые должны позволить проводить широкомасштабные эпизоотологические мониторинги.

Иммунитет и специфическая профилактика. В нашей стране разработаны и применяются живые аэрозольные вакцины двух типов: из нереактогенного гетерологичного штамма вируса оспы голубей Нью-Джерси и из природно-ослабленного штамма оспы кур АШ-27. А также разработана вакцина из аттенуированного культурального штамма К вируса оспы кур, которую вводят парентерально в перепонку крыла. Иммунитет у привитых цыплят в среднем сохраняется в течение 3—6 мес, у кур — до 10 мес.

2.3.2. ВИРУС МИКСОМАТОЗА КРОЛИКОВ

Миксоматоз — остропротекающая высококонтагиозная вирусная болезнь, характеризующаяся воспалением слизистых оболочек и появлением студенистых отеков в области головы, ануса, гениталий и кожи тела.

Инфекция распространена во многих странах мира и наносит большой экономический ущерб.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Poxviridae, подсемейству Chordapoxvirinae, роду Leporipoxvirus.

Вирионы прямоугольной формы, размером 230—330 нм. Состоят из нуклеоида гантелевидной формы (сложный тип симметрии), по бокам которого расположены латеральные тельца. Вирионы имеют суперкапсидную оболочку, образующую выступы. Геном вируса представлен двуспиральной нитчатой линейной молекулой ДНК.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус гибнет при высоких температурах (55—60 °С за 15 мин), устойчив к высушиванию, к колебаниям pH в широких пределах и некоторым химическим веществам (борной кислоте, фенолу, перманганату ка-

лия) и жирорастворителям (эфиру). Теряет свою инфекционность при воздействии 3%-ных растворов формальдегида и едкой щелочи.

Антигенная структура и активность. Вирус имеет наружные гликопротеидные и внутренние нуклеоидные антигены. Наружные антигены индуцируют образование вируснейтрализирующих, внутренние — преципитирующих антител.

Антигенная вариабельность и родство. Вирус миксомы кроликов в иммунобиологическом отношении родственен вирусу фибромы кроликов и белок. Выявлено антигенное родство между вирусом фибромы кроликов и осповакциной (в РДП).

Культивирование вируса. Вирус размножается на ХАО куриных и утиных эмбрионов с образованием фокусов (оспин) в культурах клеток почек кроликов, белок, крыс, хомяков, морских свинок, человека с ЦПД, образованием бляшек и цитоплазматических клеточных включений, а также на коже естественно восприимчивых животных — кроликов, которые в 2,5 раза чувствительнее куриных эмбрионов.

Удалось адаптировать вирус миксоматоза к тканям головного мозга мышат-сосунов и к культуре клеток, полученной из саркомы морской свинки. Интрацеребральными пассажами на кроликах получен аттенуированный штамм (нейромиксома).

Геммаглютинирующей активностью вирус не обладает.

Клинические признаки. Болезнь может протекать в двух формах: классической и нодулярной (узелковой).

Инкубационный период в зависимости от вирулентности вируса, дозы и способа заражения, а также восприимчивости организма длится от 2 до 20 дней. Затем при обеих формах течения появляются покраснения в виде пятен или папул на коже век и ушных раковин.

Классическая форма протекает остро и сопровождается обильными отеками в области головы, подгрудка, половых органов. Часто наблюдают гнойные выделения из глаз и носа, затрудненное дыхание. Болезнь продолжается в среднем 5—6 дней, охватывает до 100 % поголовья и заканчивается высокой смертностью.

Нодулярная форма протекает легче. Папулы без отеков формируются на различных участках кожи. На 10—14-й день на их месте появляются очаги некроза, которые при благоприятном течении заживают за 30—40 дней. Нодулярная форма сопровождается доброкачественным течением, хотя смертность остается высокой — 70—80 %.

В последние годы в хозяйствах промышленного типа зарегистрирована новая клиническая форма, протекающая с поражением органов дыхания, насморком, слезотечением. Исход миксоматоза данной формы более благоприятный. Наблюдается нарушение репродуктивной функции и гибель только среди крольчат.

К концу эпизоотии появляются апатогенные штаммы вируса. Это сопровождается изменением клинической картины: затягивается инкубационный период, на отдельных участках тела появляются микоматозные узлы, которые в дальнейшем сморщиваются и покрываются корками.

Патологоанатомические изменения. При вскрытии кроликов находят студенистообразные инфильтраты в подкожной клетчатке туловища, шеи, головы, конечностей, половых органов; на коже — узелковые разрастания с очагами некроза, гнойно-фибринозные экссудаты, корочки; в легочной ткани возможны кровоизлияния.

Локализация вируса. Вирус проникает в организм и в месте внедрения, чаще всего в слизистых оболочках ротовой и носовой полостей, репродуцируется (первичная репродукция). По лимфатическим сосудам он попадает в регионарные лимфатические узлы, где репродуцируется вторично. На 3—4-й день развивается виремия и вирус диссеминирует в миксомы, лимфатические узлы, легкие, селезенку и другие внутренние органы. Через 3 дня после инфицирования вирус выделяется с носовыми и глазными секретами. На 4-е сут он обнаруживается в крови, внутренних органах, семенниках, на 5-е сут — в области наружных половых органов. При этом титр вируса во внутренних органах ежедневно увеличивается.

Источник инфекции — больные кролики. Возбудитель передается в основном при контакте, реже воздушно-капельным путем. Инфекцию распространяют насекомые: комары, а также вши и блохи, паразитирующие на кроликах. Предполагают, что насекомые являются резервуаром инфекции в природе.

В естественных условиях болеют дикие и домашние кролики. Дикие зайцы болеют редко. Для распространения миксоматоза в полевых условиях закономерны два параллельных явления: снижение вирулентности возбудителя и повышение устойчивости у восприимчивых животных.

Диагностика. Диагноз ставят исходя из эпизоотологических данных, клинической картины и лабораторных исследований. Окончательно его устанавливают на основании индикации вируса методом биопробы на кроликах или КЭ, идентификацией в ИФА, гистологическими исследованиями.

Взятие и подготовка материала. Для исследования в лабораторию направляют клинически больных кроликов или свежие трупы (не позднее, чем через 2 ч после гибели), а также кусочки пораженных участков кожи. Патологический материал доставляют в термосе со льдом. В качестве консерванта можно использовать 50%-ный раствор глицерина. Из кусочков пораженной кожи и подкожной клетчатки (предварительно тщательно отмытой солевым раствором с антибиотиками) готовят 10%-ную суспензию. Полученную из нее надосадочную жидкость используют для выделения вируса.

Выделение вируса. Проводят методом биопробы на белых крольчатах или куриных эмбрионах. Крольчатам массой 1,5—2 кг инокулируют исследуемый материал внутрикожно и под конъюнктиву. Контролем служат незараженные кролики. При положительной биопробе на 3—6-й день развивается характерная клиническая картина: либо классическая форма болезни с отечно-сосудистой инфильтрацией подкожной клетчатки головы, шеи, половых органов и гибелью на 7—16-й дни, либо нодулярная форма с узелками на характерных участках тела (уши, голова и т. д.)

Куриные эмбрионы заражают путем инокуляции исследуемого материала на ХАО. При положительной биопробе образуются характерные фокусы (оспины).

Гистологические исследования. Их проводят либо с патологическим материалом, взятым непосредственно от трупов, либо от положительной биопробы. Готовят парафиновые срезы из кусочков кожи с подкожной клетчаткой и окрашивают гематоксилин-эозином. При миксоматозе в клетках эпидермы кожи и корневого влагалища волос наблюдается вакуолизация цитоплазмы, кариолизис и кариорексис, цитоплазматические ацидофильные включения. Набухшие клетки (фибробласты, ретикулоциты, эозинофилы, миксомные клетки) образуют рыхлую сетку, заполненную слизистой жидкостью.

Индикация вируса. Используют ИФА для индикации вируса в патологическом материале (экспресс-метод) и для идентификации выделенного вируса. Данный метод является высокочувствительным и достаточно специфичным в диагностике миксоматоза кроликов.

Иммунитет и специфическая профилактика. Во многих странах, в том числе в РФ, используют два типа вакцин: из гетерологичного штамма вируса фибромы Шоупа и из гомологичного аттенуированного штамма вируса миксоматоза. Живую гетерологичную вакцину готовят из культурального вируса. Она обеспечивает поствакцинальный иммунитет длительностью до 4 мес. Аттенуированную гомологичную вакцину получают путем пассирования вируса миксоматоза в культуре клеток почки кролика, а затем в КЭ (более 20 пассажей). При внутрикожном введении такой вакцины развивается иммунитет сроком до 12 мес.

2.4. СЕМЕЙСТВО ПАРВОВИРУСОВ

Семейство Parvoviridae (от лат. parvus — маленький) включает группу вирусов, поражающих позвоночных и насекомых. Вирионы изометрические, размером 18—26 нм, суперкапсидной оболочки не имеют (безоболочечные). Нуклеокапсид кубического типа симметрии. Капсид состоит из 32 капсомеров. Молекулярная масса вириона 5,5—6,2 МД, плавучая плотность в CsCl 1,39—1,42 г/см^3, коэффициент седиментации 110—122S.

Геном представлен односпиральной, линейной молекулой ДНК размером 4—6 kb, составляющей 20 % от массы вириона. Некоторые виды вирусов (мелкий вирус мышей) содержат минус-нитевую ДНК, тогда как другие виды могут иметь и минус-, и плюс-нитевую ДНК в одинаковых (аденоассоциированный вирус) или в разных (бычий парвовирус) соотношениях. Процент плюс-нитевой ДНК варьирует от 1 до 50 % и может зависеть от клетки хозяина.

Вирионы содержат 2—4 вида вирусных протеинов, которые обозначаются VP1, VP2, VP3, VP4, в порядке уменьшения молекулярной массы. Липидов и углеводов не обнаружено.

Вирионы устойчивы к жирорастворителям, к разным значениям pH (от 3 до 9), нагреванию до 56 °С в течение 60 мин, инактивируются при обработке формалином, β-пропиолактоном, окислителями.

Процессы адсорбции и раздевания парвовирусов изучены мало. Репродукция происходит в ядре клетки, находящийся в S-фазе, что связано, вероятно, с использованием вирусом клеточных полимераз. Вирусная ДНК содержит гены, кодирующие продукты, необходимые для транскрипции и репликации, а также кодирующие вирусные протеины. Считается, что перед синтезом иРНК, вирусный геном переходит в двуспиральную форму; иРНК кепированы и полиаденилированы чаще по 3′-концу.

После трансляции вирусные белки аккумулируются в виде пустых капсидов. Зрелая дочерняя молекула ДНК формируется из предшественника — репликативной двуспиральной формы (дуплекс), а затем встраивается в капсид. Зрелые инфекционные вирионы, а также вирусные протеины в виде пустых капсидов накапливаются в ядре. В зависимости от вида парвовирусы могут благоприятно репродуцироваться в присутствии других вирусов (коинфекции), например, адено- или герпесвирусов, которые являются вирусами-помощниками.

Вирусы подсемейства Parvovirinae инфицируют позвоночных и культуры их клеток часто в ассоциации с вирусами-помощниками.

Семейство Parvoviridae состоит из двух подсемейств: Parvovirinae и Densovirinae.

Подсемейство Parvovirinae. Включает роды Parvovirus, Erythrovirus, Dependovirus. Подсемейство Densovirinae включает роды Densovirus, Interavirus, Brevidensovirus. Подразделение на виды внутри родов основано на различиях спектра естественных хозяев и антигенных особенностей белков.

Род Parvovirus самый многочисленный в этом подсемействе и включает 21 вид. Вирусы этого рода поражают норок, крупный рогатый скот, собак, цыплят, кошек, гусей, уток, грызунов и свиней. Некоторые виды проявляют гемагглютинирующую актив-

ность с эритроцитами одного или нескольких видов животных. Некоторые виды характеризуются трансплацентарной передачей, парвовирусы гусей могут передаваться трансовариально.

Род Erythrovirus содержит один вид, который репродуцируется в предшественниках эритроцитов приматов.

Род Dependovirus включают 11 видов, репродуцирующих в присутствии вирусов-помощников (адено- и герпесвирусов). Естественные хозяева вирусов этого рода — крупный рогатый скот, собаки, лошади, овцы, птицы, а также человек.

Подсемейство Densovirinae. Вирусы этого подсемейства инфицируют членистоногих на разных стадиях их созревания (личинки, нимфы, зрелые особи) без вовлечения вирусов-помощников.

Морфогенез вирионов этих вирусов сопровождается формированием плотных внутриядерных включений. Есть сообщения о репродукции денсовирус-подобных вирусов в крабах и креветках.

2.4.1. ВИРУС АЛЕУТСКОЙ БОЛЕЗНИ НОРОК

Алеутская болезнь (вирусный плазмоцитоз) — контагиозная, медленно развивающаяся инфекционная болезнь, протекающая с явлениями геморрагического диатеза, анемией, кахексией на фоне плазмоклеточной пролиферации и гипергаммаглобулинемией.

Болезнь регистрируется в странах с развитым пушным звероводством и наносит большой экономический ущерб.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Parvoviridae и роду Parvovirus. Вирионы имеют изометрическую форму, диаметром 18—22 нм и не имеют суперкапсидной оболочки. Они состоят из капсида кубического типа симметрии и генома. Геном представлен односпиральной линейной молекулой ДНК.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус устойчив во внешней среде. В необработанных тканях больных норок длительно сохраняет свою инфекционность. Не разрушается под действием высоких температур, формалина. Низкие температуры консервируют вирус. Устойчив к жирорастворителям и клеточным ферментам (протеазе, нуклеазе).

Антигенная структура. Вирионы алеутской болезни содержат капсидные антигены. В организме инфицированных норок обнаружены неструктурные (невирионные) антигены. Капсидные и неструктурные антигены образуют так называемые инфекционные комплексы с иммуноглобулинами сыворотки крови. В состав таких комплексов входит и комплемент. Инфекционная активность вируса, входящего в такие комплексы, не нейтрализуется, поэтому он длительно циркулирует в организме больных животных.

Гемагглютинирующая активность не установлена.

Антигенная вариабельность. Штаммы вируса алеутской болезни норок и хорьков в иммунобиологическом отношении неродственны.

Культивирование вируса. В лабораторных условиях вирус поддерживается на норках. Из культур клеток для выращивания вируса использовали клетки куриной почки, семенники норок, почки кошки. Однако культуральный вирус уже с первых пассажей утрачивал инфекционную активность для норок, хотя вызывал ЦПД в культурах клеток.

Клинические признаки. Болезнь протекает чаще хронически, хотя бывает острое и подострое течение. Инкубационный период длительный. Наблюдается снижение привесов, вялость, угнетение, лихорадка. Снижается функция воспроизводства. При прогрессировании болезни наблюдаются кровотечения из ротовой полости, понос с кровью, анемия, параличи и парезы. Смертность достигает 80 %.

Бессимптомное течение болезни наблюдается чаще у щенков, зараженных во внутриутробном или подсосном периодах.

Паталогоанатомические изменения. Они характеризуются генерализованным увеличением лимфоузлов, селезенки, печени, почек, кровоизлияниями в стенках желудка и кишечника. Характерны гистологические изменения во внутренних органах, проявляющиеся плазмоклеточной пролиферацией.

Источник инфекции — больные норки всех возрастов. Возбудитель передается горизонтальным (контактным, воздушно-капельным, алиментарным, половым) и вертикальным путями. В окружающей среде вирус рассеивается со слюной, фекалиями, мочой. Также имеются переносчики инфекции — насекомые (мухи, комары, клещи).

В естественных условиях болеют норки всех окрасок. Однако редкие породы (алеутские, сапфировые, голубые) поражаются и болеют чаще и тяжелее, чем стандартные. К вирусу восприимчивы хорьки, скунсы, в редких случаях — человек.

Локализация вируса. В организме больных животных вирус обнаруживают в сыворотке крови, мезентериальных лимфатических узлах, почках, селезенке, печени, слюнных железах и кишечнике. В клетках он находится либо в ядрах, либо связан с органеллами (рибосомами). У хронически больных животных персистирует пожизненно, локализуясь в крови в составе иммунных комплексов и во внутренних органах. Во внешнюю среду выделяется со слюной, мочой и фекалиями.

Диагностика. Диагноз ставят исходя из эпизоотологических, клинических, патологоанатомических, патоморфологических данных и результатов лабораторных исследований.

Взятие материала. От свежих трупов берут кусочки селезенки, печени, почек, лимфоузлов, головного мозга, которые транспортируют в лабораторию в термосе со льдом. От больных норок отправляют сыворотку крови.

Лабораторная диагностика. Она включает патоморфологические исследования и неспецифические методы диагностики (реакция йодной агглютинации, тимоловая проба, глютаральдегидный тест и т. д.), а также индикацию вирусных антигенов в РИФ, вирусного генома в ПЦР, вирусовыделение на норках и идентификацию выделенного вируса в РИФ, специфическую серодиагностику в РНИФ, РИЭОФ и ИФА.

Патоморфологические исследования — одни из наиболее достоверных в диагностике алеутской болезни. В мазках-отпечатках из разных органов обнаруживают характерный морфологический признак — диффузный плазмоцитоз.

РИФ позволяет обнаружить вирусные антигены в патологическом материале. Применяют прямой вариант РИФ, который выявляет светящиеся гранулы в цитоплазме клеток.

ПЦР и метод гибридизационного зонда — экспресс-методы, позволяющие обнаруживать ДНК вируса в патологическом материале уже на ранних стадиях болезни.

Биопробу проводят на норках. На 6—9-й день после заражения вирус обнаруживают в селезенке в титрах 10^5—10^6 $ИД_{50}$. Первые клинические признаки наблюдаются через 40 дней после заражения.

Специфическая серодиагностика. Проводят с целью обнаружения специфических антител в сыворотках крови.

РНИФ ставят общепринятым методом. При этом используют меченую кроличью антисыворотку против IgG норки, в качестве антигена — срезы печени экспериментально зараженных норок и исследуемые сыворотки.

РИЭОФ наиболее широко применяют для прижизненного обнаружения специфических антител у больных норок. В качестве антигена используют экстракты печени экспериментально зараженных норок. Метод отличается высокой чувствительностью и специфичностью

ИФА — иммуноферментный анализ на нитроцеллюлозных фильтрах. Отличается высокой чувствительностью и основан на использовании моноклональных антител.

Иммунитет и специфическая профилактика. Отечественных вакцин до сих пор нет. Разработана и применяется зарубежная инактивированная формолвакцина, которую вводят парентерально по 1—2 мл. Поствакцинальный иммунитет непродолжительный, но позволяет повысить резистентность животных.

Парвовирусная инфекция свиней (ПВИС) — контагиозная вирусная болезнь, проявляющаяся клинически только у супоросных свиноматок и характеризующаяся прохолостами, малочисленными пометами, рождением мумифицированных плодов, мертвых и слабых поросят, реже абортами.

Нарушение воспроизводительной функции свиноматок, как результат присутствия у них парвовируса свиней, было установлено в 1967 г. в Великобритании.

При возникновении болезни в ранее благополучных хозяйствах рождение живых поросят на одну свиноматку в год снижается на 50—60 %, в стационарно-неблагополучных хозяйствах—на 10—20 %. Занесенный в хозяйство вирус в течение 2—3 мес поражает всех животных.

Характеристика возбудителя. Вирус впервые выделил Mayer в 1966 г. из плода абортировавшей свиноматки.

Вирус относится к семейству Parvoviridae и имеет характерную для этого семейства морфологию: вирион кубической симметрии включает 32 капсомера. Диаметр вириона около 20 нм. Суперкапсидная оболочка отсутствует. Вирусный геном представлен односпиральной ДНК с молекулярной массой 1,4 кД. В состав вириона входят 3 полипептида.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. У парвовируса свиней она достаточно высокая. Так, он сохраняет инфекционность при pH 3—9 и 37 °С в течение 1,5 ч. Вирус устойчив к действию ультразвука, что может быть использовано для очистки его от клеточного детрита. В то же время он инактивируется УФ-лучами, формалином, этиленимином, β-пропиолактоном, глутаральдегидом. В помещении вирус сохраняет активность более 4 мес. Для его уничтожения в животноводческих помещениях с успехом применяют 3%-ный раствор гипохлорита натрия, 8%-ный раствор формальдегида и 5%-ный раствор гидроксида натрия, которые инактивируют вирус за 5—20 мин.

Антигенная вариабельность. Заметной вариабельности среди изолятов возбудителя парвовирусной инфекции свиней не установлено. Имеется сообщение об антигенном родстве парвовируса свиней с другими вирусами того же рода.

Антигенная активность. Проявляется индуцированием синтеза вируснейтрализующих, комплементсвязывающих, преципитирующих антител и антигемагглютининов. При этом антисыворотка к каждому из трех структурных белков нейтрализует инфекционную активность полных вирионов, что указывает на наличие вирусспецифических антигенных детерминант на всех вирионных белках парвовируса свиней.

Гемагглютинирующие свойства. Вирус проявляет гемагглютинирующую активность с эритроцитами морской свинки, цыпленка, кошки, крысы, мыши, обезьяны. Чаще это свойство вируса определяют с использованием эритроцитов морской свинки при температуре 4 °С.

Культивирование. Успешно осуществляется в первичных и перевиваемых культурах клеток почек и тестикул поросят, где вирус накапливается в титре $10^6 — 10^8$ $ТЦД_{50}$/мл. В то же время перевиваемая культура клеток СПЭВ, т. е. тоже полученная из почек эмбриона свиньи, нечувствительна к вирусу. Особенностью культивирования и накопления вируса является то, что он хорошо размножается в делящихся клетках, цитопатический эффект характеризуется вакуолизацией и округлением клеток, диффузной грануляцией.

Максимальные концентрации вирусного антигена парвовируса свиней обнаруживаются в ядре клеток через 18—24 ч после заражения.

Клинические признаки. В естественных условиях болеют только свиноматки. Проникший через плаценту в разные сроки супоросности вирус приводит к различной патологии. У свиней, зараженных на ранней стадии супоросности (до 36 дней), т. е. в эмбриональную фазу развития, эмбрионы погибают и рассасываются. Последующая супоросность у таких свиноматок протекает нормально. В случае заражения в более поздние сроки супоросности (до 56 дней) погибают и мумифицируются все плоды или часть из них. Наиболее тяжелые последствия — мертворождения бывают при заражении свиноматок на 56—70-й день супоросности. Заражение в более поздние сроки не сопровождается летальным действием на плоды.

Болезнь у свиноматок протекает, как правило, без видимых симптомов с нарушением лишь репродуктивной функции. В первую неделю после заражения отмечают легкую лейкопению, иногда кратковременное повышение температуры тела. Вирус находится в крови и проявляет тропизм к тканям с резко выраженной пролиферативной активностью. Он проходит через плаценту и инфицирует эмбрионы или плоды. Патогенное действие вируса распространяется только на эмбрионы и плоды до 70-го дня супоросности. В более поздние сроки плоды становятся иммунокомпетентными и на заражение отвечают синтезом антител. Поросята рождаются нормальными, но являются, возможно, всю жизнь, носителями вируса и антител.

Заражение эмбрионов происходит не ранее чем через 9—12 дней после оплодотворения. Все эмбрионы, зараженные в этот период, погибают и рассасываются. При заражении и гибели части эмбрионов беременность протекает нормально, но уменьшается количество поросят в помете.

Заражение плодов (плодная фаза развития), у которых уже происходит кальцификация скелета, ведет не к рассасыванию их, а к гибели и мумификации. Передача вируса от одного плода к другому происходит медленно и они погибают на разных стадиях развития. В результате при опоросе рождаются мумифицированные плоды разной величины, мертвые, слабые и нормальные поросята.

У несупоросных свиней и хряков-производителей вирус не вызывает симптомов болезни. Парвовирус свиней выделяют из тонкого кишечника поросят 2—3-недельного возраста с диарейным синдромом и везикулярными поражениями в области края венчика, а также с повышением температуры тела и рвотой.

Патологоанатомические изменения. У небеременных свиноматок макро- и микроскопических изменений в тканях и органах не обнаружено. У супоросных свиноматок патологоанатомических изменений также не отмечали. Однако гистологическими исследованиями обнаружены фокальные скопления мононуклеарных клеток в эндо- и миометрии и периваскулярные муфты из лимфоидных и плазматических клеток в головном и спинном мозге.

Плоды, инфицированные до периода иммунокомпетентности, имели инъецированные кровеносные сосуды, отек, геморрагии, скопление серозно-кровянистой жидкости в полостях и дегидратацию (мумификацию). Гистологическими исследованиями выявляют обширные зоны некроза во многих тканях и органах, а также внутриядерные тельца-включения.

У плодов, зараженных после наступления иммунокомпетентности, обнаруживают только инфильтрацию мононуклеарными клетками, участвующими в иммунном ответе на введение вируса. Мертворожденные поросята имели признаки менингоэнцефалита.

Локализация вируса. Ко времени гибели плода вирусный антиген накапливается в цитоплазме большинства его клеток и в плаценте. Наибольшее количество вируса обнаруживают в лимфоидных тканях. Вирус может быть выделен из почек, тестикулов, семенной жидкости, слюны и фекалий поросят, рожденных свиноматками, зараженными в первые 55 дней супоросности. От поросят с диарейным синдромом, повышенной температурой тела и рвотой вирус выделяли из тонкого кишечника.

Источник инфекции — больные и переболевшие животные. Занос вируса в благополучное хозяйство возможен как с инфицированными предметами, кормами, где вирус сохраняет инфекционность до 140 дней, так и с ремонтными животными-вирусоносителями. Здоровые свиньи заражаются перорально, аэрогенно, а также половым путем при случке и искусственном осеменении инфицированной спермой. Большое значение для распространения инфекции имеет трансплацентарное заражение плодов. Такие

животные до 8-месячного возраста периодически выделяют вирус с фекалиями, мочой, спермой, носовыми и вагинальными секретами, плацентой, абортированными и мертворожденными плодами.

Диагностика. Признаки нарушения воспроизводительной функции свиноматок дают основание предполагать наличие в хозяйстве парвовирусной инфекции свиней. Однако окончательный диагноз ставят на основании результатов лабораторных исследований.

Лабораторная диагностика. Патологическим материалом для исследования является мумифицированные плоды длиной менее 16 см или легкие таких плодов. Более крупные мумифицированные плоды (старше 70 дней супоросности) и мертворожденные поросята для выделения вируса не пригодны, так как одновременно с вирусом содержат антитела, что мешает выявлению вируса и вирусного антигена.

Для серологического исследования в лабораторию направляют по 10—15 проб сыворотки крови (по 2—3 мл) свиноматок с нарушением воспроизводительной функции. От мертворожденных плодов и новорожденных поросят до приема молозива желательно также направлять сыворотку крови или жидкость из полостей плода.

Индикацию вируса проводят РИФ, которая позволяет обнаруживать вирус во всех тканях плода при отсутствии у плодов антител и лишь в клетках легкого плода в присутствии антител, а также РГА с 0,6%-ной взвесью эритроцитов морской свинки на фосфатном буфере. Материал для исследования — 20—30%-ная суспензия органов абортированных плодов. Реже для той же цели используют ДНК-диагностику; электронную и иммуноэлектронную микроскопию; обнаружение специфических телец-включений. Биопробу в диагностической практике применяют редко.

Выделение вируса в принципе возможно в культуре клеток почек и щитовидной железы свиней. Однако первичные культуры клеток могут быть получены из органов животных, инфицированных парвовирусом свиней, следовательно, контаминированных вирусом. Кроме того, само выделение вируса не всегда удается. В случае проведения работ по выделению вируса индикацию его в культуре клеток проводят по ЦПД или методами, применяемыми для обнаружения вируса в патологическом материале.

Идентификацию выделенного в культуре клеток вируса проводят с помощью РИФ и РТГА.

Серодиагностика. Выполняют с целью обнаружения антител в сыворотке крови свиноматок и плодов как для диагностики заболевания, так и для эпизоотологического обследования хозяйств. Наиболее широко для этой цели применяют РТГА и ИФА.

Перед постановкой РТГА сыворотку крови освобождают от термолабильных (выдерживая при 56 °С 30 мин) и термостабильных (каолином) ингибиторов гемагглютинации, а также неспецифических гемагглютининов (с помощью осадка эритроцитов морской свинки). Реакцию ставят при 4 °С.

Диагноз считают установленным, если в двух и более пробах сыворотки крови свиноматок в разведении 1 : 64 и выше будут обнаружены специфические антитела. Выявление антител в РТГА в сыворотке крови плодов после 70-го дня супоросности и новорожденных поросят до приема молозива свидетельствует о заражении их в матке, поскольку антитела не проходят через плаценту.

Реже в серологической диагностике используются РН (трудоемка), РДП и РСК (необходим концентрированный антиген), которые менее чувствительны при диагностике парвовирусной инфекции свиней, чем РТГА.

Иммунитет и специфическая профилактика. Основную роль в защите против парвовируса свиней играет гуморальный иммунитет, и для полной защиты требуется довольно высокий уровень антител. Колостральный иммунитет поросят, т. е. приобретенные с молозивом антитела, сохраняется до 5—9 мес. Пассивный иммунитет, с одной стороны, защищает животных от инфицирования, с другой — препятствует выработке активного иммунитета. Таким образом, ремонтный молодняк к моменту осеменения становится чувствительным к заражению.

В стационарно-неблагополучных по парвовирусной инфекции хозяйствах нарушение воспроизводительной функции наблюдается в основном у ремонтных свинок. В то же время основные свиноматки в результате неоднократного естественного инфицирования становятся иммунными и беременность у них протекает нормально. В первично инфицированных хозяйствах воспроизводительная функция нарушается у ремонтных и основных свиноматок.

Специфическая профилактика парвовирусной инфекции свиней осуществляется главным образом с помощью инактивированных вакцин. Живыми или инактивированными вакцинами иммунизируют молодых свиноматок не позднее чем за 30 дней до первого оплодотворения. Ревакцинацию проводят перед каждым осеменением. При систематической вакцинации можно снизить ущерб и в конечном итоге освободить хозяйство от инфекции.

2.4.3. ПАРВОВИРУС СОБАК

Парвовирусная инфекция собак (ПВИС, парвовирусный энтерит собак) — контагиозная болезнь, проявляющаяся рвотой, геморрагическим гастроэнтеритом, миокардитом, лейкопенией, дегидратацией и гибелью щенков моложе 5-месячного возраста. Поражения локализуются в тонком кишечнике и лимфоидных тканях.

Заболевание впервые зарегистрировано в Бельгии в 1976 г. Широко распространено по всему миру.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Parvoviridae (от лат. parvus — маленький), роду Parvovirus. Диаметр вирионов 18—26 нм. Вирионы безоболочечные кубического типа симметрии. Капсид состоит из 32 капсомеров диаметром 3—4 нм. Геном представлен односпиральной линейной молекулой ДНК. На концах такая ДНК имеет двуспиральные участки («шпильки»). Значительная часть вирионов содержит минус- и плюс-нить ДНК. Репликация вирусной ДНК и сборка вирионов происходят в ядре клетки с участием полимераз клетки. В вирионах содержатся четыре белка (A, B, C, D).

Антигенная вариабельность и родство. Возбудитель ПВИС по свойствам близок вирусу панлейкопении кошек и возможно является его мутантной формой. Между ними нет физико-химических различий, однако они отличаются по чувствительности к ним клеточных систем и по гемагглютинирующей активности. Так, парвовирус собак размножается в культурах клеток собак и кошек, а парвовирус кошек (панлейкопении кошек) — только в культурах клеток кошек.

Изучением антигенного родства этих вирусов установлено наличие у них общих специфических антигенов. Различия в нуклеотидной последовательности их ДНК составляют менее 1 %.

Обнаружена разной степени антигенная общность всех парвовирусов — собак, кошек, свиней, крыс, мышей, норок и человека. Из-за наличия такого родства для человека небезопасно заболевание животных парвовирусами.

Антигенная активность. У возбудителя ПВИС она проявляется индуцированием синтеза комплементсвязывающих, вируснейтрализующих и антигемагглютинирующих антител, которые обнаруживаются на 5—7-й день после заражения и сохраняются в организме в течение двух лет.

Гемагглютинирующие свойства. Парвовирус собак гемагглютинирует эритроциты свиньи и кошки при 4 °С и pH 5,8—8,2. Однако не все штаммы вируса обладают этим свойством.

Гемадсорбирующая активность вируса не установлена.

Культивирование. Парвовирус собак культивируется в первично-трипсинизированных и перевиваемых культурах клеток собак и кошек, а также в перевиваемой линии Vero. Однако размножение вируса не сопровождается проявлением ЦПД. Для выявления антигена парвовируса собак могут быть использованы РИФ с флуоресцирующей сывороткой против лейкопении кошек, ИФА. Возможно обнаружение и титрование накопившегося в культуре клеток вируса в РГА с эритроцитами свиньи.

Клинические признаки. Заболевание приобретает массовый характер при плотности популяции собак 12 и более на 1 км^2. При

низкой плотности, т. е. менее 6 особей на 1 км^2, инфекция практически прекращается.

Чувствительность собак к парвовирусу зависит от возраста. Чаще заболевают и гибнут щенки 4—5-месячного возраста. Летальность их может достигать 80 %. Среди взрослых собак летальность возможна до 16 %.

Инкубационный период длится до 10 дней. У собак разного возраста форма болезни неодинакова. Это объясняется тем, что парвовирус преимущественно размножается в активно делящихся клетках. Значительное количество митозов наблюдается в тех или иных тканях на определенных этапах развития организма.

Так, сердечную форму болезни наблюдают у щенков 1—2-месячного возраста. Она характеризуется тахикардией, слабым пульсом, рвотой, поносом, отеком легкого, асцитом и гибелью до 96 % животных.

Кишечную форму болезни наблюдают у собак 1—9-месячного возраста. У животных появляются угнетение, рвота, жидкий, зловонный серый, желтоватый или геморрагический кал. Температура тела поднимается до 41,5 °С. На 1—4-й день болезни отмечают выраженную лейкопению (0,3—2,5 тыс/мм^3).

Форма болезни может быть и смешанной, что чаще наблюдается в 1—4-месячном возрасте, причем возможно одновременно поражение и респираторного тракта. Болезнь у них длится 1—2 нед. У щенков 1—2-месячного возраста — 1—4 дня.

Патологоанатомические изменения. Макроскопические изменения представлены геморрагическим воспалением слизистой тонкого и толстого кишечника. Внутренние органы геморрагичны.

Гистологическими исследованиями выявляют некроз эпителия крипт и лимфоидной ткани в пейеровых бляшках, лимфоузлах, тимусе. В эпителиальных клетках и мышечных волокнах сердца нередко встречаются внутриядерные включения. У щенков 1—2-месячного возраста наблюдают подострый фибринозный миокардит. Под электронным микроскопом в ядрах клеток сердечной мышцы выявляют парвовирус собак.

Локализация вируса. Раньше всего, т. е. уже в первый день после заражения, вирус обнаруживается в тимусе, на второй день — в остальных лимфоидных органах, на четвертый день — в эпителии тонкого кишечника. В связи с этим вирус с 3-го по 7-й день после заражения активно выделяется с фекалиями. Чаще антиген парвовируса обнаруживают в дорсальной поверхности языка — 96,3 %; глотки — 81; в слизистой кишечника — 85,2; в костном мозге — 81,6 %; селезенке — 79,7; тимусе — 66,7; мезентериальных лимфоузлах — 60,4 и миндалинах — 58,5 %.

Переболевшие собаки выделяют вирус 3 нед и дольше. Вирусоносительство наблюдали до 6 мес.

Источник инфекции — больные собаки и вирусоносители. Выделение вируса во внешнюю среду происходит с фекалиями в пер-

вые 4—7 дней после заболевания. Передается вирус алиментарным и аэрогенным путями.

В естественных условиях парвовирусная инфекция наблюдается у собак всех возрастов, однако чаще и тяжелее болезнь протекает у щенков до 6-месячного возраста. Болеют также куницы и енотовидные собаки. Летальность среди их щенков достигает 30 %.

Диагностика. Предварительный диагноз на ПВИС ставят на основании эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных. Для подтверждения диагноза проводят лабораторные исследования.

Лабораторная диагностика. В лабораторию направляют пробы фекалий, полученные от больных животных в первые дни болезни, и парные сыворотки крови; от погибших животных берут для исследования сердечные мышцы, тонкий кишечник (чаще тощую кишку), селезенку и головной мозг.

Индикацию вируса в патологическом материале проводят экспресс-методами. Наиболее новый из них «парво-тест», изготовленный фирмой «НПО Нарвак» (рис. 56). Этот иммунохроматографический метод основан на использовании в качестве твердого носителя хроматографических мембран (иммунострипов) с нанесенными на них в различных зонах моноклональными антителами к различным эпитопам белков VP1 и VP2 парвовируса. Меченные коллоидным золотом антитела к VP1 являются конъюгатом, в то время как антитела к VP2 предназначены для фиксации иммунного комплекса. После внесения пробы в зону S иммунострипа иммобилизированный конъюгат связывается с антигеном, присутствующим в исследуемом материале. При этом формируется комплекс антиген + антитело. Полученный иммунный комплекс мигрирует по капиллярам мембраны, и после взаимодействия с немечеными антителами к VP2 фиксируется в зоне Т иммунострипа с появлением поперечной окрашенной полосы. Не связавшийся с антигеном конъюгат мигрирует дальше по мембране и взаимодействует с положительным контролем, иммобилизованным на иммунострипе в зоне С. Появление поперечной окрашенной полосы в этой зоне свидетельствует об активности и специфичности всех компонентов системы. Время проведения анализа 5—20 мин после внесения пробы.

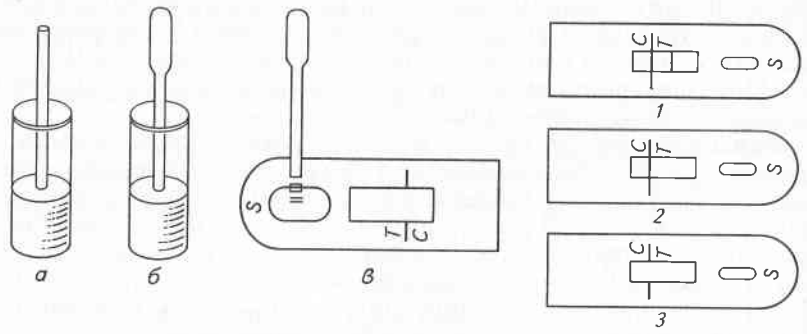


Рис. 56. Иммунохроматографический «парво-тест»:

а — взвесь фекалий; *б* — насасывание взвеси пипеткой; *в* — нанесение взвеси на хроматографическую мембрану; *1* — положительный результат: две видимые полосы — одна в зоне С, другая в зоне Т; *2* — отрицательный результат: только одна видимая полоса в зоне С — животное не инфицировано; *3* — недействительный результат: нет видимой полосы в зоне С

Набор рассчитан на анализ пяти испытуемых проб.

Второй экспресс-метод обнаружения парвовируса — ИФА. Основу ИФА составляет иммунологическая реакция взаимодействия антигена с моноклональными антителами в лунках полистиролового планшета. В дальнейшем полученный комплекс выявляют иммунопероксидазным конъюгатом на основе поликлональных (моноклональных) антител. В случае положительной реакции конъюгат вызывает разложение субстрата — индикаторного раствора и окрашивание содержимого лунок планшета. На подготовку пробы и проведение анализа затрачивается 2,5—3 ч. Для исследования берут пробы фекалий в первые дни болезни, а также участки тонкого и толстого кишечника от павших животных, взятые в первые часы после гибели. Вирусный геном обнаруживается также с помощью ПЦР, в РНГА с антительным диагностикумом и в РГА с формалинизированными эритроцитами свиньи.

Высокорезультативно (до 48 %) обнаружение вирионов парвовируса собак под электронным микроскопом или методом иммунной электронной микроскопии в фекалиях больных животных или в ядрах эпителиальных клеток крипт кишечника.

Выделение вируса возможно с использованием высокочувствительной перевиваемой культуры клеток А-72, полученной из подкожной опухоли собаки. Вирус в культуре клеток выявляют с помощью РИФ.

Идентификация выделенного вируса осуществляется в РИФ, РТГА, РНГА, ИФА.

Ретроспективная серологическая диагностика. Проводится чаще всего в РТГА с использованием выпускаемого для этой цели диагностического набора. Уже на 4-й день болезни титры антигемагглютининов достигают уровня 1 : 5000 — 1 : 16 000. Сыворотки крови считают в РТГА положительными при титре антител начиная с разведения 1 : 160 и выше. У реконвалесцентов титр антигемагглютининов 1 : 1280 — 1 : 2560 обычно держится около одного года, и такие животные устойчивы к повторному заражению.

Ретроспективная серологическая диагностика может быть также проведена с помощью РНГА, РН, ИФА, ВИЭФ (встречного иммуноэлектрофореза).

Дифференциальная диагностика. ПВИС следует дифференцировать от алиментарного и паразитарного гастроэнтеритов, чумы,

при которой бывает очень высокая температура тела, конъюнктивита, ринита и поражения центральной нервной системы. Следует отличать ПВИС также от вирусного гепатита и коронавирусной инфекции собак.

Иммунитет и специфическая профилактика. Иммунитет при ПВИС включает в себя как местный секреторный, так и гуморальный. Для заболевания характерен быстрый иммунный ответ с обнаружением антител к концу первой недели как в сыворотках крови, так и в фекалиях.

Разработана и применяется в нашей стране инактивированная культуральная вакцина против парвовирусного энтерита собак. Щенков собак иммунизируют дважды с интервалом 14 дней с 60-дневного возраста. Ревакцинацию проводят в возрасте 7 мес, а собакам старше года — один раз в год.

Применяют также ассоциированные лиофилизированные живые вакцины с содержанием аттенуированного штамма парвовируса собак (Мультикан-2, -4, -6, -8) и с содержанием инактивированного вируса (Мультикан-7). Щенят вакцинируют в возрасте 8—10 нед и через 21 день после первой вакцинации, а затем взрослых собак вакцинируют ежегодно.

Для специфической профилактики ПВИС разработаны и успешно используются гетерологичные вакцины из вируса пенлейкопении кошек как инактивированная, так и живая. Разработана субъединичная вакцина против ПВИС и синтетическая пептидная вакцина.

Для экстренной профилактики и лечения ПВИС у щенков применяют поливалентный иммуноглобулин, выделенный из гипериммунной сыворотки. С лечебной целью иммуноглобулин вводят объемом 2 мл 1—3 раза с интервалом 12—24 ч. Сыворотка поливалентная против ПВИС и других инфекций применяется по той же схеме. По истечении указанного времени животных подвергают профилактической вакцинации.

2.4.4. ВИРУС ПАНЛЕЙКОПЕНИИ КОШЕК

Панлейкопения кошек (ПЛК, парвовирусная инфекция кошачьих, агранулацитоз, чума кошек, кошачья лихорадка, инфекционный энтерит кошек, инфекционный ларинготрахеит кошек) — высококонтагиозная и обычно смертельно протекающая болезнь домашних кошек, клинически проявляющаяся панлейкопенией, лихорадкой, рвотой, сильной диареей и обезвоживанием организма.

Болезнь распространена на всех континентах от Америки до Европы, Индии и других стран.

Характеристика возбудителя. Вирус впервые идентифицировал Верже Христофор в 1928 г. во Франции. Он относится к семейству

Parvoviridae, имеет односпиральную ДНК. Диаметр вириона 20—24 нм. Вирионы имеют 32 капсамера, из которых 20 представляют собой гексоны и 12 пентоны. Суперкапсидной оболочки нет. Встречают вирионы вытянутой формы диаметром 9,5—12 нм.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Устойчивость вируса установлена к фенолу, эфиру, хлороформу, кислотам, трипсину. Вирус хорошо сохраняется при 4 и 25 °С в течение 13 мес, а также при 56 °С 60 мин и достаточно хорошо в 50%-ном глицерине.

Антигенная структура. Не изучена.

Антигенная активность. Проявляется индуцированием у кошек образования вируснейтрализующих антител и антигемагглютининов. Первые из них появляются на 3-й день после клинического выздоровления и сохраняются несколько лет.

Антигенная вариабельность. У вируса ПЛК она не установлена. В 1967 г. Джонсон и другие показали серологическую связь этого вируса с вирусами атаксии кошек и энтерита норок.

Гемагглютинирующая активность. У разных штаммов вируса она неодинакова. Специфическая гемагглютинация проявляется после 2 ч инкубации при 4 °С и использования 0,01 М фосфатного буфера с pH 6,8.

Культивирование вируса. Оно возможно в культуре клеток почки, селезенки, лимфоузлов и надпочечников котят. Вирус вызывает утончение и шероховатость клеточного монослоя, а также поражает клетки в состоянии активного митоза через 2—3 ч после клеточного деления. Максимальное развитие цитопатических изменений наступает на 4—5-й день после заражения клеточного монослоя. В клетках появляются внутриядерные эозинофильные включения. Титры культурального вируса равняются 100—10000 $ТЦД_{50}$ /0,1 мл. Кроме того, вирус хорошо размножается в диплоидных клетках слизистой оболочки языка, тимуса и почек кошек, львов, кошачьей фибросаркомы.

Кошки и норки заболевают при различных способах заражения. У котят наблюдают типичную диарейную форму панлейкопении. Животные погибают на 6—9-й день после заражения.

Клинические признаки. Для заболевания характерна сезонность. Так, в США лейкопению кошек регистрируют главным образом в июле—сентябре. Чаще болеют кошки в возрасте 7—12 мес.

При контактном заражении инкубационный период длится не более 6 дней. Болезнь протекает остро и сопровождается высокой температурой (до 42 °С), рвотой и лейкопенией (50—100 лейкоцитов в 1 $мм^3$). Считается, что все случаи лейкопении, когда лейкоцитов меньше 1000 в 1 $мм^3$, вызваны вирусом.

Заболевание начинается резким изменением температуры тела, которая вначале повышается в течение 24 ч, затем снижается и вновь повышается через 48 ч. Одновременно ухудшается общее состояние животного, оно слабеет и худеет. В результате частой

рвоты и стойкой кровянистой диареи происходит обезвоживание организма. Наблюдается истечение из носа и глаз. С 3-го по 5-й день болезни особенно выражены нейтропения и лимфопения. Активность ферментных систем лимфоидной ткани и тонкого кишечника изменяется. Так, гиперплазия ретикулярных клеток сопровождается пролиферацией лимфобластов.

Хроническое течение болезни проявляется устойчивым катаром кишечника, анемией и кахексией. У многих кошек заболевание протекает субклинически. При клинически выраженной болезни погибают 65—90 % кошек.

Патологоанатомические изменения. При вскрытии павших животных находят слизисто-гнойный экссудат на слизистой оболочке носа и глаз, острый энтерит, увеличение селезенки, набухание мезентеральных лимфоузлов и полужидкий апластический костный мозг.

В костном мозге павших животных гистопатологические изменения проявляются гранулопоэзом. В клетках эпителия кишечника и в лимфоузлах обнаруживают внутриядерные эозинофильные включения.

Локализация вируса. Этот вопрос пока изучен недостаточно. Переболевшие кошки и норки могут некоторое время выделять вирус.

Источник инфекции. Инфекция может передаваться при прямом контакте с больными животными и непрямым путем, т. е. через инфицированные домашние вещи. Предполагается возможность естественной передачи болезни инфицированными членистоногими (особенно блохами) или гельминтами.

Диагностика. Для выделения вируса из трупов берут кусочки селезенки, мозга и двенадцатиперстной кишки в первые часы после смерти. Часто вирус выделяют от здоровых на вид котят или из фекалий больных животных.

Лабораторная диагностика. Обнаруживают вирус с помощью ПЦР. Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

Экспресс-методом диагностики панлейкопении кошек является «парво-тест», изготовленный фирмой «НПО Нарвак» (см. рис. 56). (Технику постановки реакции см. с. 244.)

Обнаружить антиген панлейкопении кошек в фекалиях больных животных можно иммуноферментным анализом с использованием моноклональных и поликлональных антител. Время проведения анализа 2,5—3 ч.

Выделение вируса осуществляют в культуре клеток.

Идентифицируют его с помощью методов, названых для обнаружения вируса, или в РН, РТГА.

Ретроспективная диагностика. Диагностику по титрам антител в парных сыворотках не проводят, считая эти исследования не актуальными.

Иммунитет и специфическая профилактика. Переболевшие животные приобретают стойкий иммунитет. Материнские антитела

могут некоторое время защищать котят от заболевания. Если в этот период котята контактируют с вирусом, у них может развиваться субклиническая иммунизирующая инфекция.

Активную иммунизацию кошек проводят живым аттенуированным или инактивированным вирусом.

В нашей стране выпускается ассоциированная инактивированная вакцина Мульнтифел-4, изготовленная из штаммов возбудителей наиболее опасных инфекционных болезней кошек. Вакцину вводят подкожно в области лопатки котятам в возрасте 8—12 нед, затем повторно через 21—28 дней. Далее животных ревакцинируют ежегодно.

2.5. СЕМЕЙСТВО ПИКОРНАВИРУСОВ

Семейство Picornaviridae (от англ. pico — маленький, rna — РНК) — большая группа вирусов, поражающая позвоночных. Вирионы пикорнавирусов представляют собой лишенные суперкапсидной оболочки частицы кубической симметрии диаметром 22—30 нм. Капсид состоит из 60 структурных единиц. Липидов и углеводов в составе вирионов не обнаружено. Молекулярная масса вирионов — 8—9 МД, плавучая плотность в CsCl 1,33 — 1,45 г/см^3, коэффициент седиментации — 140—165S.

Геном пикорнавирусов представлен односпиральной линейной плюс-РНК с молекулярной массой 2,4—2,7 МД. На 3′-конце геномной РНК имеется поли-А последовательность, на 5′-конце — ковалентно связанный белок VPg (2,4 кД).

В вирионах пикорнавирусов обнаружены 4 полипептида, которые в порядке уменьшения молекулярной массы обозначены как VP1, VP2, VP3, VP4.

Вирусная РНК инфекционна и может выполнять функции как геномной, так и иРНК. Размножаются пикорнавирусы в цитоплазме клеток. Вирионная РНК транслируется с образованием гигантского полипептида (240—250 кД), который подвергается последовательному расщеплению до функционально активных структурных и неструктурных белков. После трансляции вирионная РНК служит матрицей для образования минус-РНК. Последняя, в свою очередь, служит матрицей для синтеза плюс-РНК. Репликация вирусной РНК происходит в комплексах, ассоциированных с цитоплазматическими мембранами. Сборка вирионов происходит в цитоплазме клеток в несколько этапов. Зрелые вирионы освобождаются из клетки при ее разрушении путем лизиса. В процессе морфогенеза образуются различные морфологические структуры, с последовательно возрастающими коэффициентами седиментации.

Большинство пикорнавирусов специфичны одному хозяину или небольшому количеству их видов. Исключения составляют

вирус ящура и вирус энцефаломиокардита. Распространение инфекции происходит горизонтально — алиментарно или аэрозольно. Сведений о существовании членистоногих переносчиков (векторов) нет, хотя вирусы энцефаломиокардита выделяли от клещей и москитов.

Обычно инфекция цитолитическая, однако персистентная инфекция также часто встречается.

Семейство Picornaviridae состоит из шести родов: Enterovirus, Rhinovirus, Cardiovirus, Aphtovirus, Hepatovirus и Parechovirus.

Род Enterovirus. Включает полиовирусы человека — типов 1 (прототипный вирус), 2 и 3, энтеровирусы — коксакивирусы человека, энтеровирусы крупного рогатого скота и свиней, вирус болезни Тешена, вирус везикулярной болезни свиней и др. Вирусы репродуцируются в основном в клетках желудочно-кишечного тракта, но могут накапливаться и в других тканях, например в нервной, мышечной и др. Клинически болезнь может характеризоваться менингитами, энцефалитами, миелитами, миокардитами, конъюнктивитами, энтеритами и везикулярными поражениями.

Род Rhinovirus. Включает несколько десятков серотипов риновирусов человека и 3 серотипа риновируса крупного рогатого скота. Прототипный вирус — риновирус человека А. Вирусы вызывают патологию верхних и нижних дыхательных путей, распространяются аэрогенно.

Род Cardiovirus. Включает вирусы энцефаломиокардита (прототипный вирус). Вирус энцефаломиокардита был выделен от животных, более чем 30 видов, включая млекопитающих, птиц и членистоногих. Клиническая картина характеризуется энцефалитами и миокардитами. К этому роду относится вирус вилюйского энцефалита, который является этиологическим агентом дегенеративной неврологической болезни человека, наблюдаемой в регионе Вилюйской долины в Сибири.

Род Aphtovirus. Включает вирусы ящура (прототипный вирус типа О). В настоящее время установлено 7 типов вируса ящура: А, О, С, Азия 1, Sat1, Sat2, Sat3. В этот род относят еще вирус ринита лошадей А (серотип 1). Вирус ящура поражает в основном парнокопытных животных. Афтовирусы вызывают поражения слизистой оболочки ротовой полости, бесшерстных участков кожи головы, вымени, венчика и области межкопытной щели у парнокопытных животных, а у молодых животных возможен фатальный миокардит.

Род Hepatovirus. Включает вирусы гепатита А человека (прототипный вирус) и обезьян. Вирус инфицирует эпителиальные клетки тонкого кишечника и гепатоциты приматов. Клинически болезнь проявляется лихорадкой, желтухой, нарушением пищеварения, брюшными болями, иногда диареей. Передается вирус главным образом фекально-оральным путем. Предполагают, что к этому роду относится вирус, вызывающий энцефаломиелит у молодняка кур, фазанов, перепелов и индеек.

Род Parechovirus. Включает два серотипа парэховируса человека. Вирусы изучены недостаточно. Известно, что инфекция встречается в основном среди детей раннего возраста с признаками поражения желудочно-кишечного и респираторного трактов.

2.5.1. ВИРУС ЯЩУРА

Ящур — остропротекающая высококонтагиозная болезнь парнокопытных, проявляющаяся лихорадкой, везикулярным поражением слизистых оболочек рта, кожи венчика и вымени, у молодых животных — поражением миокарда и скелетных мышц. Ящур регистрируется во многих странах мира.

В естественных условиях к вирусу ящура восприимчивы домашние и дикие парнокопытные. Могут заражаться и бессимптомно переболевать собаки и кошки. Человек заражается редко при употреблении необеззараженного молока от больных животных.

Характеристика возбудителя. РНК-содержащий вирус относится к семейству Picornaviridae, роду Aphtovirus. Геном представлен единой односпиральной линейной плюс-РНК. Вирионы вируса представляют собой лишенные суперкапсидной оболочки частицы кубической симметрии диаметром 22—30 нм.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус ящура устойчив к эфиру, хлороформу, фреону. Быстро инактивируется в среде с pH 6,0 и ниже. Наиболее стабилен при pH 7,0—7,5. Хлорная известь, креолин, крезол, фенол убивают вирус лишь через несколько часов. Растворы щелочей (2%-ные) инактивируют его за 10 мин. Вирус устойчив к влиянию факторов внешней среды; афтозная лимфа, содержащая вирус, инактивируется при температуре 31 °С за 24 ч, в молоке при температуре от 66 до 78 °С вирус погибает через 1 мин. Низкие температуры его консервируют: при минус 40 — минус 70 °С сохраняет биологические свойства несколько лет. В сточных водах вирус выживает до 103 дней. Хороший консервант — 50%-ный раствор глицерина на фосфатном буфере, в нем при 4—8 °С вирус сохраняется в течение 40 дней. Лучшие дезинфицирующие средства — 2- или 3%-ные горячие растворы гидрокарбоната натрия и 1%-ный раствор формальдегида.

Антигенная структура. Основные структурные белки вируса ящура — VP1, VP2, VP3 и VP4. Белок VP1 расположен поверхностно и обусловливает индукцию вируснейтрализующих антител, которые защищают животное от вирулентного вируса.

В вируссодержащей суспензии присутствуют инфекционные и неинфекционные вирусные частицы: 140S — полные вирионы; 75S — капсиды без РНК; 12S—14S — белковые субъединицы и Via-антиген, который находится в инфицированных клетках, но не

является составной частью вириона. Все названные компоненты обладают антигенными свойствами, но иммуногенными являются лишь 140S- и 75S-частицы. Инфекционностью обладают только 140S-частицы (полные вирионы).

Антигенная вариабельность. В настоящее время известны 7 антигенных типов вируса ящура: А, О, С, Сат-1, Сат-2, Сат-3 и Азия-1. Внутри основных типов существуют варианты, или подтипы, отличающиеся друг от друга. Тип А имеет 32 варианта, тип О — 11 вариантов, тип С — 5, тип Сат-1 — 7 вариантов, тип Сат-2 — 3 варианта, тип Сат-3 — 4 варианта и тип Азия-1 — 2 варианта. Антигенные типы и варианты, установленные в РСК, различаются и иммунологически. Переболевшие животные приобретают выраженный иммунитет к гомологичному вирусу. Следовательно, для специфической профилактики ящура на каждый тип вируса должна быть вакцина.

Антигенная активность. В организме естественно восприимчивых животных вирус индуцирует образование вируснейтрализующих, комплементсвязывающих и преципитирующих антител.

Культивирование вируса. Вирус культивируется на естественно восприимчивых и лабораторных животных: новорожденных мышатах и крольчатах, хомяках 60-дневного возраста, взрослых морских свинках. Хорошо размножается в культуре клеток почек восприимчивых животных, в культуре эксплантантов эпителия языка крупного рогатого скота и в некоторых перевиваемых линиях клеток (ВНК-21, СПЭВ и др.) с выраженным цитопатическим действием.

Экспериментальная инфекция. Легко воспроизводится путем аппликации вируссодержащего материала в скарифицированную поверхность слизистой языка, десен крупного рогатого скота, овец и свиней (в пятачок), а также при подкожной инокуляции вируса новорожденным мышатам или крольчатам и внутрикожном введении материала в плантарную поверхность задних лапок морских свинок.

Гемагглютинирующие свойства. Вирус ими не обладает.

Клинические признаки. Инкубационный период длится 1—3 дня, иногда до 7—10 дней. Самый характерный признак данного заболевания у животных — везикулярное поражение слизистых рта (рис. 57), кожи венчика и вымени. У крупного рогатого скота и свиней ящур протекает остро, у взрослых животных, как правило, доброкачественно. Заболевание очень быстро распространяется. Вначале отмечают ухудшение аппетита, повышенную саливацию, повышение температуры тела (до 40,5—41,5 °С). На 2—3-й день на внутренней поверхности губ и на языке появляются афты. У некоторых животных афты образуются в области межкопытной щели и на вымени. Заболевание конечностей сопровождается хромотой. Через сутки афты разрываются и образуются эрозии (цв. вкл., рис. 43—46). Через 2—3 нед эрозии заживают и животные выздоравливают. У свиней, овец и коз поражение наблюдают чаще на конечностях и реже на слизистых оболочках рта. Довольно часто поражается вымя. У молодняка ящур обычно протекает злокачественно (гибель — 80 % и более), афт, как правило, нет.



Рис. 57. Слюнотечение у больной ящуром коровы

Патологоанатомические изменения. При вскрытии павших молодых животных отмечают геморрагическое воспаление кишечника и дегенеративные изменения в мышцах сердца («тигровое» сердце), подобные изменения находят в скелетных мышцах.

Локализация вируса. От больных животных вирус можно выявить уже в инкубационный период из молока, спермы, слюны (за 4—7 дней до клинических признаков). Наибольшее количество вируса содержится в эпителии и жидкости везикул (до 10^8 ИД/г). Экскреты и секреты больных животных инфекционны более 10 дней. Выделяется вирус и с выдыхаемым воздухом. Переболевание может сопровождаться длительным вирусоносительством. Около 50 % крупного рогатого скота может выделять вирус в течение 8 мес, а некоторые — до двух лет. У свиней персистентного носительства вируса не установлено. В стадах буйволов инфекцию в течение многих лет поддерживают вирусоносители и животные со скрытым течением инфекции.

Источником инфекции служат больные животные и вирусоносители. Весьма существенна эпизоотологическая роль диких парнокопытных. Вирус очень контагиозен, поэтому болезнь быстро распространяется среди восприимчивых животных. В распространении ящура серьезную роль играют продукты и сырье животного происхождения, а также предметы ухода, навоз и корма, загрязненные выделениями больного скота. Переносчиками инфекции могут быть и невосприимчивые к ящуру животные (собаки, кошки, лошади и птицы).

Диагностика. Диагноз на ящур ставят на основании эпизоотологических данных (высокая контагиозность и избирательное поражение только парнокопытных), клинических признаков (везикулярное поражение слизистых оболочек рта, кожи, конечностей и вымени), патолого-анатомических изменений (при гибели молодняка — поражение кишечника и мышц сердца) и результатов лабораторных исследований.

Диагностировать ящур по клиническим признакам довольно легко, но для врача хозяйства важно знать, каким типом вируса вызвано заболевание, чтобы применять соответствующую вакцину. Тип вируса определяют в лаборатории.

Взятие и подготовка материала. Для лабораторных исследований от 2–3 больных животных отбирают не менее 5 г стенки и содержимого афт на слизистой оболочке языка (у крупного рогатого скота), на пятачке (у свиней), на коже венчика и межпальцевой щели (у крупного и мелкого рогатого скота, свиней, верблюдов и др.). При отсутствии афт берут кровь животных в момент температурной реакции, из трупов молодняка животных всех видов — лимфатические узлы головы и заглоточного кольца, поджелудочную железу и мышцу сердца. Для исследования на вирусоносительство берут пищеводно-глоточную слизь (специальным зондом).

Материал необходимо получать так, чтобы предупредить вынос вируса за пределы неблагополучного очага и лаборатории, обезопасить персонал, работающий с инфекционным материалом. Для этого: а) ветврач хозяйства должен иметь определенные навыки взятия материала от больных животных; б) необходимо подготовить все для отбора материала — пинцеты, ножницы, салфетки, толстостенные флаконы, лейкопластырь, резиновые пробки, 50%-ный раствор стерильного глицерина на изотоническом растворе хлорида натрия, термос с охлаждающей смесью, дезраствор — 2%-ный раствор NaOH или 1%-ный раствор уксусной или молочной кислоты; спецодежду — халаты, комбинезоны, косынки или шапочки, маски, резиновые сапоги, перчатки и т. д. Все необходимое помещают в контейнер и едут в неблагополучный очаг, где, прежде чем войти в помещение с больными животными, переодеваются; в) после взятия материала от больных животных инструменты, маску, перчатки погружают в дезраствор; наружную поверхность флаконов и термоса обрабатывают дезраствором. В санпропускнике снимают всю одежду и принимают душ.

В носовой полости у людей вирус ящура переживает до 7 дней, следовательно, в течение этого времени после посещения неблагополучного хозяйства нежелателен контакт со здоровыми парнокопытными животными.

Пробы материала без признаков разложения помещают во флаконы с завинчивающимися или притертыми пробками и замораживают, а при отсутствии условий замораживания — заливают консервирующей жидкостью (50%-ным стерильным раствором глицерина на изотоническом растворе NaCl). На флаконы наклеивают этикетки с указанием вида животных, наименования материала, его количества, даты отбора и адреса отправителя. Флаконы ставят в непроницаемый металлический контейнер, опечатывают и помещают в термос со льдом, который тоже опечатывают. К материалу прилагают подписанное врачом сопроводительное письмо, в котором указывают: дату взятия материала, от животных какого вида и какой материал взят, сообщают эпизоотическую обстановку по ящуру в хозяйстве, имя врача. Материал отправляют с нарочным. Для работы с вирусом ящура в лаборатории выделяют

отдельную комнату (бокс с предбоксником), где должно быть необходимое оборудование и материалы для проведения диагностической работы (подготовка материала, постановка РСК, биопробы и т. д.). При работе в боксе полностью сменяют спецодежду и обувь, надевают резиновые перчатки и маску. После работы ничего не обезвреженного выносить из бокса нельзя. Посуду и инструменты кипятят, спецодежду погружают в контейнер для автоклавирования; столы, пол, стены обрабатывают дезинфицирующим раствором с последующим облучением УФ-лучами.

В лаборатории ведут строгий учет поступившего материала и его расход с точностью до 1 мг. Поступивший в лабораторию материал хранят до исследования и в период использования в закрытом на ключ и опечатанном холодильнике. По окончании работы составляют акт на уничтожение оставшегося от исследования материала и животных после биопробы.

Лабораторные исследования на ящур включают:

обнаружение и идентификацию антигена вируса ящура в РСК (определение его типовой и вариантной принадлежности);

обнаружение и титрование антител к вирусу ящура у переболевших животных (реконвалесцентов) в реакции радиальной иммунодиффузии (РРИД) и непрямой реакции иммунофлуоресценции (НРИФ).

Обнаружение и идентификация антигена вируса ящура с помощью РСК. Компоненты реакции: испытуемые антигены из эпизоотических штаммов вируса от заболевших животных; сыворотки морских свинок, гипериммунизированных стандартными типовыми и вариантными штаммами вируса ящура (биофабричного производства); антигены контрольные — из типовых и вариантных штаммов вируса ящура (биофабричного производства); комплемент — свежая или сухая нормальная сыворотка морских свинок; гемолизин биофабричного производства; эритроциты барана — в виде 2%-ной взвеси на физиологическом растворе; 0,85%-ный раствор химически чистого хлорида натрия на дистиллированной воде; набор* специфических сывороток и антигенов к другим вирусам, вызывающим везикулярные поражения.

РСК ставят в различных объемах: в общем объеме 1 мл — берут 0,2 мл каждого компонента, в общем объеме 0,5 мл — берут 0,1 мл каждого компонента или микрометодом — общий объем 0,125 мл, при этом каждый компонент равен 0,025 мл.

Приготовление антигена вируса ящура. Стенки афт от больных животных отмывают от консервирующей жидкости физиологическим раствором pH 7,4—7,6, высушивают фильтровальной бумагой, взвешивают, измельчают и тщательно растирают в фарфоровой ступке со стерильным битым нейтральным стеклом до по-

* При исследовании материала от свиней в РСК включают специфические антигены и сыворотки к вирусу везикулярной болезни свиней.

лучения однородной массы, к которой добавляют двойное по отношению к массе афт количество физиологического раствора (pH 7,4—7,6), т. е. на 1 г афт — 2 мл раствора. Полученную 33%-ную суспензию экстрагируют при комнатной температуре 2 ч, промораживают при минус 10 — 20 °С в течение 5 — 18 ч. После размораживания центрифугируют 15—30 мин при 3000—5000 мин$^{-1}$. Надосадочную жидкость инактивируют при 58 °С 40 мин. После инактивации, если в жидкости остаются хлопья, ее центрифугируют повторно 10—15 мин при 3000 мин$^{-1}$ и затем используют в качестве антигена в РСК.

Этапы постановки РСК.

1. Титрование гемолизина. Проводят при получении новой серии по общепринятой методике. В главный опыт берут гемолизин в 4-кратной концентрации от его предельного титра (рабочее разведение).

2. Приготовление гемолитической системы (гемсистемы). Для этого смешивают гемолизин в рабочем разведении с равным количеством 2%-ной взвеси эритроцитов барана.

3. Титрование комплемента. Проводят в гемолитической системе в день постановки главного опыта по общепринятой методике. Для главного опыта РСК комплемент берут с излишком в 1 % от его титра в гемсистеме. Правильно взятая рабочая доза комплемента — непременное условие нормального течения реакции, что обеспечивает достоверность результатов.

4. Приготовление рабочего разведения типоспецифических сывороток. В главный опыт для определения типа вируса ящура сыворотки используют в удвоенном титре (от предельного титра), например, если предельный титр сыворотки составляет 1 : 40, то рабочий титр будет 1 : 20.

5. Приготовление рабочего разведения типоспецифических антигенов. Антигены также используют в удвоенных титрах, например, если предельный титр равен 1 : 6, то рабочий титр будет 1 : 3.

6. Испытуемый антиген в реакции исследуют цельным (33%-ная взвесь) и в разведениях 1 : 2, 1 : 4 и 1 : 8.

7. Постановка главного опыта для определения типа вируса ящура. Одновременно с главным опытом ставят контроль всех специфических ящурных антигенов и сывороток согласно схеме. Компоненты разливают в следующем порядке (см. схему главного опыта, табл. 5): 1) специфические сыворотки в рабочем титре по 0,2 мл для каждой сыворотки — один ряд пробирок по вертикали; 2) специфические антигены в рабочем титре по 0,2 мл — в первые семь рядов по горизонтали, для каждого антигена один ряд; 3) испытуемый антиген в разведениях по 0,2 мл — для каждого разведения один ряд пробирок по горизонтали; 4) физиологический раствор по 0,2 мл — в последний ряд по горизонтали (контроль сывороток) вместо антигена и в последний ряд по вертикали (контроль антигенов) вместо сывороток; 5) комплемент по 0,2 мл

в рабочем разведении — во все пробирки главного опыта. Пробирки осторожно встряхивают и помещают в водяную баню на 20 мин при 37—38 °С; 6) во все пробирки наливают по 0,4 мл гемолитической системы. Пробирки снова встряхивают и помещают в водяную баню на 30 мин при 37 — 38 °С.

5. Схема главного опыта при определении типа вируса ящура

Антигены	Разведение рабочего титра антигенов	Сыворотки							Контроль антигенов
		А, титр 1 : 30	О, титр 1 : 40	С, титр 1 : 20	Азия-1, титр 1 : 30	Сат-1, титр 1 : 30	Сат-2, титр 1 : 20	Сат-3, титр 1 : 30	
		Разведение рабочего титра сывороток							
		1 : 15	1 : 20	1 : 10	1 : 15	1 : 15	1 : 10	1 : 15	
А, титр 1 : 4	1 : 2	++++	–	–	–	–	–	–	–
О, титр 1 : 6	1 : 3	–	++++	–	–	–	–	–	–
С, титр 1 : 8	1 : 4	–	–	++++	–	–	–	–	–
Азия-1, титр 1 : 8	1 : 4	–	–	–	++++	–	–	–	–
Сат-1, титр 1 : 8	1 : 4	–	–	–	–	++++	–	–	–
Сат-2, титр 1 : 6	1 : 3	–	–	–	–	–	++++	–	–
Сат-3, титр 1 : 4	1 : 2	–	–	–	–	–	–	++++	–
	Ц	++++	–	–	–	–	–	–	–
Испытуемый антиген	1 : 2	+++	–	–	–	–	–	–	–
	1 : 4	++	–	–	–	–	–	–	–
Контроль сывороток		–	–	–	–	–	–	–	–

Примечание. По представленным результатам все стандартные антигены и сыворотки активны и типоспецифичны. Испытуемый антиген относится к типу А.

Учет реакции ведут через 5 — 10 мин после водяной бани, и окончательный результат получают через 10 — 12 ч. Степень задержки гемолиза оценивают в крестах: (++++) — 100%-ная задержка гемолиза; (+++) — 75%-ная; (++) — 50%-ная; (+) — 25%-ная задержка гемолиза; (–) — полный гемолиз.

Если испытуемый антиген гомологичен специфическим антителам, то будет задержка гемолиза и реакция будет положительной; если же гомологичные антитела отсутствуют, реакция отрицательная и наблюдается полный гемолиз (см. табл. 5.)

При производственной необходимости после определения типовой принадлежности вируса ящура устанавливают его подтип (вариант). Для этого ставят РСК по той же методике, но используют вариантные сыворотки и вариантные антигены установленного типа. Причем вариантные сыворотки используют в предельном титре, а антигены в удвоенном.

Антиген (исследуемый) относят к тому варианту, с сывороткой которого он дает положительную реакцию в более высоких разведениях (табл. 6).

6. Примерный результат РСК при определении вариантной принадлежности эпизоотического штамма вируса ящура

Вариантные антигены	Разведение антигенов	Вариантные сыворотки в предельных титрах				Контроль антигенов
		$A_{ст}$	A_7	A_{20}	A_{22}	
$A_{ст}$, титр 1 : 4	1 : 2	++++	–	–	–	–
A_7, титр 1 : 8	1 : 4	–	++++	–	–	–
A_{20}, титр 1 : 6	1 : 3	–	–	++++	–	–
A_{22}, титр 1 : 8	1 : 4	–	–	–	++++	–
	ц	++++	++++	++++	++++	–
Антиген испытуемый (эпизоотический)	1 : 2	++++	++++	++++	++++	–
	1 : 4	+++	++	++	++++	–
	1 : 8	++	+	+	++++	–
	1 : 16	+	±	±	+++++	–
	1 : 32	–	–	–	+++	–
Контроль сывороток		–	–	–	–	–

З а к л ю ч е н и е. Испытуемый штамм относится к варианту A_{22}.

Когда доставленного из хозяйства вирусного материала недостаточно для исследования в РСК, проводят его расплодку на культуре клеток или на 3–6-дневных мышатах-сосунах, или на взрослых морских свинках*. Мышатам исследуемую суспензию вводят подкожно в области спины в дозе 0,1–0,2 мл, морским свинкам — внутрикожно в подушечки обеих задних конечностей в дозе 0,2—0,5 мл. За животными наблюдают 5–7 дней.

В случае гибели мышат из их тушек готовят антиген для РСК. У морских свинок в положительных случаях на лапках образуются афты; стенки афт и их содержимое используют в РСК. При необходимости проводят 2–3 «слепых» пассажа. Пробу исследуемого материала считают отрицательной, если в третьем пассаже не будет отмечено дегенерации клеток и падежа белых мышей, а при исследовании полученных из них суспензий в РСК не будет обнаружен антиген вируса ящура.

Ретроспективная диагностика. Материалом для исследования на наличие антител к вирусу ящура служат сыворотки крови животных, подозреваемых в переболевании ящуром или другими везикулярными болезнями. Сыворотки крови должны быть взяты не ранее чем через 7 дней с момента появления у животных признаков везикулярного заболевания. На исследование следует направлять 5—10 проб сыворотки от животных каждой возрастной группы. При сомнительных результатах первичного исследования необходимо отобрать кровь повторно от тех же животных через 7—10 дней.

* На проведение такой работы необходимо разрешение вышестоящих ветеринарных органов и наличие в диагностической лаборатории условий строгого санитарного режима.

Сыворотку, полученную общепринятым методом, консервируют антибиотиками (по 500 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина) или замораживают при минус 20 °С. На исследование направляют от каждого животного не менее 5 мл сыворотки в термосе со льдом.

В лаборатории сыворотку исследуют с помощью реакции радиальной иммунодиффузии (РРИД) и реакции непрямой иммунофлуоресценции (НРИФ).

РРИД. Сущность реакции заключается в формировании зоны специфической преципитации вирусных антигенов антителами, включенными в состав агарового геля. РРИД типоспецифична.

Для постановки реакции расплавленный 2%-ный агар смешивают с равным объемом нагретой до 50—55 °С испытуемой сыворотки в разведениях 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 и т. д. до 1 : 320 и наносят по 4 мл на предметное стекло. В застывшем агаре вырезают лунки (диаметром 4—7,7 мм), которые заполняют эталонными типовыми антигенами. Затем стекла помещают во влажную камеру при температуре 37 °С. Результаты учитывают через 6—7 ч и окончательно через 18 ч.

Положительная реакция характеризуется образованием кольца преципитации в виде опалесцирующей зоны вокруг лунки с антигеном, гомологичным возбудителю, вызвавшему заболевание (цв. вкл., рис. 47).

Антитела, обнаруженные в испытуемой пробе сыворотки, относят к тому серотипу, с антигеном которого они дали положительную реакцию. Их титром считают максимальное разведение испытуемой сыворотки, с которым наблюдается положительная реакция.

После переболевания животных титры антител обычно превышают 1 : 160.

НРИФ. Данная реакция основана на том, что наличие антител в сыворотке крови переболевших животных выявляет специфическое свечение (комплекса антиген + антитело), а при использовании сывороток от вакцинированных животных свечение комплекса не наблюдается.

Техника постановки заключается в следующем. На препарат из культуры клеток ВНК-21, ПЭК, ПЭС, инфицированных вирусом ящура любого типа, наносят испытуемую сыворотку в разведении 1 : 10 и 1 : 20; инкубируют во влажной камере при 37 °С 30 мин; отмывают несвязавшиеся антитела; подсушивают на воздухе и окрашивают смесью рабочих разведений флуоресцирующей антивидовой сыворотки и бычьего альбумина, меченного родамином; инкубируют во влажной камере при 37 °С 30 мин; отмывают; подсушивают и просматривают под люминесцентным микроскопом (объектив ×40, окуляр ×4 или ×5).

Положительная реакция характеризуется зеленым или изумрудно-зеленым свечением цитоплазмы клеток.

Реакция сопровождается постановкой соответствующих контролей.

Диагностический результат считают положительным при обнаружении специфического свечения хотя бы в одной из 5—10 сывороток, присланных из данного хозяйства.

Для определения уровня обнаруженных таким образом антител в испытуемой сыворотке проводят ее титрование. Для этого испытуемую сыворотку разводят от 1 : 40 до 1 : 1280, и каждым разведением обрабатывают заведомо инфицированный препарат, как было указано выше. О титре постинфекционных антител в сыворотке судят по предельному ее разведению, которое способно давать положительную НРИФ. Наличие специфического свечения в препаратах, обработанных испытуемой сывороткой в разведениях 1 : 10, 1 : 20 и 1 : 40, свидетельствует о том, что сыворотка была получена в период острого переболевания животного ящуром, т. е. с момента его заболевания прошло около 7 дней, а наличие специфического свечения в разведениях 1 : 80 и выше — о том, что сыворотка взята от животного-реконвалесцента.

Результаты исследования на ящур оформляют в виде протокола, в котором указывают дату исследования, наименование хозяйства, материала, краткие эпизоотологические данные и т. д. и обязательно наименование компонентов, используемых в исследовании, характеристику контролей.

Необходимо отметить, что для индикации и типирования вируса ящура разработано много других методов, таких, как ПЦР, РНГА, ИФА, метод перекрестного иммунитета и др.; для обнаружения и типирования антител — РН, РНГА, реакция серозащиты на мышатах-сосунах и др.

Дифференциальная диагностика. Необходимо исключить другие заболевания животных с везикулярным синдромом, такие, как ВД, ИРТ, везикулярный стоматит, у свиней — везикулярную болезнь, везикулярную экзантему, у овец — катаральную лихорадку.

Иммунитет и специфическая профилактика. Продолжительность иммунитета у животных, переболевших ящуром, составляет 8—12 мес, у свиней — 10—12, у овец — 18 мес. При очень напряженном иммунитете может наблюдаться некоторая устойчивость к заражению гетерологичным типом вируса. При ящуре возникает тканевой и гуморальный иммунитеты. Основное значение в защите животных от заболевания принадлежит гуморальным факторам иммунитета. Для специфической профилактики ящура применяют инактивированные вакцины. В нашей стране нашли широкое применение следующие 3 вакцины: лапинизированная гидроокисьалюминиевая сапонинформолвакцина, которую готовят из вируса, репродуцированного в организме новорожденных крольчат; гидроокисьалюминиевая сапонинформолвакцина из вируса,

культивируемого в переживающей ткани слизистой оболочки языка, не иммунного к ящуру крупного рогатого скота (метод Френкеля); и вакцина из вируса, полученного в суспензионной культуре клеток ВНК-21/13. Для свиней используют противоящурную эмульгированную вакцину из лапинизированного вируса.

Иммунитет после вакцинации у взрослых животных длится 4—6 мес. После ревакцинации иммунитет более напряженный и продолжительный.

Молодняк, родившийся от иммунных животных, получает пассивно антитела с молозивом. Антитела у телят сохраняются в течение 5 мес, хотя пассивная защита продолжается до 3—4 мес.

Инактивированные вакцины могут быть моно- или поливалентными, т. е. содержать антигены одного или многих типов и вариантов вируса. Живые вакцины против ящура не разработаны. Проводятся исследования по разработке и использованию синтетических вакцин, а также молекулярных вакцин, полученных с помощью методов генной инженерии.

2.5.2. ВИРУС БОЛЕЗНИ ТЕШЕНА

Болезнь Тешена (БТ, энцефаломиелит поросят) — вирусная болезнь свиней, характеризующаяся развитием негнойного энцефаломиелита с признаками поражения центральной нервной системы (гиперстезия, мышечный тремор, тонико-клонические судороги, параличи конечностей, мышц шеи, глотки).

Характеристика возбудителя. Впервые вирус болезни Тешена (ВБТ) выделил Трефни в 1930 г. в Чехословакии в округе Тешен. В последующие годы инфекция быстро распространилась в Австралию, Югославию, Болгарию и страны Европы.

ВБТ—РНК-содержащий; относится к семейству Picornaviridae. Геном вируса — односпиральная линейная РНК положительной полярности. Вирионы представляют собой лишенные суперкапсидной оболочки частицы кубической симметрии диаметром 25—30 нм. Капсид состоит из 60 структурных единиц. Липидов и углеводов в составе вирионов не обнаружено. В них обнаружено 4 полипептида, обозначаемые в порядке уменьшения молекулярной массы как VP1,VP2, VP3 и VP4. Каждый полипептид представлен 60 молекулами. Кроме того, имеется 1—2 молекулы полипептида VP0 — предшественника полипептидов VP2 и VP4.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус устойчив к жирорастворителям (эфиру, хлороформу) и некоторым детергентам, к изменениям pH в широком диапазоне (2,8—9,5). Обработка трипсином повышает вирулентность вируса.

Вирус сохраняется при 4 °С, а также в 50%-ном глицерине при 0 °С — до 20 мес, в замороженном виде — годами, в соленых и копченых продуктах — более 3 нед.

Антигенная активность ВБТ проявляется синтезом в организме инфицированных животных специфических вируснейтрализующих и комплементсвязывающих антител.

Антигенная вариабельность. Существует один тип ВБТ, внутри которого различают два подтипа. Во второй подтип входит штамм Talfon, что дало основание болезнь Тешена иногда называть болезнью Тальфона.

Гемагглютинирующие свойства. У ВБТ они не установлены.

Экспериментальная инфекция. Экспериментальное заражение удается только на поросятах, не получающих молозиво. Более восприимчивы к заражению поросята 3—5-дневного возраста, менее чувствительны 1—2-месячные. Экспериментальная инфекция легче удается при интрацеребральном и субдуральном введении вируссодержащего материала.

Культивирование вируса. Успешно осуществляется в культурах клеток почек, легкого, сердца, семенников поросят (до 2 мес) и эмбрионов свиньи. Вирус размножается и в перевиваемых культурах клеток ВНК-21, HeLa, Vero и др. В культуре клеток выявляется ЦПД — скопление округлившихся клеток, очаги дегенерации и отделение пораженных клеток от поверхности стекла. ЦПД появляется уже через несколько часов после заражения. Максимальных титров вирус достигает к 18—24 ч после заражения.

Лабораторные животные к ВБТ нечувствительны. На куриных эмбрионах вирус также не размножается.

Клинические признаки. Инкубационный период длится 1—4 нед. В продромальном периоде, который длится около 3 сут, отмечают потерю аппетита, ринит, рвоту, расстройство координации движений. Затем наступает паралитическая стадия — появляются клинические признаки поражения ЦНС: гиперстезия кожи, судорожные сокращения различных групп мышц конечностей, нистагм и т. п. Это — признаки энцефаломиелита. Позже развиваются симптомы поражения спинного мозга: шатающаяся напряженная походка, прогрессирующий паралич конечностей, а затем — шеи и головы. Из-за паралича глотки часто отмечают частичную или полную утрату голоса (афонию).

В тяжелых случаях(примерно 3 %) болезнь заканчивается комой и гибелью животных. При более легком течении отмечают затрудненную походку, полупараличи и параличи без явлений возбуждения. Легкое течение заканчивается выздоровлением.

Патологоанатомические изменения. Существенные патологоанатомические изменения находят только в ЦНС. Они характеризуются гиперемией мозговых оболочек, явлениями отека серого вещества (преимущественно ромбовидного и среднего мозга), шейного и поясничного утолщений спинного мозга. В других органах отмечают признаки катарального ринита, бронхита и отека легких. Под эпикардом и эндокардом — точечные и пятнистые кровоизлияния. Слизистые оболочки желудка и толстого кишечника очагово-гиперемированы и покрыты густой прозрачной слизью. Мочевой пузырь всегда переполнен.

Гистологическими исследованиями ЦНС обнаруживают признаки негнойного лимфоцитарного типа полиэнцефалита и менингита. В сером веществе головного и спинного мозга наблюдают очаговые и диффузные клеточные инфильтраты из глиальных элементов, гистиоцитов и лимфоцитов. В очагах поражения часто регистрируют дистрофические изменения нервных элементов. Вокруг сосудов возникают клеточные муфты. В нервных волокнах выявляют набухание, а местами — глыбчатый распад аксонов. При выздоровлении животных в очагах поражения ЦНС выявляют выраженные восстановительные процессы.

Локализация вируса. В крови и органах вирус обнаруживается кратковременно в небольшом количестве. В тканях желудочно-кишечного тракта вирус размножается с первых дней болезни и обнаруживается в течение 5—7 дней. Наивысшие титры вируса (10^6 $ТЦД_{50}$/г) в пробах фекалий обнаруживают через 9 дней после заражения. В миндалинах, мезентериальных и брыжеечных лимфоузлах вирус появляется через 2 дня после заражения и выявляется в течение 6—8 дней. В наивысших концентрациях он содержится в шейном и грудном отделах спинного мозга и в мозжечке, что делает эти ткани более пригодным материалом для выделения вируса. Однако к пятому дню после появления симптомов болезни содержание вируса в тканях ЦНС снижается, и к моменту гибели он уже не обнаруживается.

Источник инфекции — больные животные, реконвалесценты или животные, переболевшие бессимптомно. Чаще заражение происходит при потреблении корма, воды, мясных отходов, загрязненных выделениями больных животных. Возможно и контактное заражение. К заражению восприимчивы только свиньи, в том числе дикие и водяные свиньи. Наиболее восприимчивы поросята-отъемыши и подсвинки.

Диагностика. Диагноз ставят на основе эпизоотологических данных, клинических признаков и патологоанатомических изменений. Однако для точного диагностирования необходимо проведение лабораторных исследований.

В качестве патологического материала для лабораторной диагностики от больных животных направляют фекалии и мазки-отпечатки слизистой прямой кишки. От свиней с нервным синдромом на ранней стадии болезни после диагностического убоя берут кусочки мозжечка, продолговатого и спинного мозга. После пятого дня болезни от животного берут отрезок подвздошной и ободочной кишок.

Лабораторная диагностика. Обнаружение вирусного антигена в полученных пробах проводят прямым методом РИФ. В эпителии слизистой кишечника, в цитоплазме нейронов всех исследуемых отделов ЦНС наблюдают специфическое свече-

ние цитоплазмы. Активный вирус обнаруживают биопробой на культуре клеток из спинного мозга, коры больших полушарий головного мозга или мозжечка.

Размножившийся и накопившийся при биопробе вирус считают выделенным вирусом.

Идентификацию выделенного вируса проводят с помощью РИФ и ИФА.

Ретроспективная серологическая диагностика. Ее, а также установление латентного вирусоносительства осуществляют определением титров антител в сыворотках крови реконвалесцентов в РН. Для этого реакцию ставят в культуре клеток почки свиньи с использованием лабораторных штаммов ВБТ.

Дифференциальная диагностика. При дифференциальной диагностике следует исключить болезнь Ауески, бешенство, классическую чуму свиней, отравление хлоридами и саланином.

Иммунитет и специфическая профилактика. Специфическая профилактика БТ осуществляется сухой вирусвакциной, содержащей аттенуированный пассажами в культуре клеток ВБТ, или инактивированной гидроксидом алюминия (ГОА) формолвакциной, приготовленной из спинного и головного мозга зараженных поросят. Разработана инактивированная формалином эмульгированная вакцина, которую готовят из вируса, выращенного в однослойной перевиваемой культуре клеток почки поросенка.

2.5.3. ВИРУС ВЕЗИКУЛЯРНОЙ БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ

Везикулярная болезнь свиней — контагиозная болезнь, протекающая с высокой температурой, везикулярным поражением венчика эпителия межкопытной щели, рыла, плюсны и пясти. Восприимчивы только свиньи, но в редких случаях могут заражаться и люди. Болезнь регистрируется в различных странах мира, где развито свиноводство.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Picornaviridae, роду Enterovirus. Вирионы имеют форму многогранника размером 22—30 нм и лишены суперкапсидной оболочки. Они состоят из капсида кубической симметрии и генома. Геном представлен односпиральной линейной плюс-РНК.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус высокоустойчив во внешней среде. При 12—17 °С сохраняется до 138 дней, при минус 20 °С — до 11 мес. Устойчив к жирорастворителям и колебаниям pH в диапазоне от 2,5 до 10,5. При высоких температурах погибает менее чем за 30 мин. Обычные дезинфектанты (NaOH, формалин) неэффективны. Однако гидрохлорид натрия (0,5%-ный) и йодозол (0,2%-ный) губительны для вируса.

Антигенная структура. Вирионы вируса содержат в составе капсида полипептиды, которые обладают антигенной активностью и

индуцируют образование комплементсвязывающих, вируснейтрализующих и преципитирующих антител.

Вируснейтрализующие антитела, обеспечивающие специфическую защиту, обнаруживаются на 4-й день болезни (ранние антитела) и сохраняются у переболевших поросят в течение 4 мес.

Антигенная вариабельность и родство. Вирус везикулярной болезни имеет подвидовые серовариванты (подобные наблюдаемым у вируса ящура), которые определяются в РН.

Между вирусом везикулярной болезни свиней и вирусом Коксаки типа В5 существует серологическое родство.

Культивирование вируса. В лабораторных условиях все штаммы вируса везикулярной болезни размножаются в первичной и перевиваемой культурах клеток почки свиньи с образованием ЦПД и бляшек. Инфекционный титр достигает 2×10^9 БОЕ/мл. Клоны вируса, полученные из бляшек, вирулентны для новорожденных мышат.

Гемагглютинирующие свойства. Не установлены.

Клинические признаки. Везикулярная болезнь свиней имеет большое сходство с ящуром. Различные по вирулентности штаммы вызывают острое, подострое или хроническое течение болезни. Инкубационный период в среднем длится 3—7 дней. Клинические признаки характеризуются лихорадкой и везикулами на характерных участках — венчике копыт, реже пяточке, языке. Иногда развивается хрипота. В большинстве случаев болезнь заканчивается доброкачественно; смертность среди поросят-сосунов низкая.

Патологоанатомические изменения. Касаются гистологических изменений в области везикул и эрозий. Это могут быть изменения по типу вакуолизации клеток и их слияния и по типу дегенерации клеток без слияния.

Локализация вируса. Вирус, проникнув в организм через поврежденную кожу или инфицированные корма, локализуется в клетках кожи и эпителия слизистых оболочек (первичная репродукция), после генерализации — в лимфатических узлах и мышцах. Длительно сохраняется на поверхности кожи. В окружающую среду выделяется с первых дней болезни с носовыми секретами, глоточной слизью, мочой и фекалиями. На протяжении более 3 мес пораженные животные могут контаминировать внешнюю среду и заражать восприимчивых свиней.

Источники инфекции — больные свиньи всех возрастов и вирусоносители, которые выделяют вирус со слюной, содержимым везикул, мочой и фекалиями. Вирус передается воздушно-капельным путем, алиментарно через загрязненные корма, воду и продукты животного происхождения, а также при контакте через поврежденную кожу. Не исключена роль насекомых (мух) в передаче возбудителя.

В естественных условиях поражаются только свиньи, а также кабаны. При работе с вирусом или уходе за больными животными возможно заражение людей.

Диагностика. Диагноз ставят исходя из комплекса эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных. Решающее значение имеют результаты лабораторных исследований.

Взятие материала. От больных животных для исследования берут стенки везикул и везикулярную жидкость с соответствующих участков (трахея, венчик, вымя и др.). Для консервации используют 50%-ный глицерин. Транспортируют материал в термосе с охлаждающей смесью.

Для ретроспективной диагностики направляют парные пробы сывороток крови не менее чем от пяти животных.

Лабораторная диагностика. Включает индикацию вирусного антигена в РСК, РИФ, РДП, выделение вируса и его идентификацию в РН, РСК и РИФ, а также ретроспективную серодиагностику.

Индикация с помощью серологических реакций позволяет провести прямое выявление вирусного антигена в патологическом материале (экспресс-диагностика).

РСК проводят согласно методике, аналогичной таковой при ящуре. Антигеном в реакции служит 20—33%-ная суспензия из стенок везикул, в качестве антител используют типоспецифические эталонные сыворотки, а также типоспецифические сыворотки к вирусу ящура и везикулярной экзантеме свиней (для дифференциальной диагностики).

Отрицательные результаты в РСК не исключают везикулярную болезнь, поэтому в дальнейшем проводят выделение вируса в культуре клеток и последующую его идентификацию в РСК и РН.

РИФ применяют в прямом варианте по общепринятой методике. Однако более быстрый результат получают в непрямом варианте, используя в качестве антигена зараженную патологическим материалом культуру клеток, выращенную на покровных стеклах. Если в исследуемом материале есть вирус, то результат можно получить уже через 3—5 ч после заражения, что равносильно идентификации вируса.

РДП проводят макро- или микрометодами по общепринятой методике. Используют 1,5%-ный агар и компоненты реакции. Одновременно для дифференциальной диагностики в реакции применяют типоспецифические сыворотки к вирусу ящура и везикулярной экзантеме свиней. Реакцию учитывают через 24, 48 и 72 ч.

Успешно применяют для индикации вирусных антигенов реакции радиальной иммунодиффузии (РРИД) и встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ).

Выделение вируса проводят в первичной или перевиваемой (РК-15, IB-RS-2) культурах клеток почки поросенка (свиньи). Если в исследуемом патологическом материале есть вирус, то ЦПД можно обнаружить через 24—48 ч. При наличии ЦПД вируса на два креста проводят его идентификацию в РСК и РИФ (как описано выше), РН и ИФА.

Биопроба на лабораторных животных. Для ее постановки используют однодневных мышат, которых заражают интрацеребрально. При наличии вируса везикулярной болезни в патологическом материале уже через 2—3 дня отмечают нервную симптоматику с развитием параличей и гибелью животных в течение 3—10 дней после инокуляции. Из костно-мышечного мешка готовят суспензию (как при ящуре) и исследуют в РСК.

Идентификация. Выделенный вирус идентифицируют в РН, РИФ.

РН проводят в культурах клеток почки свиньи макро- или микрометодом по общепринятой методике. Используют выделенный вирус (культуральная вируссодержащая жидкость) и вируснейтрализующие типоспецифические сыворотки к вирусам везикулярной болезни свиней, а также типоспецифические сыворотки к вирусам экзантемы свиней и ящура (с целью дифференциальной диагностики). Реакцию оценивают по индексу нейтрализации.

РИФ выполняют по непрямому варианту. В качестве антигена используют вирус, выделенный в перевиваемой культуре клеток на покровных стеклах (как для РИФ).

Ретроспективная диагностика. Основана на определении вируснейтрализующих, комплементсвязывающих, преципитирующих антител в парных сыворотках при использовании соответствующих серологических реакций.

РН проводят в первичной и перевиваемой культурах клеток почки поросенка макро- или микрометодом по общепринятой методике или методом подавления бляшек. Исследуемые сыворотки освобождают от термолабильных ингибиторов прогреванием.

Вируснейтрализующие антитела у больных животных появляются рано, определяются к четвертому дню после заражения и достигают максимальных значений к десятому дню болезни.

Реакция считается положительной при четырехкратном нарастании титра антител в парных сыворотках или при титре антител 1 : 32 и выше у 10 % и более свиней от числа однократно обследованных.

РСК проводят по методу длительного связывания комплемента. Для дифференциальной диагностики с везикулярным стоматитом и ящуром используют соответствующие типоспецифические антигены. Реакция считается положительной при четырехкратном нарастании специфических антител к вирусу везикулярной болезни свиней в парных сыворотках.

РДП ставят по общепринятой методике с типоспецифическими антигенами везикулярной болезни, а также экзантемы свиней и ящура (с целью дифференциальной диагностики).

Используют также методы непрямой реакции иммунофлуоресценции (*РИФ*) и непрямого иммуноферментного анализа (*ИФА*). При этом последний метод позволяет обнаруживать антитела при эпизоотическом мониторинге свиноводческих комплексов.

Дифференциальная диагностика. Везикулярную болезнь следует дифференцировать от ящура, везикулярного стоматита и везикулярной экзантемы.

Для дифференциации везикулярной болезни свиней от ящура используют культуру клеток щитовидной железы теленка. Если ЦПД обнаруживается в культуре клеток теленка, то это может говорить об ящурной инфекции.

Иммунитет и специфическая профилактика. В нашей стране производят и успешно применяют культуральную эмульгированную формолвакцину. Ее вводят однократно внутримышечно в дозе 2,0 мл. Продолжительность поствакцинального иммунитета составляет 8 мес.

За рубежом применяют культуральные инактивированные вакцины, которые получают в монослойных или суспензионных культурах клеток, инактивируют формалином или этиленимином и используют масляный или гидроокисьалюминиевый адъюванты.

2.5.4. ВИРУС ГЕПАТИТА УТЯТ

Вирусный гепатит утят (ВГУ) — острое высококонтагиозное вирусное заболевание утят, характеризующееся нервными явлениями с высокой смертностью и некрозом печени.

ВГУ регистрируют в Европе, США, Англии, Голландии и России. Чаще вспышки заболевания вызываются вирусом гепатита утят типа 1.

Характеристика возбудителя. Вирус открыли Левин и Фабрикант в 1949 г. Он входит в семейство Picornaviridae; представляет собой лишенные суперкапсидной оболочки частицы кубической симметрии диаметром 22—30 нм. Капсид содержит 4 главных полипептида и состоит из 60 структурных единиц, содержащих, как правило, по одной молекуле каждого полипептида. Вирусный геном представлен нефрагментированной линейной РНК положительной полярности. Липидов и углеводов в составе вирионов не обнаружено.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирионы устойчивы к жирорастворителям и неионным детергентам, к снижению pH до 3,0. В культуральной бесклеточной среде при 37 °С вирус сохраняется 21 день, при комнатной температуре — до 4 сут.

Антигенная активность и вариабельность. У переболевших и экспериментально зараженных утят и уток образуются комплементсвязывающие, вируснейтрализующие и преципитирующие антитела, которые передаются через яйцо потомству. С помощью ИФА установлено антигенное родство ВГУ с вирусом гепатита В человека. В 1965 г. в США изолирован второй серотип вируса гепатита утят.

Гемагглютинирующими и гемадсорбирующими свойствами вирус не обладает.

Культивирование. Успешно проводится на куриных эмбрионах 7—9-дневного возраста и на 12—13-дневных утиных эмбрионах при заражении в аллантоисную полость. Эмбрионы погибают на 3—6-й день с явлениями гиперемии, отека, кровоизлияний на теле и голове. Гепатотропизм вируса проявляется увеличением печени, желто-зеленым и темно-зеленым ее цветом с очагами некроза. Аллантоисная жидкость также может быть зеленого цвета. Пассирование вируса на куриных эмбрионах ведет к снижению его патогенности для утят.

В культуре клеток куриного эмбриона вирус вызывает цитопатический эффект с образованием симпластов, вакуолизацией пораженных клеток и отслаиванием их от стекла. ВГУ успешно культивируется в первичной культуре клеток почки эмбриона утят.

Клинические признаки. Инкубационный период болезни длится 16—72 ч. Течение болезни, как правило, острое или сверхострое. При сверхостром течении утята погибают в течение одного часа после появления симптомов. Болезнь проявляется вялостью, отказом от корма, нервными явлениями. У утят наблюдаются судороги в положении на боку или на спине и вслед за этим гибель в позе «запрокинутой головы». При остром течении заболевание начинается также внезапно, болезнь длится 2—3 дня, смертность достигает 60 % и выше.

Патологоанатомические изменения. При вскрытии павших утят обнаруживают значительное увеличение печени. Она дряблой консистенции, серовато- или желтовато-глинистого цвета, с множественными петехиальными и экхимозными кровоизлияниями. Желчный пузырь переполнен желчью. Гистологическими исследованиями выявляют некроз клеток печени со значительной вакуолизацией цитоплазмы и пикнозом ядер. Дегенеративные изменения в них также наблюдают уже через 24 ч после заражения. Отмечают инфильтрацию стенок желчных протоков, гиперемию сосудов. В головном мозге наблюдают периваскулярное скопление лейкоцитов.

Тяжесть течения болезни зависит от возраста утят, патогенности штамма и состояния клеток печени.

Локализация вируса. Вирус передается алиментарно и аэрогенно. Проникнув через слизистые оболочки, он с кровью и лимфой разносится по организму. Проявляя гепатотропизм, вирус размножается преимущественно в клетках печени, а затем в селезенке и головном мозге. Накопившийся в организме вирус выделяется с калом, истечениями из носа, глаз, на скорлупе.

Источник инфекции — больная птица и вирусоносители. Вирусоносительство установлено в течение 8—10 дней после переболевания. Во внешнюю среду вирус выделяется с калом, носовыми и конъюнктивальными истечениями. При этом происходит инфицирование корма, воды, подстилки и воздуха помещений.

В распространении заболевания участвуют дикие утки (носители инфекции), а также черви-навозники, в организме которых вирус не репродуцируется, но сохраняется до 18 дней. Сезонности в проявлении болезни не наблюдается.

В течение 3—4 дней гибнет почти 100 % утят до 14-дневного возраста. У более старших утят проявляется возрастная резистентность к заражению ВГУ и резко сокращается смертность. В 35—45-дневном возрасте утята абсолютно устойчивы к заражению. Взрослая птица переболевает бессимптомно.

Экспериментально удавалось заразить гусят, индюшат, перепелят и фазанят.

Диагностика. Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований.

Лабораторная диагностика. Материалом для лабораторных исследований служат взятая у павших или вынуждено убитых утят печень с типичными кровоизлияниями и головной мозг. Хранят материал при минус 20—70 °С.

Обнаружение вируса в патологическом материале проводят с помощью РИФ и диффузионной преципитации, а также обнаружением телец-включений в клетках печени, макрофагальных клетках эндотелия, эндотелиальных клетках селезенки.

Вирус гепатита утят успешно обнаруживают биопробой на утятах, куриных и утиных эмбрионах. Используют суточных утят из стад, благополучных по вирусному гепатиту. К 72 ч смертность зараженных утят достигает 100 %. У погибшей птицы регистрируют опистотонус, увеличение печени с кровоизлияниями.

Биопроба на куриных эмбрионах и культуре их клеток более доступна. Выделенный на утятах или на эмбрионах вирус идентифицируют в РН на эмбрионах или в культуре клеток со специфической антисывороткой к вирусу гепатита утят или сывороткой уток-реконсцевалентов.

Дифференциальная диагностика. ВГУ следует дифференцировать от других болезней утят, сопровождающихся внезапной гибелью: чумы и гриппа уток, бактериальной септицемии, эймериоза и отравлений, а также отличать от паратифа и аспергиллеза.

Иммунитет и специфическая профилактика. Утята старше 4 нед устойчивы к заражению вирусом гепатита и к реинфекции. Взрослые утки клинически не болеют.

Для специфической профилактики применяют живые и инактивированные вакцины; установлено, что вакцины, полученные на утиных эмбрионах, более эффективны, чем созданные на куриных эмбрионах. Иммунизируют племенных уток и 1—3-дневных утят.

Трехкратная вакцинация уток в возрасте 8, 16 и 22 нед инактивированной вакциной обеспечивала защиту от заражения потомства в течение 3 нед жизни утенка. У утят, привитых в возрасте

2—3 дней живой вакциной, образовывались в высоком титре вируснейтрализующие антитела, которые удерживались до 30 дней и защищали утят от заражения.

2.6. СЕМЕЙСТВО КАЛИЦИВИРУСОВ

Семейство Caliciviridae (от лат. calex — чаша) включает в себя вирусы, вызывающие поражения живых организмов — от рыб до человека. Представители семейства имеют безоболочечный вирион икосаэдральной симметрии. Диаметр вириона 27—40 нм. Характерной структурной особенностью капсида является наличие 32 чашеобразных углублений на месте пяти- и трехосных вершин. Плавучая плотность составляет в CsCl 1,33—1,41 г/см^3, в глицерин-тартрате калия — 1,29 г/см^3. Коэффициент седиментации S_{20w} 170—187S.

Геном вирусов представлен одной молекулой односпиральной, линейной позитивной полярности, инфекционной РНК. Размер ее составляет 7,4—8,3 kb (килобаз). Вирионы преимущественно состоят из одного мажорного капсидного протеина. Второй минорный структурный протеин обнаруживают только у вирионов вируса геморрагической болезни кроликов. Неструктурные протеины включают домены хеликазы 2С, цистеиновой протеазы 3С и РНК-зависимой РНК-полимеразы. Данных о наличии в составе вирионов липидов и углеводов нет.

Репликация происходит в цитоплазме; в инфицированных клетках идентифицировано два вида мажорных РНК с позитивной полярностью. Полноразмерная позитивная РНК служит матрицей для трансляции крупного полипротеина, который затем подвергается разрезанию на неструктурные протеины. Субгеномная позитивная РНК является матрицей для трансляции мажорного вирусного белка. В клетках, инфицированных некоторыми калицивирусами, обнаруживаются двуспиральные РНК, что свидетельствует об осуществлении репликации через промежуточные негативные формы цепей.

Калицивирусы инфицируют широкий спектр животных, включая лошадей, крупный рогатый скот, свиней, кроликов, кошек, скунсов, ластоногих, шимпанзе и человека.

Передача вируса происходит алиментарно, реже аэрозольно. Калицивирусы ассоциируются с рядом патологических процессов. У человека они обычно вызывают кратковременные гастроэнтериты, проявляющиеся тошнотой, рвотой, диареей, коликами и общим недомоганием.

Семейство калицивирусов включает 5 родов.

Род Lagovirus. Представлен вирусом геморрагической болезни кроликов, вызывающим эпизоотии с генерализованной инфекцией, сопровождающейся некрозом печени, быстрой гибелью кроликов старше 3-месячного возраста.

Род Sapporo-likeviruses. Типовой вид — Sapporo virus. Вирусы данного рода вызывают вспышки гастроэнтеритов у человека.

Род Hepatitis E-like viruses. Типовой вид — Hepatitis E virus (вирус гепатита Е). Вирус ассоциируется со случаями гепатита у людей в странах тропиков и субтропиков. В организме приматов и свиней обнаруживались антитела к этому вирусу.

Род Norwalk-like viruses. Типовой вид — Norwalk virus (вирус Норвалк). Штаммы данного рода образуют внутри семейства отдельную филогенетическую группу. Для подразделения вирусов данного рода на виды необходимы дополнительные характеристики.

Род Vesivirus. Включает в себя типовой вид — вирус везикулярной экзантемы свиней, а также калицивирус кошек, бычий калицивирус. Кроме того, в группу неклассифицированных вирусов этого рода включены бычий энтерокалицивирус, калицивирус собак, а также калицивирус птиц.

У свиней, инфицированных вирусом везикулярной экзантемы свиней, клиническая картина часто неотличима от таковой при ящуре, т. е. включает появление везикул во рту, на языке, губах, носовом зеркале, конечностях. Кроме того, инфекция может сопровождаться развитием энцефалита, диареей, абортами.

Калицивирус кошек ассоциируется с появлением у них конъюнктивита, ринита, пневмонией, везикулярным поражением слизистых, диареей, парезами и может вызвать развитие персистентной инфекции с сохранением вируса в миндалинах.

Большинство членов данного рода хорошо накапливаются в культурах клеток, что отличает их от представителей других трех родов калицивирусов, которые не культивируются ни в одной обычной культуральной системе.

Калицивирусы имеют признаки, общие с представителями семейств Picorna-, Poly- и Comoviridae.

2.6.1. КАЛИЦИВИРУС КОШЕК

Калицивирусная инфекция кошек — респираторная болезнь, протекающая у молодых кошек остро, у взрослых — хронически. Распространена повсеместно. Ранее эту инфекцию называли пикорнавирусной инфекцией.

Характеристика возбудителя. Вирус впервые выделил и описал Фостьер в 1957 г. в США. Относится к семейству Caliciviridae. Диаметр вириона 45 нм, сердцевины 20 нм. Вирионы имеют 32 капсомера, уложенных по кубической симметрии. Суперкапсидная оболочка отсутствует. Геном вируса представлен одной молекулой односпиральной, линейной РНК позитивной полярности. У калицивирусов кошек выявлено 7 эпитопов нейтрализации, 4 из них располагаются на капсидном белке с примерной молекулярной

массой 67 кД. Все вирионы разделяют на полные вирионы и 156S-частицы. Те и другие индуцируют вируснейтрализующие антитела.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус довольно устойчив к воздействию эфира, хлороформа, гуанидина, дизоксихолата натрия и к pH 4—5. Чувствителен к нагреванию — инактивируется при 50 °С в течение 30 мин. Установлена частичная устойчивость против термо- и pH-инактивации солью натрия.

Антигенная структура. Не изучена.

Антигенная активность, вариабельность и родство. У переболевших кошек обнаруживают вируснейтрализующие антитела. Штаммы калицивируса кошек в агглютининовом отношения родственны.

Культивирование вируса. Калицивирус кошек культивируют в культуре клеток почки котят. ЦПИ в культуре клеток наблюдают через 24—36 ч. В культуре клеток эмбриона кошек вирус выявляется в цитоплазме пораженных клеток. Зараженные клетки содержат тельца-включения. В первичных, перевиваемых и диплоидных культурах клеток титр вируса достигает 10^6—10^8 $ТЦД_{50}$/мл.

Клинические признаки. Калицирусы кошек слабовирулентны и болезнь обычно протекает латентно. Однако при поражении молодых кошек и в случае сочетания с другими агентами бактериальной, вирусной и микоплазмозной природы калицивирусная инфекция может вызывать гибель до 86 % кошек. Преимущественно тяжело болеют молодые животные.

Болезнь характеризуется поражением верхних дыхательных путей. У больных животных отмечают серьезный конъюнктивит, ринит, одышку, кашель, депрессию. Кроме того, при более тяжелом течении болезни у животных наблюдают лихорадку, пневмонию, на слизистых языка, нёба, ноздрей — изъязвления.

Патологоанатомические изменения. Характерно неспецифическое катаральное воспаление верхних дыхательных путей.

Источник инфекции — больные животные. Инфекция передается при непосредственном контакте и аэрогенно.

Диагностика. Основана на анализе эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатах лабораторных исследований.

Лабораторная диагностика. Для исследований в лабораторию направляют от больных животных смывы со слизистых оболочек верхних дыхательных путей, от трупов — слизистые оболочки.

Обнаружение вируса проводят с помощью ПЦР, РИФ и биопробы. Метод ПЦР дает возможность установить минимальные количества вируса и обладает высокой специфичностью. Для обнаружения вируса используют и РИФ. Изучение препаратов в РИФ также обладает высокой чувствительностью и специфичностью. При постановке биопробы заражают исследуемым материалом котят, которые погибают через 20 дней.

Идентификацию выделенного вируса проводят РН в культуре клеток.

Специфические антитела у животных-реконвалесцентов также изучают в РН.

Иммунитет и специфическая профилактика. Переболевшие кошки приобретают иммунитет продолжительностью до 6 мес. В нашей стране для специфической профилактики болезни применяют ассоциированную инактивированную вакцину, изготовленную из штаммов вирусов панлейкопении, ринотрахеита, калицивирусной инфекции и возбудителя хламидиоза кошек. Ее вводят подкожно в области лопатки котятам дважды: в возрасте 8—12 недель и через 21—28 дней после первой вакцинации. Ревакцинируют животных в возрасте 12 мес, затем ежегодно. Введение вакцины сопровождается образованием специфических гуморальных (IgM и IgG), а также секреторных (IgA)антител в респираторном тракте.

2.6.2. ВИРУС ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНИ КРОЛИКОВ

Вирусная геморрагическая болезнь кроликов (некротический гепатит, геморрагическая инфекция кроликов) — острая высококонтагиозная болезнь, характеризующаяся развитием геморрагического диатеза во всех органах, особенно в легких и печени. Болезнь регистрируется во многих странах мира и наносит значительный ущерб хозяйствам и частным фермам, занимающимся кролиководством.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Caliciviridae, роду Calicivirus. Вирионы изометрической формы, размером 28—33 нм. Состоят из капсида с кубическим типом симметрии и генома. Липопротеидная оболочка отсутствует. Геном представлен односпиральной плюс-РНК.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус устойчив к нагреванию при 50 °С (60 мин), низким значениям pH (3,0), жирорастворителям (эфиру, хлороформу). При 40—50 °С сохраняет вирулентность в течение пяти лет; при 4 °С в инфицированной печени остается вирулентным до одного года. Инактивируется формалином, глутаровым альдегидом за одни сутки.

Антигенная структура и активность. Вирионы вируса содержат гликопротеидные антигены, которые индуцируют образование вируснейтрализующих, антигемагглютинирующих и комплементсвязывающих антител. На 4—5-й день после вакцинации антитела обнаруживают в соответствующих серологических реакциях.

Антигенная вариабельность и родство. Штаммы вируса родственны в антигенном отношении. Установлено антигенное родство с парвовирусом синдрома европейских зайцев, а также гомологичные последовательности в РНК с парвовирусом свиней, гусей и мышей.

Культивирование. Вирус репродуцируется в лабораторных условиях в организме кроликов (in vivo) и в перевиваемой культуре клеток почки кролика, вызывая ЦПД после двух пассажей.

Гемагглютинирующая активность. Вирус агглютинирует эритроциты овец, птиц, человека 0 (1) группы. Гемагглютинирующий антиген выявляется (в РГА) в моче и смывах с конъюнктивы больных животных, а также в крови, печени, селезенке, тимусе, сердце и т. д. у павших животных.

Экспериментальная инфекция. Она воспроизводится на кроликах при инокуляции (внутримышечно или внутриназально) суспензии из печени павших кроликов. После инкубационного периода (12—72 ч) развиваются характерные поражения внутренних органов, свертываемость крови отсутствует в течение нескольких часов. При вскрытии органов кровь изливается в больших количествах.

Наибольшее накопление вируса наблюдается в печени через 48—72 ч после заражения (гемагглютинирующий титр > 512 ГАЕ).

Клинические признаки. Инкубационный период длится 48—72 ч, иногда 120 ч. Возможен непродолжительный период предвестников болезни, характеризующийся повышением температуры тела до 40,8 °С, угнетением, отсутствием аппетита, истечением из носа. Затем без каких-либо клинических признаков внешне здоровые животные гибнут (молниеносная форма). Иногда за несколько минут до гибели они производят судорожные движения. Летальность достигает 100 %.

Патологоанатомические изменения. Выражены достаточно специфические поражения внутренних органов: печени, органов дыхания, почек, селезенки, сердца, головного мозга, тимуса и др. Они увеличены, отечны, наполнены несвернувшейся кровью, с диффузными кровоизлияниями. Изменены их цвет (от серо-розового до красно-коричневого) и консистенция (дряблая, легко рвется).

Локализация вируса. В организме кроликов вирус локализуется во внутренних органах, но наибольшее накопление его бывает в печени. Во внешнюю среду вирус выделяется с мочой, фекалиями, кровью, истечениями из носа и глаз.

Источник инфекции — больные и переболевшие кролики. Вирус передается аэрогенно, через инфицированный корм, воду, подстилку, навоз, а также пух и шкурки от больных животных. В шкурках вирус может сохраняться до 3 мес.

Отмечено, что первыми начинают болеть взрослые особи (массой 3—3,5 кг), затем поражаются кролики всех возрастов, за исключением подсосного молодняка. Летальность достигает 100 %, затем снижается до 75—80 %.

Диагностика. Диагноз ставят на основании эпизоотических, клинических, патологоанатомических, патоморфологических и лабораторных исследований.

Взятие материала. В лабораторию отправляют трупы кроликов (не менее 2—3) или паренхиматозные органы (особенно печень), взятые не позднее чем через 2 ч после гибели. Для консервации используют охлаждающую смесь.

Лабораторную диагностику проводят в специализированных лабораториях. Она включает индикацию вируса в РГА и идентификацию в РЗГА, РДСК, ИФА.

РГА, РЗГА. Реакцию гемагглютинации ставят капельным методом с 0,5%-ной суспензией эритроцитов (овец, кур). В случае положительного результата ставят реакцию задержки (торможения) гемагглютинации микрометодом с использованием диагностического набора.

РДСК проводят макро- или микрометодами. Первый этап реакции (испытуемый антиген + специфическая сыворотка) проводят при 4—6 °С в течение 16—18 ч, второй этап (+гемолитическая система) выдерживают при 37—38 °С в водяной бане 15—20 мин. Результат считается положительным, если при разведении исследуемого антигена не менее чем 1 : 8 наблюдается задержка гемолиза на три креста.

ИФА. Иммуноферментный анализ проводят по «сэндвич»-варианту. Результат учитывают уже через 3—3,5 ч.

Положительный результат на геморрагическую болезнь дают на основании исследования патологического материала не менее, чем в двух реакциях: РГА и РЗГА, РГА и РДСК, РГА и ИФА.

Дифференциальная диагностика. Геморрагическую болезнь кроликов следует дифференцировать от пастереллеза, сальмонеллеза, колибактериоза, миксоматоза, отравления и термического удара.

Иммунитет и специфическая профилактика. Для профилактики геморрагической болезни используют инактивированную вакцину, которую производят из вируссодержащей суспензии печени инфицированных кроликов. В качестве инактивантов используют формалин, теотропин, β-пропиолактон. Вакцину вводят кроликам с 1,5-месячного возраста однократно, внутримышечно в дозе 0,5 мл. Иммунитет развивается на 3-й день и сохраняется не менее 12 мес.

Разработана инактивированная культуральная вакцина на основе вируса, накопленного в перевиваемой культуре почки кролика.

Получена и применяется специфическая сыворотка, которая обладает непродолжительным защитным (до 30 дней) и лечебным действием. Сыворотку вводят подкожно или внутримышечно однократно в дозе 0,5 мл. Защитное действие проявляется уже через 2 ч.

Показана эффективность комбинированного использования препаратов: сначала специфической сыворотки, а на 6-й день — инактивированной вакцины.

2.7. СЕМЕЙСТВО ТОГАВИРУСОВ

Семейство Togaviridae (от лат. toga — плащ) — большая группа вирусов, поражающая позвоночных и членистоногих многих видов. Вирионы тогавирусов представляют собой мелкие оболочечные частицы диаметром 60—70 нм, имеющие нуклеокапсид с кубической симметрией. На поверхности вирионов — шиповидные выступы 6,5—10 нм длиной, состоящие из гликопротеидов, которые погружены в двухслойную липидную мембрану. Липидный и углеводный состав зависит от хозяина.

Тогавирусы содержат 3—8 % РНК, 57—66 белка, 17—31 липидов и 6—9 % углеводов. Плавучая плотность в сахарозе составляет 1,18—1,22 г/см^3, коэффициент седиментации 240—300S.

Геном тогавирусов представлен односпиральной плюс-РНК, которая выполняет функции иРНК и состоит приблизительно из 13 тыс. нуклеотидов.

В составе вирионов тогавирусов обнаружено 3 или 4 белка (С, Е1, Е2, Е3): С — белок нуклеокапсида, Е1—Е3-оболочки; белок Е3 обнаружен не у всех вирусов. Белки оболочки вириона обладают различными функциями: участвуют во взаимодействии с клетками, в стимулировании вируснейтрализующих антител и антигемагглютининов, агглютинации эритроцитов (для агглютинации наиболее чувствительны эритроциты гусей).

Размножение тогавирусов происходит в цитоплазме клеток. Адсорбированные вирионы окружаются клеточной мембраной и проникают в клетку путем эндоцитоза; большая часть вируса обнаруживается в лизосомах. После синтеза вирусных белков и нуклеиновых кислот происходит сборка вирусных частиц: образование нуклеокапсида из вирионной РНК и белка С; модификация клеточных мембран с включением вируспецифических гликопротеидов; почкование нуклеокапсидов через измененные мембраны с образованием зрелого вируса. Тогавирусы обнаруживают родство в пределах рода, но не между ними.

Семейство Togaviridae включает два рода: Alphavirus и Rubivirus.

Род Alphavirus. Объединяет 24 вида, прототипный вирус — вирус Синдбис. Основной естественный резервуар многих альфавирусов среди позвоночных — птицы, но многие из них также способны к репродукции у млекопитающих. Сообщалось о выделении альфавирусов из рептилий и амфибий.

Все виды альфавирусов способны размножаться в клетках позвоночных и беспозвоночных, включая млекопитающих, птиц, рептилий, амфибий, рыб и членистоногих и являются классическими арбовирусами*.

* К арбовирусам относят вирусы, которые поддерживаются в природе исключительно или в значительной степени путем биологической трансмиссии между восприимчивыми позвоночными и членистоногими гематофагами.

Род альфавирусов включает вирусы западного энцефалита лошадей, восточного и венесуэльского энцефалита лошадей. В естественных условиях указанные вирусы вызывают заболевания у лошадей, ослов, мулов и людей в странах Американского континента и странах бассейна Карибского моря. Инфекция передается комарами, в распространении участвуют дикие птицы. При венесуэльском энцефалите отмечена трансплацентарная передача вируса и капельное заражение при вспышке массового заболевания.

К данному роду относится вирус Гета, вызывающий вспышки острых заболеваний с лихорадкой и поражением конечностей у японских беговых лошадей. Вирус поражает и свиней.

Вирус Хайлэндс Джейн обычно не ассоциируется с какими-либо болезнями человека или лошадей, но считается важным патогеном индеек, фазанов, куропаток, уток и журавлей.

Род альфавирусов включает и другие вирусы, такие, как вирус Леса Семлики, вирус Мидделбург, вирус Чикунгунья и др.

Род Rubivirus. Включает лишь вирус краснухи (прототипный вирус). Единственный хозяин его — человек. Вирус передается аэрозольным и конгенитальным путями. Болезнь, обусловленная вирусом краснухи, известная под одноименным названием краснуха или германская корь, обычно протекает доброкачественно, но могут быть осложнения в виде артритов, энцефалитов и др. Наиболее серьезные последствия связаны с конгенитальным инфицированием плода во время первого триместра беременности, что приводит к развитию у новорожденного конгенитального краснушного синдрома, проявляющегося различными аутоиммунными, психиатрическими нарушениями, включая фатальную нейродегенеративную болезнь. Вирус краснухи распространен повсеместно, хотя в большинстве стран контролируется профилактической вакцинацией.

2.8. СЕМЕЙСТВО КОРОНАВИРУСОВ

Коронавирусы поражают птиц, кошек, собак, свиней, КРС, лошадей и человека. Коронавирусы содержат плюс-цепи РНК и обладают уникальным механизмом репликации.

В состав коронавирусов входят нуклеокапсид и липопротеидная оболочка, на поверхности которой имеются характерные редко расположенные булавовидные выступы. Высота этих выступов составляет 12—24 нм. Вирионы сферической формы, диаметром 75—160 нм. В вирионах коронавирусов обнаружены также липиды и углеводы клеточного происхождения. Плавучая плотность вирионов в сахарозе 1,15—1,20 г/см^3, коэффициент седиментации 300—500S. Вирионы чувствительны к нагреванию, воздействию жирорастворителей, детергентов, формальдегида, окислителей и УФ-облучению. Некоторые вирусы семейства стабильны при pH 3,0.

Гемагглютинирующая активность коронавирусов связана с одним из гликопротеидов.

Вирионы коронавирусов проникают в клетку посредством абсорбционного эндоцитоза. Затем геномная РНК прикрепляется к рибосомам, что приводит к синтезу вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы. Примерно 2/3 геномной РНК составляет полимеразный ген, в котором присутствует рибосомный сигнал перескакивания рамки считывания. Организация генов неструктурных протеинов, которые расположены между генами структурных белков, различается у разных коронавирусов.

Синтез вирусной РНК проходит через процесс транскрипции РНК-зависимого синтеза РНК, в котором иРНК транскрибируется с негативных цепей. В зависимости от вида вируса и хозяина коронавирусные иРНК могут быть 6—8 видов, различающихся по размеру.

Транскрипция геномной РНК происходит в цитоплазме с образованием комплементарной ей минус-цепи РНК. Синтез ее завершается через 5—6 ч после заражения. Минус-цепь РНК служит матрицей для синтеза как новых геномных, так и субгеномных РНК. Вид и число их соответствует вирусспецифическим иРНК. Субгеномные негативные РНК — зеркальное отражение позитивных субгеномных РНК.

Существует сигнал упаковки в виде шпилевидной структуры, определяющей упаковку дефектных или гетерологичных РНК внутрь вириона. Во время репликации позитивных и негативных РНК коронавирусов происходят рекомбинации.

Сборка вирусных частиц, вероятно, начинается с образования рибонуклеопротеина, взаимодействующего с компонентами корового чехла. Созревание вирионов происходит в цитоплазме путем почкования на эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи. Основной мишенью коронавирусов являются эпителиальные клетки. Иногда может происходить межвидовая передача инфекции, например, инфекция у собак, вызванная вирусом инфекционного гастроэнтерита свиней. Но в целом коронавирусы инфицируют птиц и млекопитающих, включая человека.

Семейство включает два рода — Torovirus и Coronavirus.

Род Torovirus. Включает вирусы Бреда и Берне. Торовирусы передаются фекально-оральным путем и вызывают поражения кишечника у лошадей, крупного рогатого скота и человека.

Род Coronavirus. Состоит из вирусов инфекционного бронхита кур, инфекционного гастроэнтерита свиней, диареи новорожденных телят, коронавируса собак и инфекционного перитонита кошек. Типовой вид — вирус инфекционного бронхита птиц.

Вирус инфекционного бронхита птиц имеет 8 серотипов. Вирус инфекционного гастроэнтерита свиней сходен по антигенной структуре и имеет родство с коронавирусами собак и кошек.

2.8.1. КОРОНАВИРУСЫ НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ

Вирусная диарея телят, вызываемая коронавирусами, мало изучена. В 1972 г. впервые было сообщено об обнаружении коронавируса как этиологического агента диспепсии новорожденных телят. Впоследствии оказалось, что коронавирусы имеют широкую зону распространения и наносят большой экономический ущерб животноводству. Заболеваемость телят — до 100 %, гибель — 15 %, а телят более старших возрастов — 2—5 %.

В естественных условиях болеют телята как молочного, так и мясного скота в возрасте 3—21 дней и до 8 нед. Болезнь протекает в виде энзоотических вспышек, чаще в холодный период года. Заболеваемость зависит от возраста животных: у телят она составляет 40 % (иногда 100 %), у взрослых ниже — 10 %. Тяжесть заболевания зависит от вирулентности вируса, его дозы, наличия в организме бактериальной микрофлоры, условий кормления, содержания и других факторов. Коронавирусная инфекция очень часто протекает в сочетании с ротавирусным заболеванием, а также с другими болезнями, вызванными патогенными агентами как вирусной, так и бактериальной природы.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Coronaviridae, роду Coronavirus. Название происходит от латинского corona в связи с наличием шипиков в виде короны на поверхности вирусной частицы.

Вирионы коронавируса представляют собой частицы с диаметром от 60 до 200 нм. Они состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеидной оболочки, на поверхности которой имеются булавовидные выступы длиной 12—24 нм, образующие подобие солнечной короны.

Геном вируса представлен единой односпиральной линейной плюс-РНК.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус чувствителен к эфиру, хлороформу, трипсину и прогреванию при температуре 56 °С, УФ-лучам. Стабилен в среде с pH 5,0—7,0.

Антигенная структура. Изучена недостаточно, однако известно, что коронавирусы имеют белки трех основных групп: белок нуклеокапсида, который ассоциирован с геномом и формирует спиральный РНП; белки оболочки, являющиеся гликопротеидами, которые обеспечивают адсорбцию и проникновение вируса в клетку и обусловливают слияние вирусной и клеточной мембран; матриксный белок, находящийся в составе вирусной оболочки.

Антигенная вариабельность. Изучена слабо. Серотипы не установлены. Коронавирус крупного рогатого скота не имеет антигенного родства с вирусами инфекционного бронхита птиц и инфекционного гастроэнтерита свиней, относящихся к семейству коронавирусов. Обнаружено антигенное родство с коронавирусом человека (штамм ОС-43), коронавирусом телят.

Литературные данные свидетельствуют о широких антигенных и биологических взаимосвязях между коронавирусами человека и животных некоторых видов (крупного рогатого скота, обезьян, мышей).

Антигенная активность. Вирус индуцирует в организме естественно и экспериментально зараженных животных комплементсвязывающие, преципитирующие, вируснейтрализующие и антигемагглютинирующие антитела, которые выявляют в РСК, РДП, РН, РТГА, РНГА, ИФА.

Культивирование вируса. В лабораторных условиях коронавирус удается культивировать в культуре клеток почки эмбриона крупного рогатого скота (после предварительной адаптации). Вирус вызывает цитопатические изменения в виде синцития и округления клеток. Длительное пассирование вируса приводит к снижению его вирулентности. Вирус размножается в цитоплазме инфицированных клеток.

Гемагглютинирующие свойства. Вирус обладает гемагглютинирующей и гемадсорбирующей активностью в отношении эритроцитов крыс, мышей и хомяков.

Экспериментальная инфекция воспроизводится на телятах, не получивших молозиво, или гнотобиотах. Диарея развивается через 18—24 ч после заражения. Без лечения животные обычно погибают от обезвоживания через 6—7 дней. Интраназальное и интратрахеальное заражение телят сопровождается лишь незначительными респираторными нарушениями.

Клинические признаки. Инкубационный период длится 18—24 ч. У заболевших отмечают угнетение, профузный понос, фекалий желтого цвета, часто с кровянистой слизью. Затем понос становится водянистым, состоящим из творожистых масс. В некоторых случаях наблюдается пенистое слюноотделение из-за наличия язв в ротовой полости. Болезнь продолжается 2—3 нед, приводит к истощению животных и может закончиться их гибелью.

Патологоанатомические изменения. При вскрытии обнаруживают язвы на слизистой пищевода, иногда сычуга. Двенадцатиперстная кишка заполнена газами, стенки ее истончены, прозрачны, с геморрагическими язвами. Слизистая ободочной кишки гиперемирована и изъязвлена, прямой кишки — часто утолщена, на ней образуются продольные отечные складки с язвами. При микроскопическом исследовании отмечают атрофию слизистой тонкого кишечника.

Локализация вируса. Особенность данной инфекции состоит в том, что коронавирус размножается как в кишечнике, вызывая диарею, так и респираторном тракте телят. Вирус преимущественно размножается в дистальной части тонкого и толстого кишечника, в эпителиальных клетках слизистой носовой полости, трахеи и легких. Коронавирус с одинаковой частотой выделяется как из желудочно-кишечного, так и респираторного трактов больных те-

лят. Несмотря на размножение в респираторном тракте, коронавирус не вызывает респираторных заболеваний у телят.

Клинически здоровый рогатый скот может быть хроническим носителем вируса, и в период отела он становится вирусовыделителями. Вирус выделяется с фекалиями не менее 3 мес после отела. Результаты серологических исследований свидетельствуют о широком распространении коронавирусной инфекции. В отдельных стадах 50—98 % коров имеют антитела к коронавирусу.

Источник инфекции — больные и клинически здоровые животные-вирусоносители. Заражение происходит алиментарным путем. Передается заболевание через инфицированные предметы ухода, кормушки и помещения.

Диагностика. Диагноз ставят на основании эпизоотологического анализа, характерных клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований.

Патологический материал параллельно исследуют на ротавирусную инфекцию, вирусную диарею и другие агенты, вызывающие кишечные заболевания у телят.

Взятие и подготовка материала. Для лабораторного исследования направляют пробы фекалий, кусочки кишечника с содержимым и парные сыворотки крови. Отправляют их в лабораторию в термосе с охлаждающей смесью. К исследованию материал подготавливают по общепринятым методам.

Лабораторная диагностика.

Индикация вируса в исследуемом материале направлена на: обнаружение вирионов вируса методом электронной микроскопии и иммуноэлектроноскопии. Используют обычно в научно-исследовательских институтах;

обнаружение вирусного антигена с использованием ИФА, РИФ, РГА;

обнаружение вирусной нуклеиновой кислоты с помощью ПЦР.

Изоляцию вируса из исследуемого материала обычно проводят на культуре клеток почки эмбриона коров. Однако в связи с трудностью культивирования вируса этот метод не получил широкого применения в диагностических лабораториях.

Идентификацию вируса проводят одновременно с его индикацией методами электронной микроскопии (ЭМ), иммунной электронной микроскопии (ИЭМ), ИФА, РИФ, РТГА, РСК.

Ретроспективная диагностика. Для этой цели используют сыворотки крови от коров и парные сыворотки, взятые от больных телят с интервалом 2—3 нед. Сыворотки крови исследуют в серологических реакциях: РТГА, РСК. Может быть использована РН при наличии штамма коронавируса, адаптированного к культуре клеток.

В настоящее время в диагностических лабораториях для индикации и идентификации вируса в исследуемом материале чаще используют ИФА, РГА и РТГА, а для обнаружения антител в сыворотках крови — РТГА с эритроцитами мышей.

Дифференциальная диагностика. Необходимо исключить ротавирусную инфекцию, вирусную диарею, а также колибактериоз и другие бактериальные инфекции.

Иммунитет и специфическая профилактика. В сыворотках крови телят-реконвалесцентов установлены вируснейтрализующие антитела в различных титрах. Сывороточные антитела у животных-реконвалесцентов не защищают их от повторного инфицирования. Видимо, в защите имеет значение местный иммунитет. При коронаинфекции С. А. Мебус (1974) из смывов кишечника телят-реконвалесцентов выделил специфические γ-глобулины классов IgM и IgA, которые нейтрализовали коронавирусы в разведении 1 : 32. Это можно рассматривать как оценочный тест иммунной защиты организма.

Для специфической профилактики применяют живую и инактивированную вакцины. Их готовят из полевого штамма коронавируса, выделенного из фекалий больных телят и адаптированного к культуре клеток почки и легкого эмбриона коровы. Телят вакцинируют перорально сразу после рождения, а стельных коров — парентерально за 30—90 дней до отела.

Наиболее эффективный метод борьбы с вирусной диареей новорожденных телят — вакцинация живой вакциной, полученной из аттенуированных штаммов рота- и коронавирусов. В экспериментальных условиях она защищает всех телят, а в полевых — снижает количество заболевших. Инактивированные вакцины пригодны для вакцинации коров и создания колострального иммунитета. Выпаивание телятам молозива вакцинированных коров, содержащего антитела в титре 1 : 128 и выше, снижало заболеваемость телят в 4—7 раз и предотвращало их гибель.

Показано, что иммунизация коров в последней трети стельности живой вакциной против корона-, рота- и колиинфекции влияла на экскрецию коронавируса. Среди вакцинированных количество вирусовыделителей в период отела не увеличивалось, тогда как в контрольной группе животных возросло с 20—30 до 65—70 %.

Система профилактики и борьбы с вирусной диареей телят должна быть направлена на своевременное и всестороннее диагностическое обследование коров (матерей и телят) на вирусные инфекции и установление ассоциации возбудителей кишечных заболеваний.

2.8.2. ВИРУС ИНФЕКЦИОННОГО ГАСТРОЭНТЕРИТА СВИНЕЙ

Инфекционный гастроэнтерит свиней (ИГС, трансмиссивный гастроэнтерит свиней — ТГЭС) — остро протекающая, высококонтагиозная болезнь. Поражает главным образом поросят до 3-месячного возраста. Проявляется рвотой, тяжелой диареей и высо-

кой смертностью (до 100 %) среди поросят до 2-недельного возраста.

Впервые болезнь описали в 1946 г. Дойл и Хитингс в США. Позже вспышки ее замечены в Японии, Великобритании, Канаде, Европе. В настоящее время распространенность ИГС в большинстве европейских стран составляет около 100 % с гибелью при вспышках до 38 %поросят первых дней жизни.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Coronaviridae роду Coronavirus. Вирионы полиморфны, диаметр их 60—160 нм. Вирион содержит геном в виде односпиральной плюс-РНК и капсида кубического типа симметрии. Нуклеокапсид покрыт оболочкой с булавовидными отростками (пепломерами), которые и придают оболочке вид солнечной короны. Оболочка вириона клеточного происхождения.

ВИГС содержит 3 главных структурных белка: нуклеокапсидный белок — N, мелкий оболочечный гликопротеин — M и большой гликопротеин пепломеров — S. Конец гликопротеина M выступает из вириона и обеспечивает индукцию комплементсвязывающих и вируснейтрализующих антител, а также интерферона. Гликопротеин S отвечает за прикрепление вируса к клетке, расплавление мембраны и индукцию вируснейтрализующих антител.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус чувствителен к эфиру, хлороформу, но устойчив к трипсину. Хорошо инактивируется дезинфицирующими растворами, устойчив к замораживанию (сохраняется до 8 нед). При минус 20—80 °С вирус сохраняется до одного года, при 56 °С инактивируется за 30 мин, при 37 °С — за 4 дня. Вирус инактивируется при pH 4,9. Сохранение инфекционности ВИГС в кишечнике при pH 3,0 обеспечивается присутствием желчи. Во внешней среде вирус сохраняет инфекционность в каловых массах до 6 ч на солнце и до 3 сут в тени.

Антигенная структура. Определяется свойствами белков вируса. Сердцевина ВИГС представлена геномной РНК с ковалентносвязанным и фосфорелированным нуклеокапсидным белком с молекулярной массой 47 кД. Вокруг нее располагаются вирусспецифические протеины двух типов: M с молекулярной массой 28 кД и S с молекулярной массой 200 кД. В вирусе выявлено 4 антигенных сайта (A, B, C и D) и идентифицировано 11 эпитопов, 8 из которых вируснейтрализующие.

Главные нейтрализующие детерминанты связаны с S-гликопротеином; эти эпитопы высококонсервативны у большинства штаммов вируса. Нейтрализующая активность монАТ к гликопротеину M низкая, но может быть значительно увеличена комплементом.

Антигенная активность ВИГС выражается способностью индуцировать синтез вируснейтрализующих антител, активность которых после переболевания обусловлена IgA, а после иммунизации — IgG. Вирусный нуклеопротеин (N) не способен индуцировать синтез вируснейтрализующих антител.

Пассивный иммунитет поросят против кишечной инфекции обусловлен получением IgA с молозивом и молоком, в которых титр антител выше, чем в сыворотке крови свиноматок. Высокий уровень IgA в молозиве и молоке обнаруживают только после поедания свиноматками вируссодержащего материала. Поросята в течение нескольких недель могут получать IgA с молозивом и молоком от свиней-реконвалесцентов.

Антигенная вариабельность и родство. ВИГС имеет один серотип и его варианты. Штаммы, выделенные в разных странах, серологически идентичны, но различаются по вирулентности.

Для поросят патогенны 4 коронавируса: ВИГС; респираторный коронавирус свиней; ГА-вирус энцефаломиелита и вирус эпидемической диареи поросят. Антигенное родство высокой степени (до 96 % аналогии последовательности нуклеотидов в вирусном геноме) установлено между вирусами ИГС и РКВС. С третьим и четвертым вирусами энцефаломиэлита и эпидемической диареи поросят родство ВИГС полностью отсутствует.

В то же время два других коронавируса — вирус инфекционного перитонита кошек (ВИПК) и коронавирус собак (КВС) оказались антигенно родственны ВИГС и в эксперименте способными вызывать заболевание у поросят. Наиболее близкое антигенное родство с ВИГС имеет ВИПК — 93 % аналогии в вирусном геноме. Однако это родство одностороннее: антитела к ВИПК образуют комплекс с ВИГС, что используется в диагностике инфекционного гастроэнтерита свиней. Аналогичного эффекта с антителами к ВИГС не наблюдается.

Культивирование вируса. Лабораторные животные к вирусу нечувствительны. Естественно-восприимчивые животные, лучше поросята-сосуны в возрасте 1—15 дней, легко заражаются введением вируса per os или интраназально.

Наиболее чувствительны к заражению ВИГС первичные культуры клеток эпителия слизистых кишечника, носовой полости и других тканей поросенка, в том числе органные культуры пищевода. Из перевиваемых линий наиболее чувствительна суспензионная культура почки поросенка, используемая для получения вакцины, однако вызывать ЦПД даже в обычной культуре клеток вирус может только после его адаптации.

Гемагглютинирующая активность. У ВИГС она установлена в отношении эритроцитов цыплят, морских свинок и крупного рогатого скота. ВИГС не имеет в своем составе гемагглютинирующего белка. Его гемагглютинирующая активность зависит от той системы, в которой он репродуцируется. Так, при размножении вируса в культуре клеток щитовидной железы свиней вирус агглютинирует эритроциты морской свинки, достигая титров 64—256 ГАЕ (гемагглютинирующих единиц).

Клинические признаки. Инкубационный период у 1—15-дневных поросят длится всего 12—18 ч. Болезнь клинически проявляется отсутствием аппетита, рвотой, диареей с беловатыми, желтоватыми или зеленоватыми пенистыми фекалиями, обезвоживанием, слабостью и высоким падежом. С возрастом животных инкубационный период увеличивается, смертность уменьшается. У больных кормящих свиноматок снижается продукция молока. Высокую чувствительность новорожденных к вирусу ИГС связывают со снижением у них и у свиноматок при опоросе цитотоксичности лимфоцитов в отношении клеток, инфицированных вирусом. В этих условиях поросята могут быть защищены только антителами матери, полученными с молозивом и молоком.

Различают три стадии болезни: предклиническую, клиническую и выздоровления. В предклинической стадии наблюдают снижение аппетита, сонливость, повышенную жажду, иногда лихорадку (41—41,5 °С) и рвоту.

Клинический период характеризуется сильной диареей с выделением газов. Фекалии серо-красного или желто-зеленого цвета. Заболевшие поросята испытывают сильную жажду, пьют много воды и сосут молоко, которое в непереваренном виде проходит с жидкими фекалиями. Обезвоживание организма ведет к метаболическому ацидозу, изменениям в электролитическом балансе крови. Смерти обычно предшествует кома, наступающая на 3-й день, т. е. болезнь длится 2—5 дней. Выжившие поросята выздоравливают к 7—10-му дню. Они отстают в росте.

У свиноматок, зараженных при контакте с больными поросятами, повышается температура тела, исчезает аппетит. У них отмечают умеренную диарею и прекращение лактации. ИГС, как правило, осложняется колибактериозом и другими бактериальными инфекциями.

Патологоанатомические изменения. У поросят-сосунов, павших в первые 3 дня жизни, в желудке и тонком кишечнике находят свернувшееся молозиво, набухание и покраснение слизистой. Труп поросят 2-недельного возраста истощен, слизистые бледные. На ушах, брюхе красно-фиолетовые пятна. Слизистые оболочки желудка и тонкого кишечника катарально или катарально-геморрагически воспалены, местами эрозированы. Почки и слизистые мочевого пузыря усеяны кровоизлияниями. Оболочки головного мозга гиперемированы, вещество мозга с мелкими кровоизлияниями.

Гистологическими исследованиями в желудке отмечают признаки серозного или фибринозного гастрита. В тонком кишечнике находят некроз и десквамацию эпителия ворсинок вплоть до полного их оголения, в печени, почках — зернистая дистрофия. В головном мозге выявляют периваскулярные лимфоцитарные «муфты», очаги пролиферации глии.

Локализация вируса. Благодаря кислотоустойчивости вирус проходит желудок, проникает в эпителий тонкого кишечника. Размножение вируса в цитоплазме клеток ворсинок слизистой обо-

лочки вызывает дегенерацию и некроз их уже через сутки после заражения. Под влиянием продуктов распада этих клеток усиливается проницаемость стенок капилляров, вирус проникает в кровь, разносится по организму и попадает в паренхиматозные органы, слизистые носа, трахеи, миндалин, где также размножается. Из органов по периферическим путям вирус попадает в периферические ганглии, нейроны спинного и головного мозга.

Однако основная масса вируса локализуется в эпителии кишечника, вызывая некроз и десквамацию клеток ворсинок, из-за чего ворсинки атрофируются. Этот процесс наиболее выражен в двенадцатиперстной, тощей и подвздошной кишках и ведет к нарушению процессов пищеварения, диспепсии, диареи, обезвоживанию, нарушению обмена веществ. Отмечают ацидоз, общую интоксикацию и гибель животных. Максимальной концентрации вирус достигает в эпителии тонкого кишечника, содержимом желудочно-кишечного тракта и ткани легкого. У 3-недельных поросят вирус выделяют только из кишечника в течение 3—5 дней после заражения.

Из организма больного животного вирус выделяется с калом, реже с мочой и с другими экскрементами. Вирусовыделение наблюдают в течение двух месяцев. Но в организме ВИГС может персистировать месяцы, годы и давать обострения при стрессовых воздействиях.

Источник инфекции. Основной источник ИГС — животные, находящиеся в инкубационном периоде, больные и переболевшие (в течение месяца). Они передают вирус алиментарно и аэрогенно. Инфекцию могут распространять собаки и лисицы, которые являются инапарантным (бессимптомным) источником для свиней. Вирус может передаваться и домашними мухами, в тонком кишечнике которых его можно обнаружить в течение 3 мес, а в органах дыхания — до 11 дней.

В естественных условиях к вирусу восприимчивы свиньи и собаки. Среди свиней наибольшей чувствительностью к заражению обладают поросята до 3-недельного возраста. Собаки могут быть инапарантными носителями вируса или переболевать с потерей аппетита, поносом, рвотой и гипертермией. Вирусом, выделенным от больных собак, удавалось заражать недельных поросят. Различают инфекцию в форме эпизоотий и энзоотий.

Широкое распространение ИГС, высокая смертность новорожденных поросят, низкая эффективность лечения, возможность заноса вируса в хозяйства перелетными птицами обусловливают значительный экономический ущерб свиноводству.

Диагностика. Диагноз ставят на основании анализа эпизоотологических данных, симптомов болезни и результатов лабораторных исследований.

Патологический материал для лабораторных исследований берут от 8—9 больных поросят (2—3 поросенка из помета) в начальной стадии проявления клинических признаков болезни. Берут

отрезок тощей или подвздошной кишки длиной 10—12 см с содержимым, мезентериальные лимфатические узлы. Дополнительно для диагностики могут быть направлены кусочки легкого, печени, селезенки, почек, головного мозга.

От свиноматок, в пометах которых болеют новорожденные поросята, получают парные сыворотки с интервалом 21 день.

Лабораторная диагностика. Обнаружение вируса. Обнаружение вирусного антигена (белка) при ИГС проводят с помощью РИФ как метода экспресс-диагностики. Реакция считается положительной при наличии в препаратах ярко-зеленого свечения клеток или цитоплазмы с ярко светящимися гранулами разного размера при отсутствии флюоресценции в контрольных препаратах. В РИФ используют антитела к вирусу инфекционного перитонита кошек, так как антитела к ВИГС, полученные от поросят, могут давать неспецифическое свечение.

Твердофазный ИФА также может быть успешно применен для обнаружения вируса ИГС. Использование в РИФ и ИФА моноклональных антител позволяет одновременно с обнаружением ВИГС его дифференциацию от РКВС.

Встречный иммуноэлектроосмофорез (ВИЭОФ) позволяет легко выявлять ВИГС в экстрактах содержимого кишечника больных поросят.

Активный вирус в патологическом материале обнаруживают биопробой на культуре клеток и естественно-восприимчивых животных. Материл положительной биопробы содержит выделенный вирус. Биопробу проводят на первичных и перевиваемых линиях клеток поросят. Обычно ЦПД вируса наступает через 2—7 пассажей и вызывается не каждым штаммом ВИГС. Можно использовать суперосных свиноматок за 3—5 дней до опороса. Биопробу считают положительной, если через 24 ч поросята, родившиеся от зараженной свиноматки, заболевают с клиникой ИГС. Более надежный метод обнаружения и выделения ВИГС — биопроба на поросятах.

Для выделения вируса поросят убивают через 24 ч после появления диареи, и полученные от них материалы подвергают вирусологическому исследованию.

Идентификацию выделенного вируса проводят:

гистологическими исследованиями. Обнаруживают атрофию ворсинок в тонком кишечнике; в цитоплазме эпителиальных клеток выявляют вакуоли;

РИФ;

РН в культуре клеток и на восприимчивых поросятах в возрасте 1—5 дней;

твердофазным ИФА с использованием моно- и поликлональных антител.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. Для более точной диагностики лучше исследовать парные сыворотки, взятые с интервалом 3—4 нед.

Выявление и титрование антител к ВИГС проводят с использованием:

РН в культуре клеток с двухкратными разведениями исследуемых сывороток;

РНГА. Она более чувствительна, чем РН и выявляет антитела уже на 4-й день болезни. Используют как для подтверждения клинического диагноза, так и для определения вирусоносительства, скрытых форм болезни и контроля за эпизоотическим состоянием хозяйств в отношении гастроэнтерита;

твердофазного ИФА. Метод позволяет обнаружить антитела к ВИГС раньше и в более высоких титрах, чем в РН;

РТГА с эритроцитами морской свинки в 0,6%-ной концентрации при температуре 4 °С. Реакция пригодна для обнаружения антител в сыворотке крови и молоке свиноматок;

непрямого метода РИФ с использованием ВИГС, содержащегося в инфицированных им культурах клеток. Имеет ряд преимуществ перед РН.

Дифференциальная диагностика. Диарейный синдром у свиней имеет преимущественно вирусную этиологию с преобладанием среди возбудителей болезни рота- и коронавирусов. Дифференциацию указанных болезней и широкий эпизоотологический анализ проводят преимущественно с помощью ИФА.

Инфекция, обусловленная РКВС, первоначально тестируется как ИГС и может быть дифференцирована специальными исследованиями. Респираторный коронавирус свиней персистирует в закрытых фермах с циклическими эпизоотическими вспышками даже на фоне пассивных сывороточных антител. Респираторный коронавирус свиней пневмотропен, а ВИГС — энтеротропен.

Иммунитет и специфическая профилактика. При ИГС решающее значение имеет местный иммунитет кишечника. Гуморальные антитела не защищают животных от заражения. У поросят иммунитет слабый и непродолжительный, у переболевших свиней — до двух лет.

После перорального, но не парентерального проникновения в организм ВИГС при участии респираторных и кишечных лимфоидных тканей синтезируются секреторные IgA. Их можно обнаружить в кишечном содержимом и сыворотке крови. Появление значительных количеств IgA в молозиве — результат синтеза их иммунокомпетентными клетками, мигрирующими в молочные железы.

Важную роль в защите против болезни наряду с местным антитело-обусловленным иммунитетом играет клеточно-обусловленный иммунитет. Однако механизм обеспечения резистентности эпителия тонкого кишечника к ВИГС пока до конца не изучен.

С учетом особенностей иммунитета при ИГС строится стратегия специфической профилактики заболевания. По аналогии с естественным путем заражения используют сочетание оральной и

интраназальной вакцинации. Вакцинация супоросных свиней другими методами (внутримышечно, внутрь молочной железы) оказалась менее эффективной.

Наряду с повсеместным применением живых вакцин (из штамма Римс ГДР, ВГНКИ штамм № 5) ведутся работы по созданию инактивированных, субъединичных и гетерологичных вакцин для специфической профилактики ИГС.

2.8.3. ВИРУС ИНФЕКЦИОННОГО БРОНХИТА ПТИЦ

Инфекционный бронхит (ИБ) — высококонтагиозная болезнь, проявляющаяся у цыплят респираторным и уремическим синдромом, а у кур — поражением герминативных органов и снижением яйценоскости.

Заболевание распространено во всех странах с развитым промышленным птицеводством. Наносит огромный экономический ущерб, заключающийся в снижении мясной и яичной продуктивности на 50—60 %, гибели цыплят первого месяца жизни до 30 %, выбраковке до 60 % птицы при хроническом течении болезни с осложнениями бактериальными инфекциями.

В естественных условиях восприимчивы куры всех возрастных групп; наиболее подвержены заболеванию цыплята до 30-дневного возраста. Человек переболевает с легкими признаками поражения верхних дыхательных путей.

Характеристика возбудителя. Возбудитель ИБ — РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Coronaviridae. Вирионы его изометрической формы, размером 70—120 нм, заключены в суперкапсидную оболочку с редкими булавовидными выступами, напоминающими солнечную корону.

Все штаммы вируса ИБ очень чувствительны к УФ-облучению, в течение трех минут обезвреживаются 1%-ными растворами фенола, крезола, формалина, 70%-ным раствором этилового спирта. В аллантоисной жидкости при минус 25 °С сохраняют активность до 537 дней.

Антигенная вариабельность. Вирусу присуща значительная антигенная вариабельность. Определены 7 серотипов. Выделенные в нашей стране штаммы относятся к серотипам Массачусетс и Коннектикут. Выделение полевых изолятов, отличающихся по антигенному составу от этих серотипов, вынуждает вести работу по созданию новой вакцины.

Антигенная структура. Белки вируса различаются по тканевому тропизму. Патогенность штаммов вируса связана с изоэлектрическими точками их белков. Классификация белков на основе изоэлектрических точек позволяет идентифицировать высокопатогенные и персистентные штаммы. На поверхности вируса обнаружено пять агглютининов: A, B, C, D, E, из которых первые четыре ответственны за нейтрализацию вируса.

Из 16 моноклональных антител все реагировали с белками пепломеров, а один тип антител нейтрализовал инфекционность и подавлял гемагглютинирующую активность вируса.

Антигенная активность. Переболевание птицы сопровождается образованием антигемагглютинирующих, вируснейтрализующих антител и практически пожизненным иммунитетом к гомологичному типу вируса. У кур-реконвалисцентов вируснейтрализующие антитела обнаруживались 482 дня. Преципитирующие антитела появлялись в сыворотке крови через 2—3 нед, но исчезали раньше, чем вируснейтрализующие антитела. В крови кур-реконвалисцентов найдены комплементсвязывающие антитела.

Культивирование вируса. Вирус удается культивировать на куриных эмбрионах при заражении в аллантоисную полость, амнион или на ХАО. Признаки размножения вируса в курином эмбрионе — «эффект карликовости» (замедление роста), мумификация, шарообразная форма зародыша и гибель на 3—6-й день после заражения. Значительное количество штаммов вируса размножается в культуре клеток куриного эмбриона и ВНК-21 с образованием ЦПД.

Гемагглютинирующая активность. У большинства штаммов вируса ИБ она не наблюдается. Штамм Коннектикут способен агглютинировать эритроциты кур, штамм же Массачусетс проявляет такую активность только после обработки трипсином или фосфолипазой С.

Клинические признаки. Отмечают три клинических синдрома болезни: респираторный, нефрозо-нефритный и репродуктивный.

Респираторный синдром проявляется чаще у цыплят до 1-месячного возраста и характеризуется кашлем, трахеальными хрипами, носовыми истечениями, затрудненным дыханием, конъюнктивитом, синуситом и высокой летальностью. У цыплят 1—2-месячного возраста болезнь протекает хронически с колибактериозом и микоплазмозом.

Нефрозо-нефритный синдром наблюдают у цыплят до 2-недельного возраста при заражении их нефротропными штаммами вируса. Появляется диарея, гибнет до 70 % цыплят.

Репродуктивный синдром регистрируют обычно у кур старше 6 мес; характеризуется резким снижением яйценоскости, неправильной формой скорлупы яиц. У 20—25 % кур-несушек, переболевших ИБ в раннем возрасте, отмечают недоразвитость яйцевых фолликул.

Патологоанатомические изменения. При вскрытии обнаруживают серозный катаральный и казеозный экссудат в трахее и бронхах (при респираторном синдроме) (цв. вкл., рис. 48), поражение почек (цв. вкл., рис. 49) и мочеточников (при нефрозо-нефритном синдроме), недоразвитость яйцевых фолликулов (при репродуктивном синдроме).

Локализация вируса. В первые две недели болезни вирус адсорбируется на клетках слизистых оболочек респираторного тракта и

размножается в них. Развитие инфекционного процесса сопровождается виремией с локализацией вируса в лейкоцитах и эритроцитах в течение нескольких недель после заражения. С кровью вирус попадает в почки, легкие, яичники и яйцеводы, в клетках которых размножается и вызывает патологический процесс. Удается обнаружить его также в селезенке (до 49 дней), в почках (до 35 дней), в клоаке (до 45 дней).

Выделяется вирус с истечениями из глаз и носа, а также с фекалиями, у петухов — со спермой в течение 20 дней после заражения. С содержимым яиц от больных кур вирус выделяется до 6 недель после их заражения.

Источник инфекции. Основной источник инфекции — больные и переболевшие цыплята и куры. Выздоровевшие птицы остаются вирусоносителями, а хозяйство ряд лет считается неблагополучным по заболеванию. Вирус передается аэрогенно, алиментарно, прямым и непрямым контактом, а также трансовариально.

Диагностика. Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков болезни, патологоанатомических изменений и лабораторных исследований.

Лабораторная диагностика. Патологическим материалом для лабораторных исследований служат смывы с гортани, трахеи от больных птиц и соскобы от трупов, кусочки легких, почек, а от взрослой птицы — почки и яйцеводы.

Обнаружение вирусной нуклеиновой кислоты в патологическом материале проводят с помощью ПЦР. Антиген вируса можно быстро обнаружить в РДП и РИФ. Использование в РИФ группоспецифических моноклональных антител или гипериммунной сыворотки позволяет сразу же провести серотипизацию.

Активный вирус ИБ обнаруживают биопробой. Наиболее результативно проведение ее на цыплятах 10—25-дневного возраста из хозяйств, благополучных по респираторным болезням. Суспензией, полученной из патологического материала, заражают цыплят интратрахеально и через 1—5 дней наблюдают появление респираторных симптомов и патологоанатомических изменений, характерных для ИБ.

Для постановки биопробы на 8—10-дневных куриных эмбрионах необходимо провести 6—8 «слепых» пассажей. В процессе пассирования полевой изолят вируса адаптируется к куриным эмбрионам, и на них начинают проявляться типичные для ИБ патологические изменения. Культуру клеток для биопробы не используют, так как в ней вирус может вызвать ЦДП только после адаптации к куриным эмбрионам.

Идентификация. Материал, полученный в результате биопробы, содержит вирус, который необходимо идентифицировать в РДП, РНГА и РИФ, а типовую принадлежность определяют в РН на куриных эмбрионах и в РТГА.

Быстрее поставить диагноз позволяют серологические исследования.

Серодиагностика основана на выявлении у больных и переболевших птиц антител в РН, РНГА и ИФА. Причем если РН определяет накопление антител в организме в период с 10-го по 36-й день болезни, то РНГА — со 2-го по 14-й день, ИФА — с 3-го дня.

Установлено, что серологические данные не позволяют судить о резистентности конкретного поголовья птиц к заражению вирусом ИБ, так как не всегда уровень антител коррелирует с резистентностью. В последнем случае важную роль играет местный тканевый иммунитет респираторного трахеита.

Дифференциальная диагностика Следует учитывать, что ИБ сходен с инфекционным ларинготрахеитом, ньюкаслской болезнью и гриппом птиц. Дифференциальную диагностику этих заболеваний проводят лабораторными методами.

Иммунитет и специфическая профилактика. Переболевшая птица резистентна к заражению гомологичным штаммом вируса в течение 5—6 мес. Трудность обеспечения специфической профилактики инфекционного бронхита кур обусловлена большой антигенной и иммунологической вариабельностью полевых штаммов вируса.

Для профилактики инфекции применяют как живые, так и инактивированные вакцины. Материнские антитела от иммунных кур-несушек передаются через яйцо цыплятам и защищают их в первые 2—4 нед жизни. Наиболее выраженный иммунный ответ получен при вакцинации в 3—4-недельном возрасте живой вакциной, а в 16-недельном — инактивированной. Учитывая факт образования местного тканевого иммунитета в респираторном тракте, живые вакцины применяют орально (с питьевой водой) или путем закапывания в нос.

2.8.4. ВИРУС ИНФЕКЦИОННОГО ПЕРИТОНИТА КОШЕК

Инфекционный перитонит кошек (ИПК) — вирусное заболевание с различными клиническими синдромами. Классический, или выпотной, ИПК характеризуется появлением тягучей, соломенного цвета жидкости в перитонеальной и плевральной полостях. При сухом ИПК во многих органах развиваются хронические гранулематозные патологические изменения с соответствующими клиническими признаками. Оба вида перитонитов, как сухого, так и выпотного, чаще всего заканчиваются летальным исходом.

Характеристика возбудителя. Заболевание впервые описал Холзворс в 1963 г., а вирус, вызывающий его, выделили Хорзинек и Остерхаус в 1977 г.

Вирус ИПК (ВИПК) относится к семейству Coronaviridae. Вирионы его плеоморфные, 80—160 нм в диаметре. Вирусный геном

представлен односпиральной линейной плюс-РНК. Длина ее 16—21 нм, молекулярная масса 6,5—11 мД. Нуклеокапсид гибкий, протяженный, спиральной симметрии, окружен липропротеиновой суперкапсидной оболочкой, с двумя вирусными гликопротеинами — матриксным и пепломерным. Пепломеры представляют собой булавовидные, расположенные подобно солнечной короне, выступы длиной 12—25 нм.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Во внешней среде вирус инактивируется в течение одного дня. Нагревание и большинство дезинфицирующих средств быстро инактивируют его. Довольно устойчив вирус к фенолам, низкому pH, хорошо сохраняется при низких температурах.

Антигенная структура. Изучена недостаточно. Антигенных вариантов вирус не имеет.

Антигенное и иммунологическое родство ВИПК установлено с кишечными коронавирусами кошек, с коронавирусами собак и вирусом инфекционного гастроэнтерита свиней. Имеются сообщения о способности коронавируса собак инфицировать кошек и вызывать у них заболевание.

Классификация коронавирусов кошек до сих пор полностью не определена.

Гемагглютинирующие и гемадсорбирующие свойства. У ВИПК они не изучены.

Антигенная активность. Характеризуется активным иммунным ответом инфицированных кошек при трех вариантах клинических проявлений болезни: отсутствие клинических признаков, развитие их с последующей гибелью животного, длительное отсутствие симптомов болезни с последующими параличами, снижением титров антител и гибелью.

Роль антител в патогенезе болезни весьма сложна. Выработка большого количества антител зачастую ведет к ускоренному и усиленному выпотному ИПК. Причиной такого явления может быть активизация поглощения вируса макрофагами, в которых он и развивается. Другой возможной причиной может быть депонирование иммунных комплексов в сосудистом эндотелии.

Культивирование вируса проводят в культурах клеток легкого эмбриона кошки.

Клинические признаки. Признаки болезни появляются через 3 нед после экспериментального заражения. Чаще заболевание бывает бессимптомным, иногда сопровождается поносом.

В начале проявление как выпотного, так и сухого ИПК сходно, нехарактерно и заключается в гипертермии (39,5 °С), снижении массы тела, анорексии и депрессии. Иногда у кошек появляются симптомы поражения верхних дыхательных путей или диарея.

При выпотном ИПК после неспецифических симптомов быстро развивается асцит одновременно с анемией и летальным исходом. Примерно у 20 % заболевших кошек наблюдают выпоты в плевральную полость, что проявляется возникновением диспноэ. Иногда у животных наблюдают желтуху.

При сухом ИПК во многих органах развиваются гранулематозные патологические изменения. Клинические симптомы при этом характерны для нарушений в тех органах, которые вовлечены в патологический процесс. Чаще поражаются органы брюшной полости (печень, почки), центральная нервная система и глаза. У животных наблюдают атаксию, нистагм, иридоциклит, ретинит, судороги, парезы и параличи. Патологические изменения, характерные для сухого ИПК, могут сопутствовать выпотному ИПК.

Патологоанатомические изменения. При выпотном ИПК перитонеальная жидкость желтого или сероватого цвета, липкая, вязкая, с высокой концентрацией белка (32—118 г/л) и хлопьями фибрина; при встряхивании пенится. В ней обнаруживают нейтрофилы, лимфоциты, макрофаги и мезентериальные клетки. В плазме также отмечается гиперпротеинемия с повышенным содержанием глобулинов, в основном антикоронавирусных антител. Многие поверхности серозных оболочек с серовато-белыми фибринозными наложениями. Сальник темный, утолщенный, зернистый. Белые очаги на срезе внутренних органов представляют собой гранулематозные патологические изменения. Изменения, наблюдаемые в плевральной полости, распространяются на легкие.

При сухом ИПК в основном находят различного размера гранулематозные изменения. В печени, почках, лимфатических узлах они могут достигать нескольких сантиметров.

Гистологические изменения при выпотном ИПК характеризуются фибринозно-клеточным экссудатом на поверхности серозных оболочек органов брюшной полости. Фолликулярная гиперплазия, некротические зоны и пиогранулематозные патологические изменения обнаруживают в лимфатических узлах брюшной полости и селезенке, в печени — некротический тромбический васкулит.

При сухом ИПК изменения сходны с описанными при выпотном ИПК, но с меньшим количеством экссудата и более значительной клеточной патологией. Отмечают признаки точечного рассеянного воспаления в глазах, внутриглазная жидкость мутная в связи с присутствием в ней фибрина и клеток. В центральной нервной системе — флебиты мозговых оболочек.

Миндалины инфицированных кошек инфильтрированы полиморфноядерными нейтрофилами и макрофагами, с экссудативными процессами.

Локализация вируса. В организме через 24 ч после заражения возбудитель локализуется в миндалинах и тонком кишечнике. Да-

лее в инфекционный процесс вовлекаются органы брюшной полости с помощью макрофагов, в которых вирус активно размножается, он переносится в слепую и ободочную кишки, мезентериальные лимфоузлы, печень, асцитную и плевральную жидкости.

Наибольшее количество вируса содержит сыворотка или плазма крови.

Источник инфекции. Заболевание встречается повсеместно. Клинически выраженный ИПК у домашних кошек встречается спорадически, в питомниках поражает 5—10 % популяции.

Тяжелый перитонит, как правило, с летальным исходом наблюдают у кошек в возрасте от 6 мес до 2 лет и особей старше 11 лет. От больного животного здоровому вирус передается обычно алиментарно, но возможно также аэрогенно и трансплацентарно. Выделяется вирус со слюной и фекалиями уже в инкубационный период. Есть мнение, что инфицированные ВИПК кошки могут быть постоянными вирусоносителями и оказаться источником инфекции как для своего вида, так и для животных других видов.

Диагностика. Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований.

Лабораторная диагностика. В качестве патологического материала в лабораторию направляют слюну, фекалии, асцитную и плевральную жидкости, а также сыворотку крови и плазму.

Индикация вируса осуществляется с помощью ПЦР, РИФ и ИФА.

Выделение вируса проводится в культуре клеток легкого эмбриона кошки. *Идентификация* выделенного вируса осуществляется в ПЦР, РИФ, ИФА анализом циркулирующих иммунных комплексов. В серологических реакциях, применяемых для идентификации ВИПК, используют гипериммунные сыворотки, содержащие моноклональные антитела, что позволяет идентифицировать даже антигенно-родственные коронавирусы.

Одновременно проводят биохимические исследования сыворотки крови и определяют соотношение в ней альбуминов и глобулинов.

Обнаружение антител к ВИПК проводят в ИФА, РТГА и РН.

Дифференциальная диагностика. Выпотной ИПК дифференцируют от других причин асцита и выпота в плевральную полость, например, при бактериальном перитоните, сердечной недостаточности, циррозе печени, лимфоцитарном холангите, опухоли.

Сухой ИПК, когда у кошки наблюдают снижение массы тела, отсутствие аппетита и устойчивую гипертермию, следует дифференцировать от лейкоза, иммунодефицита и токсоплазмоза. Признак, помогающий дифференцировать ИПК от названных болезней, — вовлечение в патологический процесс глаз (иридоциклит, ретинит).

Специфическая профилактика. Для профилактики ИПК пока не предложено ни одной вакцины.

2.9. СЕМЕЙСТВО ОРТОМИКСОВИРУСОВ

Семейство Ortomyxoviridae (от греч. orthos — правильный, прямой и муха — слизь) объединяет группу вирусов, которые имеют особое родство к мукополисахаридам и гликопротеидам клеточных рецепторов, а также сходные биологические свойства, среди которых способность агглютинировать эритроциты, тропизм к органам дыхания, легкость культивирования в куриных эмбрионах, наличие гемагглютинина, а у некоторых вирусов — нейраминидазы.

Вирионы сферические, нитевидные, плеоморфные, размером 80—120 нм. Снаружи имеется липопротеидная оболочка, которая образует спайкообразные выступы. Нуклеокапсид состоит их сегментов и имеет спиральный тип симметрии. Молекулярная масса вириона 250 МД, плавучая плотность в сахарозе 1,19 г/см^3, коэффициент седиментации 700—800S.

В вирионе обнаружено семь протеинов, из которых три наружные и четыре внутренние. Наружные протеины [гемагглютинин (H) и нейраминидаза (N)] являются гликопротеидами и входят в состав липопротеидной оболочки вириона. Протеин M (матриксный) выстилает липопротеидную оболочку изнутри и функционирует как ионный тоннель. Три внутренних протеина (PB1, PB2, PA) формируют нуклеокапсид, четвертый (NP) связан с наружным фрагментом РНК.

Геном представлен односпиральной, линейной, сегментированной, минус-нитевой молекулой РНК. Представители ортомиксовирусов разных родов имеют в своем составе разное количество сегментов: вирусы гриппа А и В — 8 сегментов; гриппа С — 7; тоготовирусы — 6 сегментов. Длина одного сегмента составляет 900—2350 нуклеотидов.

Липиды и углеводы оболочки вириона имеют клеточное происхождение и составляют от массы частицы соответственно 18—37 и 5 %.

Вирус адсорбируется на клетках за счет взаимодействия гемагглютинина с сиаловой кислотой рецепторов клеточных мембран и проникает внутрь путем эндоцитоза или слияния. Вирусные нуклеотиды транспортируются в ядро клетки, где происходит транскрипция иРНК. При этом каждый сегмент вирусной РНК транспортируется независимо; иРНК-транскрипты полиаденилированы на 3′-конце.

Трансляция вирусных белков происходит в цитоплазме, после чего они мигрируют в ядро, где накапливаются. Репликация дочерних РНК начинается почти одновременно с транскрипцией.

Вирионные РНК потомства не кэнированы и не полиаденилированы. На границе ядерной мембраны белки капсида и РНК потомства формируют нуклеокапсиды, которые мигрируют в цитоплазму для дальнейшего созревания. Гликопротеиды мигрируют к клеточной мембране и встраиваются в нее. Белок М выстилает клеточную мембрану с внутренней стороны. В этих модифицированных участках клеточной мембраны нуклеокапсиды окончательно созревают и выходят из клеток путем почкования.

В процессе морфогенеза вирусы гриппа могут образовывать цитоплазматические включения — скопления неструктурных вирусных белков.

В естественных условиях вирусы гриппа А инфицируют человека, других млекопитающих, птиц, вирусы гриппа В — только человека, вирусы гриппа С — человека и свиней. В экспериментальных условиях все вирусы гриппа репродуцируются в куриных эмбрионах, а вирусы гриппа А и В, кроме того — в первичных и перевиваемых культурах клеток почек обезьян, человека, крупного рогатого скота, свиней, цыплят.

Вирусы гриппа передаются аэрозольным или водным (для уток) путем. Тоготовирусы распространяются также клещами и способны к репродукции как в клещах, так и в различных органах, тканях и культурах клеток млекопитающих.

Согласно международной таксономии вирусов, семейство Ortomyxoviridae включает четыре рода: Ifluenzavirus A, Ifluenzavirus B, Ifluenzavirus C и Togotovirus.

Род Influenzavirus A. Включает один вид — вирус гриппа А (прототипный). Внутри этого вида различают субтипы вируса гриппа А, которые сохраняют общие наследственные признаки и способны к реассортации между собой. Поэтому, несмотря на то, что среди вирусов гриппа А, инфицирующих птиц, идентифицировано 15 субтипов по гемагглютинину и 9 субтипов по нейраминидазе, их определение в отдельные виды не соответствует требованиям межвидового подразделения. Внутри субтипов могут быть сероварианты, которые определяют антигенные дрейфы (происходящие от вариабельности субтипов, циркулировавших ранее). Номенклатура вновь выделенных изолятов гриппа А складывается из следующих критериев: род/хозяин/место выделения/обозначение штамма/год выделения (формула гемагглютинина Н и нейраминидазы N), например, А/крачка/Южная Африка/1/61/(H5N3).

Постоянный эволюционный процесс циркулирующих штаммов приводит к появлению новых и, вероятно, исчезновению старых штаммов.

Антитела к гемагглютинину гриппа А обладают нейтрализующей активностью. Антитела к нейраминидазе, присутствующие на протяжении многих циклов репродукции, ингибируют выход вируса и снижают его накопление.

В разные годы вирусы гриппа А выделяли от людей, лошадей, свиней, норок, тюленей, птиц (кур, индеек, уток). Клиника варьирует от легкой и средней тяжести течения (часто с вовлечением в процесс пищеварительного тракта) до тяжелопротекающей формы с высокой смертностью. Возможна межвидовая передача вируса от свиней людям и наоборот, а также от птиц — людям.

Род Influenzavirus B. Включает один вид — вирус гриппа В. У него в отличие от вируса гриппа А не установлены антигенные субтипы. Однако было показано, что штаммы гриппа В, которые циркулировали среди людей десятилетия, различались по гемагглютинину и нейраминидазе. Вирусы гриппа В обозначаются по следующим критериям: род/место выделения/обозначение штамма/год выделения. Антитела к гемагглютинину вируса гриппа В обладают нейтрализующей активностью. Вирусы гриппа В непрерывно циркулируют среди людей (в основном 18—25-летнего возраста), вызывая эпидемии каждые 3—5 лет. Антигенные дрейфы (вариации) случаются реже, чем у вирусов гриппа А.

Род Influenzavirus C. Включает один вид — вирус гриппа С. Данный вид инфицирует только людей. Антигенных дрейфов у вируса гриппа С не отмечалось. Перекрестной антигенной активности между вирусами гриппа С и вирусами гриппа А и В не установлено. Антитела к гемагглютинину HEF (белок слияния) обладают антигемагглютинирующей и вируснейтрализующей активностью. Вирусы гриппа С вызывают инфекцию у детей по типу отдельных вспышек (не эпидемий).

Род Togotovirus. Включает 2 вида, из которых вирус Togoto — прототипный. Тоготовирусы передаются между позвоночными через клещей. Антигенного родства между тоготовирусами и вирусами гриппа нет. Но существует сходство по морфологии вирионов и морфогенезу. В отличие от вирусов гриппа они не вызывают респираторных поражений и не репродуцируются в куриных эмбрионах.

2.9.1. ВИРУС ГРИППА

Грипп птиц (классическая чума птиц, экссудативный тиф, браун-швегейская болезнь кур и др.) — острая контагиозная вирусная болезнь, характеризующаяся общим угнетением, отеками, поражением органов дыхания и пищеварения. Болезнь регистрируется в различных странах мира. В форме классической чумы птиц встречается редко. Чаще проявляется эпизоотическими вспышками в респираторной форме или с преимущественным поражением желудочно-кишечного тракта.

Вирусы гриппа птиц выделены от кур, индюков, уток, перепелок, фазанов, глухарей, попугаев, цесарок и птиц других видов.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Orthomyxoviridae, роду Influenzavirus A. Вирионы плеоморфной

(различной), чаще округлой формы, диаметром 80—120 нм. Состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеидной оболочки, которая образует выступы. Геном представлен односпиральной линейной молекулой минус-РНК, состоящей из восьми фрагментов.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. При низких температурах и в лиофилизированном состоянии вирус сохраняется до двух лет. При температуре 55 °С инактивируется за 1 ч, при 60 °С — за 10 мин, при 65—75 °С — за 2—5 мин. Вирус утрачивает инфекционную активность под воздействием формальдегида, едких щелочей, слабых кислот, хлорсодержащих соединений.

Антигенная структура и активность. Вирионы вируса гриппа кур содержат внутренние антигены — NP, белки М, P1, P2, P3 и наружные антигены — гемагглютинин (Н) и нейраминидазу (N). Внутренние антигены индуцируют образование комплементсвязывающих и преципитирующих антител. Наружные антигены обладают гемагглютинирующей активностью и индуцируют нейтрализующие антитела, которые отвечают за напряженность противовирусного иммунитета.

Антигенная вариабельность и родство. Идентифицированы 15 субтипов гемагглютиниа и 9 субтипов нейроминидазы с минимальной перекрестной активностью (между субтипами) в серологических реакциях. Внутри субтипа также могут быть вариации.

Антигенное родство изолятов устанавливают в РТГА (для определения сходства по гемагглютинину), в РТНА (для определения сходства по нейроминидазе), в РИД (для определения сходства по гемагглютинину и нейроминидазе).

Культивирование вируса. Все штаммы вируса гриппа птиц в лабораторных условиях размножаются в куриных эмбрионах при заражении в аллантоисную или амниотическую полость. Некоторые штаммы после адаптации размножаются в культурах клеток фибробластов куриного эмбриона, почки обезьян, легких эмбриона человека и других первичных культурах клеток (WI-38, миелобластоза цыплят). Некоторые штаммы образуют бляшки в первичной культуре клеток куриных фибробластов.

Гемагглютинирующие и гемадсорбирующие свойства. Все вирусы гриппа птиц агглютинируют эритроциты кур, морских свинок, кроликов, лошадей, овец и других животных. В отличие от вируса ньюкаслской болезни штаммы вируса гриппа птиц агглютинируют эритроциты лошади и овцы, что используется для дифференциации выделенных на эмбрионах штаммов вируса гриппа птиц от болезни Ньюкасла.

Гемадсорбирующие свойства проявляются с эритроцитами кур при культивировании вируса в культуре фибробластов куриных эмбрионов.

Экспериментальная инфекция. Она воспроизводится на курах и цыплятах при любом способе заражения субтипами вируса гриппа

А (H7N1 и H5N3). Белые мыши заболевают при интраназальном и интрацеребральном заражениях. Экспериментальное заражение вирусами протекает бессимптомно. Экспериментальная инфекция у естественно-восприимчивой птицы зависит от вирулентности вируса, степени адаптации к биологической системе и сопутствующих инфекций.

Клинические признаки. Различные по вирулентности штаммы вируса вызывают разные формы клинического течения болезни. Для классической чумы птиц характерны депрессия, потеря чувствительности, синюшность слизистых и кожных покровов, отек подкожной клетчатки. Летальность может достигать 80 % и выше. При респираторной форме наблюдают сонливость, чихание, хрипы, одышку, выделения из носа и глаз, взъерошенность, отставание в развитии, снижение яйценоскости у взрослой птицы. Летальность в зависимости от вирулентности штамма, восприимчивости птицы, условий содержания может варьировать от 1 до 80 %. При желудочно-кишечной форме болезни основной клинический признак на фоне угнетения, отказа от корма и снижения яйценоскости — диарея. Гибель не превышает 5 %.

Встречается и бессимптомное течение (особенно среди домашних уток).

Патологоанатомические изменения. При вскрытии у птицы в зависимости от форм течения болезни могут наблюдаться кровоизлияния в паренхиматозных органах, скелетных мышцах, пищеварительном тракте, очаги некроза во внутренних органах и ЦНС (цв. вкл., рис. 52). Штаммы, обладающие пневмотропным действием, вызывают катаральные воспаления в носовых ходах, синусах, трахеи, легких. В некоторых случаях обнаруживают катарально-геморрагические энтериты, нефриты.

Локализация вируса. Входными воротами для вируса служат в основном верхние дыхательные пути, где вирус проходит первичную репродукцию. Накапливаясь, проникает в кровеносную и лимфоидную системы, откуда вторично попадает в эпителиальные клетки дыхательных путей, паренхиматозные органы, головной мозг, кишечник, эндотелий сосудов (вторичная репродукция).

Источник инфекции — больная птица, которая передает вирус воздушно-капельным путем, а также алиментарным при инфицировании воды и корма фекалиями. Распространять вирус на большие расстояния могут дикие перелетные птицы (лебеди, утки, чайки и др.). В естественных условиях спектр патогенности не однороден и зависит от субтипа. Так, субтип H7N1 вызывает классическую чуму птиц чаще среди семейства куриных, и к нему менее восприимчивы водоплавающие птицы. Дикие утки являются не только переносчиками, но и резервуарами инфекции, вызывая сезонные заболевания среди болотных птиц. Штаммы вируса гриппа индейки патогенны для индеек и кур. Штаммы вируса гриппа кур патогенны для кур и перепелов.

Проблема межвидовой передачи между вирусами гриппа птиц, свиней и человека еще окончательно не разрешена. Дикие водоплавающие птицы являются резервуарами различных субтипов вируса. И в тех популяциях, где они находятся в тесном контакте с людьми, свиньями, могут образовываться за счет генной рекомбинации новые более патогенные штаммы вируса гриппа. Вирус гриппа с формулой H2N2 не выделяется от человека с 1968 г., но изолируется от птиц и в случае реверсии может стать эпидемическим.

Диагностика. Поставить диагноз на грипп птиц можно на основании эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатов лабораторных исследований, имеющих решающее значение.

Взятие и подготовка материала. В лабораторию отправляют патологический материал от больной птицы, взятый в первые 2—3 дня болезни при выраженной клинической картине, или от павшей птицы, или убитой с диагностической целью в острой стадии заболевания.

От больной птицы берут мазки из трахеи и клоаки стерильным ватно-марлевым или поролоновым тампоном, который помещают во флакон с 2 мл физиологического раствора (pH 7,0—7,2) или раствора Хенкса с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин по 500—1000 ЕД/мл) и доставляют в термосе со льдом. Для ретроспективной серодиагностики в начале болезни и в период выздоровления от больной птицы берут кровь на парные сыворотки. При этом сгусток крови, который остается от первой пробы крови, также отправляют для исследования в качестве вируссодержащего материала.

От павшей или убитой птицы берут кусочки селезенки, головного мозга, трахеи, легких, воздухоносные мешки, синусы, участки кишечника или отправляют свежие трупы (не менее двух-трех).

Лабораторная диагностика. Включает индикацию и выделение вируса, его идентификацию, а также ретроспективную диагностику.

Индикацию вируса проводят экспресс-методами, к которым относятся методы цитоскопии и простого флюрохромирования.

При *цитоскопии* в мазках-отпечатках со слизистых дыхательных путей, окрашенных одним из методов (по Романовскому, Пигаревскому, Быковскому), в цитоплазме клеток обнаруживают тельца-включения фиолетового (окраска по Романовскому) или ярко-красного (окраска по Пигаревскому, Быковскому) цвета.

Метод простого флюрохромирования позволяет обнаруживать в мазках-отпечатках, содержащих вирус гриппа (с применением раствора акридинового оранжевого 1 : 10 000), в люминесцентном микроскопе четко очерченные гранулы красного или оранжевого цвета, расположенные в цитоплазме клеток.

Выделение вируса проводят путем заражения куриных эмбрионов, культуры клеток, а также ставят биопробу на цыплятах.

Заражают 9—10-дневные *куриные эмбрионы* (не менее пяти на одну пробу), которым инокулируют исследуемую суспензию в амниотическую или аллантоисную полость общепринятым методом. Инкубируют яйца в течение 72 ч. Экстраэмбриональную жидкость каждого эмбриона на обнаружение вирусного гемагглютинина исследуют раздельно в капельной РГА с 1%-ной взвесью эритроцитов кур. При отрицательной РГА проводят еще 3—5 слепых пассажей, используя для заражения КЭ эмбриональную жидкость предыдущего пассажа. Проба считается отрицательной, если в 3—5 слепых пассажах не будет положительной РГА и патогенного действия вируса (гибель КЭ).

Культуру клеток заражают реже, чем КЭ. Для этого используют первичную культуру клеток куриных фибробластов. ЦПД обычно обнаруживают через 24—48 ч, хотя наибольший инфекционный титр вируса (10^5—10^7 $ЭИД_{50}$/мл) наблюдается после 2—5 пассажей. Культуральную вируссодержащую жидкость исследуют в РГА и РГАд.

Биопробу на цыплятах проводят, если первые два метода выделения вируса требуют подтверждения. Инокулируют испытуемую суспензию 2—3-месячным цыплятам любым способом (подкожно, внутримышечно, на конъюнктиву и т. д.). Гибель наступает в зависимости от вирулентности и дозы вируса через 36—72 ч.

Идентификация вируса. *РТГА* — наиболее простой и высокодостоверный метод идентификации вируса. Реакцию проводят с диагностическим набором, содержащим 15 эталонных штаммспецифических сывороток. Для дифференциальной диагностики с болезнью Ньюкасла параллельно ставят реакцию с эталонной специфической сывороткой против болезни Ньюкасла.

РТГА ставят микро- или макрометодом по общепринятой методике. Сыворотки, используемые в реакции, освобождают от термолабильных ингибиторов, прогревая при 60 °С в течение 30 мин, и от термостабильных ингибиторов, пропуская через специфическую сыворотку, CO_2 или добавляя кусочки сухого льда. РТГА считают положительной, если сыворотка полностью тормозит гемагглютинирующую активность выделенного вируса.

РТГАд ставят по общепринятой методике в культуре клеток куриных фибробластов. Используют набор эталонных штаммспецифических сывороток (предварительно освобожденных от ингибиторов) и эритроциты кур. Исследуемый вирус считается идентифицированным в РТГАд, если эталонная сыворотка блокирует гемадсорбцию.

РСК используют для определения родоспецифичности выделенного вируса, когда в РТГА не удается установить родственных связей между выделенным (эпизоотическим) и эталонным штам-

мами вируса гриппа по специфическим сывороткам к ним. В этом случае РСК ставят с эталонными специфическими сыворотками против вирусов гриппа родов А, В, С и устанавливают родовую принадлежность штамма.

РН применяют при некоторых неясных и спорных случаях, поэтому в диагностике используются редко.

РИФ относится к экспресс-методам диагностики. Используют прямой и непрямой варианты, для которых мазки-отпечатки готовят ex temporе от убитой больной или свежепавшей птицы и далее применяют соответственный вариант реакции по общепринятой методике.

К наиболее современным методам идентификации вируса гриппа птиц относится ИФА на основе моноклональных антител к гемагглютинину и внутренним вирусным белкам NP и М, а также ПЦР с двумя типами праймеров на основе неструктурного белка и гемагглютинина.

Ретроспективная диагностика. Основывается на обнаружении антигемагглютинирующих и комплементсвязывающих антител в парных сыворотках. Для этой цели используют серологические реакции.

РТГА. Парные сыворотки исследуют одновременно. Первую пробу хранят при 4 °С или в замороженном виде. Перед реакцией сыворотки освобождают от термолабильных и термостабильных ингибиторов. Реакцию проводят с диагностическим набором, содержащим 15 эталонных штаммов вируса.

Реакцию считают положительной, если титр антител во второй пробе не менее чем в 4 раза превышает титр антител к тому же субтипу вируса в первой пробе.

РСК ставят или с нативной вируссодержащей аллантоисной жидкостью, которую предварительно осветляют центрифугированием, или с диагностическим набором, содержащим эталонные вирусные антигены. Используют как классическую методику, так и микрометод в модификации В. В. Ритовой.

РРГ (реакцию радиального гемолиза) широко используют в настоящее время для иммунологического мониторинга в целях изучения иммунного фона и оценки поствакцинального иммунитета. При использовании эталонных вирусных антигенов удается получить четкие зоны радиального гемолиза с гомологичными антителами в исследуемых сыворотках.

ИФА проводят по твердофазному варианту, и в качестве антигена для сенсибилизации лунок диагностических планшет используют внутренний белок (NP) вируса гриппа А. Титры антител в ИФА в 5 и более раз выше, чем в РСК.

Дифференциальная диагностика. Грипп следует дифференцировать от ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита и ларинготрахеита, а также гемофилеза и миксоплазмоза.

Иммунитет и специфическая профилактика. Основная трудность профилактики гриппа заключается в изменчивости наруж-

ных белков вирусов, что приводит к ежегодному появлению новых циркулирующих эпизоотических штаммов, отличных от вакцинных. Поэтому ранняя, своевременная и эффективная диагностика новых штаммов — актуальная задача ветеринарии. Для этого используется радиоиммунный анализ (РИА).

Для профилактики гриппа птиц, вызываемого вирусом H7N1 (классическая чума птиц), применяют отечественные живые вакцины из аттенуированных штаммов Ру и Р5; для профилактики болезни, вызываемой подтипами H1—H8, отечественные биофабрики выпускают инактивированную β-пропиолактоновую гидроокисьалюминиевую вакцину. За рубежом применяют живую нейраминидазо-N-специфическую вакцину (Англия), масляно-эмульсионную вакцину для цыплят-броллеров и кур-несушек (США). Разработан метод получения рекомбинантного вируса гриппа птиц, экспрессирующего вирусные белки, что может использоваться в качестве живой вакцины для домашней птицы.

2.10. СЕМЕЙСТВО ПАРАМИКСОВИРУСОВ

Семейство Paramyxoviridae (от греч. para — около и myxa — слизь) — группа вирусов, поражающая позвоночных, как правило, млекопитающих и птиц.

Вирионы по размеру и форме неоднородны, однако многие из них имеют округлую или нитевидную форму, диаметр 150 нм и более. Вирионы состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеидной оболочки, на поверхности которой имеются выступы (отростки) длиной 8—12 нм. Геном вируса представлен единой односпиральной линейной минус-РНК с молекулярной массой 5—7 МД, не обладающей инфекционной активностью и составляющей 0,5—1,0 % массы вириона.

В вирионах содержится 70 % белка, 20—25 % липидов и 6 % углеводов. Липиды образуют двойной центральный слой вирусной мембраны и являются ее структурным каркасом. Белки расположены снаружи и изнутри двойного липидного слоя. Гликолипиды составляют наружный белковый слой, образованный двумя гликопротеидами — HN (гемагглютинин и нейраминидаза) и F (белок слияния), а негликолизированный мембранный белок образует внутренний слой, который называют матриксом вириона (М-белок). Липопротеидная мембрана вирионов представляет собой измененную часть клеточной поверхности, в которой белки клетки хозяина заменены на вирусспецифические.

Молекулярная масса вирионов — 500—700 МД, плавучая плотность в CsCl 1,20—1,24 г/см^3, коэффициент седиментации 1000S.

В вирионах парамиксовирусов содержится шесть полипептидов, из которых три — белки нуклеокапсида (NP, P, L) и три — белки в составе липопротеидной оболочки (HN, F, M).

Белок HN ответственен за гемагглютинирующую и нейраминидазную активности вируса и его адсорбцию на клеточной поверхности. Белок F ответственен за слияние клеток, гемолитическую активность вируса и принимает участие при проникновении вируса в клетку. Белок M участвует в заключительной стадии морфогенеза вируса в зараженной клетке и стабилизирует вирусную частицу. В составе нуклеокапсида вирусов находится фермент РНК-полимераза (транскриптаза).

Изучение белков наружной оболочки вирионов у разных штаммов вируса болезни Ньюкасла показало наличие связи между структурой гликопротеидов и патогенностью вируса. У патогенных штаммов оба поверхностных гликопротеида (HN и F) включаются в вирионы только в расщепленной форме, тогда как у апатогенных штаммов — в виде предшественников F_0 и HN_0. Вирусы с нерасщепленными гликопротеидами обладают очень низкой биологической активностью.

Парамиксовирусы размножаются в цитоплазме, проникают в клетки в основном путем сплавления оболочки вириона с клеточной мембраной, иногда путем виропексиса. В процессе сплавления оболочки вируса с плазматической мембраной внутрь клетки проникает нуклеокапсид.

Транскрипция геномной минус-РНК осуществляется в составе нуклеокапсида вирусной транскриптазой. При первичной транскрипции синтез иРНК происходит на матрице геномной РНК, тогда как при вторичной транскрипции иРНК образуется на матрице вновь синтезированной вирионной минус-РНК. Информационные РНК обеспечивают на рибосомах синтез всех вирусспецифических белков. Репликация геномной РНК включает два этапа: 1) синтез плюс-нити РНК, комплементарной геномной РНК; 2) образование дочерних геномных минус-РНК на комплементарной плюс-нити РНК. Затем из минус-нити РНК и белка формируются нуклеокапсиды, в это же время происходит включение в определенные участки клеточной мембраны вирусных гликопротеидов. Проходя через модифицированные участки клеточной мембраны, нуклеокапсиды одеваются наружной оболочкой и выходят из клетки методом почкования. Главная роль в процессе почкования принадлежит белку M, который «узнает» гликопротеиды на поверхности плазматической мембраны и фиксирует их в определенном участке мембраны.

Одна из особенностей парамиксовирусов — образование телец-включений и синцития с образованием многоядерных гигантских клеток. Инфекция клеток в культуре обычно литическая, но может быть и персистентная, важную роль в установлении которой, возможно, играют ДИЧ (дефектные интерферирующие частицы). Распространение вируса происходит горизонтально, чаще аэрозольно.

В семействе Paramyxoviridae выделено два подсемейства: Paramyxovirinae и Pneumovirinae.

Подсемейство Paramyxovirinae. Включает три рода: Respirovirus, Rubulavirus и Morbillivirus.

Род Respirovirus. Включает вирус парагриппа 3 крупного рогатого скота, вирусы парагриппа человека 1 и 3, вирус обезьян 10 и вирус Сендай (прототипный вирус). Вирусы данного рода имеют гемагглютинин и нейраминидазу.

Род Rubulavirus. Включает парамиксовирусы птиц (9 типов), в том числе вирус болезни Ньюкасла (парагрипп 1 птиц), несколько типов вирусов парагриппа человека, рубулавирус свиней, вирус обезьян (5 и 41) и вирус эпидемического паротита (свинка) — прототипный вирус. Вирусы данного рода проявляют гемагглютинирующую и нейраминидазную активности.

Род Morbillivirus (от лат. morbillus — корь). Включает вирусы чумы собак, крупного рогатого скота, мелких жвачных, тюленей; морбилливирус китовых и вирус кори — прототипный вирус.

Подсемейство Pneumovirinae. Включает два рода: Pneumovirus и Metapneumovirus.

Род Pneumovirus. Включает респираторно-синцитиальные вирусы крупного рогатого скота и человека — прототипный вирус и вирус пневмонии мышей.

Род Metapneumovirus. Включает один вид — вирус ринотрахеита индеек — прототипный вирус.

2.10.1. ВИРУС ПАРАГРИППА-3 КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Парагрипп-3 (ПГ-3) крупного рогатого скота (транспортная лихорадка) — острая контагиозная болезнь главным образом телят, характеризующаяся лихорадкой и поражением органов дыхания. Впервые вирусная природа болезни установлена в США в 1959 г. В СССР это заболевание было обнаружено в 1968 г. Болезнь зарегистрирована во всех странах мира, в том числе в России.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Paramyxoviridae, подсемейству Paramyxovirinae, роду Respirovirus. Вирионы вируса плеоморфные, но чаще сферической или нитевидной формы, диаметр 150 нм и более. Состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеидной оболочки, на поверхности которой имеются характерные выступы. Геном представлен единой односпиральной линейной молекулой минус-РНК.

В естественных условиях вирус ПГ-3 вызывает заболевание у крупного рогатого скота, поражая до 90—100 % животных. Болеют телята не старше одного года. Имеются сообщения о выделении вируса от буйволов, овец, лошадей. Антитела к вирусу ПГ-3 обнаружены у 60—100 % клинически здоровых телят, овец, коз, верблюдов, собак, крыс. Отмечено, что у буйволов и ягнят вирус ПГ-3

может быть причиной поражения органов дыхания и желудочно-кишечного тракта.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус чувствителен к многократному замораживанию и оттаиванию, быстро погибает под действием УФ-излучения; воздействие жирорастворителями (эфир, хлороформ) ведет к полной потере инфекционной активности. Низкие значения pH губительно действуют на вирус, он хорошо сохраняется при pH 6,8—7,5. Прогревание при 50 °С в течение 80 мин ведет к его полной инактивации. Обработка 0,4%-ным раствором формалина и 1%-ным раствором β-пропиолактона уничтожает инфекционность вируса. Воздействие 0,4%-ным этиленимином в течение 20 ч не действует на гемагглютинирующую активность, но уничтожает инфекционность вируса. Вирус хорошо переносит лиофилизацию.

Антигенная структура. В вирионах обнаружено шесть полипептидов (L, P, NP, M, HN, F), три из которых (L, P, NP) связаны с нуклеокапсидом и три (M, HN, F) входят в состав липопротеидной оболочки; два из них (HN, F) являются гликопротеинами, которые образуют выступы наружной оболочки. Они ответственны за гемагглютинирующую, нейраминидазную активность, адсорбцию вирионов на клеточной поверхности и за слияние клеток.

Антигенная вариабельность. В антигенном отношении все штаммы вирусов ПГ-3, выделенные в различных странах, идентичны и соответствуют прототипному штамму SF-4, выделенному в США. Установлены некоторые различия в гемагглютинирующей, нейраминидазной и синцитийобразующей активности. Установлено сходство (но не идентичность) между штаммами вируса ПГ-3 крупного рогатого скота и овец. Близкое антигенное родство вируса ПГ-3 крупного рогатого скота имеет с вирусом парагриппа человека третьего серотипа.

Антигенная активность. Вирус ПГ-3 обладает выраженной антигенной активностью. Как при естественной, так и при искусственной иммунизации появляются специфические антитела, которые обнаруживаются в РТГА, РН, РСК и РДП. Первыми выявляют антигемагглютинины (на 6—7-й день), которые обнаруживаются на значительном уровне (1 : 64—1 : 256) в течение 6 мес.

Культивирование вируса. Для размножения вируса ПГ-3 можно успешно применять первичные культуры клеток почек эмбриона крупного рогатого скота (ПЭК), почек, легких телят (ПТ, ЛТ) и тестикул бычков (ТБ). Кроме того, вирус ПГ-3 размножается и в перевиваемых линиях клеток: Таурус 1, МДВК, ПС (почки сайги), ПЛЭК, ВНК-21 и др. Все штаммы вируса вызывают сходное цитопатическое действие, характеризующееся образованием синцития и вакуолей. Сроки проявления гемадсорбции и ЦПД зависят не от штамма, а от вида культуры клеток. Вирус ПГ-3 размножается также в развивающихся куриных эмбрионах, однако зараженные эмбрионы не погибают.

Гемагглютинирующие свойства. Вирус хорошо агглютинирует эритроциты морской свинки и с меньшей активностью — эритроциты кролика, свиньи, коровы, обезьяны, мыши, буйвола, голубя, овцы, козы; не агглютинирует эритроциты лошади. Данные об агглютинации эритроцитов кур противоречивы. Свежевыделенные штаммы вируса лучше агглютинируют эритроциты при 4 °С, чем при 37 °С. Гемагглютинирующая активность вируса повышается значительно после обработки эфиром и твином.

Гемадсорбирующие свойства. Клетки, инфицированные вирусом ПГ-3, приобретают свойство адсорбировать на своей поверхности эритроциты морской свинки и слабее — эритроциты других видов животных. Вирус вызывает диффузную адсорбцию эритроцитов. Важно отметить, что гемадсорбция проявляется раньше, чем цитопатическое действие в инфицированных клетках.

Экспериментальную инфекцию можно воспроизвести на телятах при отсутствии у них специфических антител. Лабораторные животные к вирусу невосприимчивы. Некоторым исследователям удалось вызвать экспериментальную инфекцию у ягнят, поросят и мышей-сосунов.

Клинические признаки. Инкубационный период болезни длится 1—2 дня. Клиническая болезнь проявляется по-разному: от легких ринитов и бронхитов до тяжелой бронхопневмонии. Течение болезни обусловлено многими предрасполагающими стрессовыми факторами (нарушения кормления и содержания, транспортировка, скученность и т. д.), иммунным и физиологическим состоянием животных; способом заражения; дозой и вирулентностью вируса. Раньше ПР-3 называли «транспортной лихорадкой».

У животных отмечают повышение температуры тела до 41—42 °С в течение 1—2 нед, угнетение, одышку, серозно-слизистые истечения из носа, глаз, иногда развивается диарея, отказ от корма. Если нет осложнений секундарной бактериальной микрофлорой, то через 2—3 нед животные выздоравливают. При тяжелом течении болезни наблюдают сильный кашель, интенсивные выделения из носа, глаз, ротовой полости, появление эрозий на слизистой оболочке рта. У телят при подостром и хроническом течениях отмечают слизисто-гнойные выделения из носа и глаз, признаки плеврита, пневмонии, иногда энтерита. У взрослых животных инфекция, как правило, не сопровождается симптомами респираторного заболевания, однако у стельных коров она может привести к внутриутробному заражению плода, абортам или рождению нежизнеспособных телят.

На исход болезни влияют многие осложняющие стрессовые факторы, вирулентность циркулирующего штамма вируса, одновременное инфицирование животных другими вирусами (аденовирусы, вирусы инфекционного ринотрахеита, диареи и др.), хламидиями и пастереллами.

Патологоанатомические изменения. В основном находят в органах дыхания: катаральное воспаление слизистой носа, гиперемия слизистой и слизисто-гнойный экссудат в трахее, бронхах, уплотненные очаги в легких, признаки эмфиземы. Заглоточные и бронхиальные лимфатические узлы отечные, с кровоизлияниями. На плевре, брюшине, эпикарде — точечные кровоизлияния. На слизистой сычуга — кровоизлияния, эрозии и язвы. Слизистая кишечника отекшая, с кровоизлияниями.

Локализация вируса. Вирус ПГ-3 быстро размножается в клетках респираторного тракта и других органов. Через 1—10 дней после заражения его можно выделить из экскретов респираторного тракта, гортани, трахеи, легких, регионарных лимфатических узлов, селезенки, печени, надпочечников. Изолируют также из тестикул телят и быков и довольно часто из спермы быков-производителей.

Источник инфекции — больные животные. Заражение происходит воздушно-капельным путем и, возможно, перорально с молоком больных коров. Не исключается возможность передачи возбудителя половым путем, так как его обнаруживают в сперме, вагинальных выделениях, тканях абортированных плодов.

Диагностика. Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, симптомов болезни, патологоанатомических изменений и лабораторных исследований.

ПГ-3 диагностируют с использованием набора диагностикумов, выпускаемых биологической промышленностью. Ее обычно проводят параллельно с исследованием материала на аденовирусную, респираторно-синцитиальную инфекции, инфекционный ринотрахеит и вирусную диарею крупного рогатого скота.

Предварительный диагноз на ПГ-3 ставят в течение 2—3 дней на основании положительных результатов обнаружения вирусного антигена в патологическом материале в РИФ с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков и патологоанатомических изменений. Окончательно болезнь диагностируют в течение 10—30 дней на основании совпадения результатов РИФ с выделением и идентификацией вируса, обнаружения 4-кратного и более прироста антител в парных пробах сывороток крови.

Взятие и подготовка материала. Такие же, как при аденовирусной инфекции (см. с. 181).

Лабораторная диагностика. Обнаружение вирусного антигена в патологическом материале (мазках-отпечатках) проводят с помощью РИФ; вирусную нуклеиновую кислоту определяют с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Изоляцию вируса из патологического материала проводят в первичной культуре клеток ПЭК, ЛЭК, ПТ, ТБ или в перевиваемых линиях клеток Таурус 1, ПЛЭК и др. Вирус считают выделенным, если он вызывает стабильное однотипное ЦПД и положительную (РГАд) с эритроцитами морской свинки.

Вирус ПГ-3 можно выделять и на куриных эмбрионах, которые лучше заражать в амниотическую полость. Выделение вируса на естественно-восприимчивых животных не проводят вследствие дороговизны и большой трудности в подборе телят, не имеющих специфических антител. Лабораторные животные нечувствительны к вирусу ПГ-3.

Идентификацию выделенного вируса проводят в серологических реакциях: РТГАд, РИФ, РТГА, РН, ИФА. Наиболее быстрый метод идентификации выделенного вируса, обладающего гемадсорбирующими свойствами, — РТГАд с эритроцитами морской свинки.

Ретроспективная диагностика. Для этой цели исследуют парные сыворотки крови, взятые не менее чем от 10—15 животных с интервалом 2—3 нед. Сыворотки исследуют в серологических реакциях: РТГА (чаще), ИФА, РН. Предложена очень чувствительная и простая реакция непрямой гемагглютинации (РНГА). Кроме исследования парных сывороток крови при серодиагностике ПГ-3 рекомендуется метод выявления секреторных антител в РТГА. Для этого берут пробы носовых секретов от 10—15 животных, проявивших клинические признаки болезни, и повторно — через 6—8 дней.

Положительным результатом исследования на ПГ-3 считают в случае выявления антител во второй пробе носовых секретов в титре 1 : 16 и выше (при отсутствии антител в первой пробе) или в случае установления 4-кратного и более увеличения титра антител во второй пробе по сравнению с первой.

Дифференциальная диагностика. Лабораторными исследованиями исключают ряд болезней, протекающих клинически сходно: аденовирусную, респираторно-синцитиальную инфекции, инфекционный ринотрахеит, вирусную диарею, хламидиоз, хотя эти инфекции очень часто протекают в различных ассоциациях.

Иммунитет и специфическая профилактика. Переболевшие животные в течение 3—4 мес невосприимчивы к повторному заражению. Важный фактор иммунитета — локальная невосприимчивость клеток слизистой оболочки респираторных органов, вызванная образованием секреторных антител и интерферона, чаще выявляемых в более высоком титре после интраназальной вакцинации живым вирусом, чем после подкожной вакцинации инактивированным вирусом. Гуморальные антитела после вакцинации сохраняются у животных в течение 6—12 мес. В защите против парагриппа-3 преобладают гуморальные факторы, но хорошо выражен также клеточный иммунитет. Телята, родившиеся от иммунных коров, получают антитела с молозивом. Продолжительность колострального иммунитета составляет 1,5—2 мес. Однако некоторые исследователи считают, что молозивные антитела предохраняют около 50 % телят месячного возраста. Вакцинация телят более эффективна в период угасания материнских антител, так как

колостральные антитела препятствуют активной продукции сывороточных антител в связи с блокированием вакцинного антигена, поэтому рекомендуют прививать телят интраназально.

Для специфической профилактики парагриппа-3 применяют в основном живые вакцины из аттенуированных штаммов вируса. Все чаще применяют живые комбинированные вакцины, содержащие аттенуированные штаммы вирусов ПГ-3, ИРТ, ВД и инактивированные пастереллы и хламидии.

2.10.2. ВИРУС РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Респираторно-синцитиальная инфекция (РС-инфекция) крупного рогатого скота — контагиозная, остро протекающая болезнь, характеризующаяся повышением температуры, преимущественным поражением органов дыхания. Регистрируется во многих странах мира, в том числе и в России.

В естественных условиях болеет крупный рогатый скот. Заболевание наиболее ярко проявляется у 1—3-месячных телят. РС-инфекция часто осложняется вторичной бактериальной инфекцией, особенно пастереллезом. Многие исследователи считают, что в этиологии массовых пневмоний молочных телят основная роль принадлежит РС-вирусу, который обнаруживали гораздо чаще, чем вирусы ринотрахеита, диареи и парагриппа-3. Отмечено, что особенно чувствителен к РС-вирусу чистокровный крупный рогатый скот герефордской породы. РС-вирус часто участвует в смешанных респираторных инфекциях с другими вирусами и бактериями.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Paramyxoviridae, подсемейству Pneumovirinae, роду Pneumovirus. Вирионы вируса состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеидной оболочки, содержащей липиды и полисахариды. Вирус имеет единую односпиральную линейную минус-РНК. По размеру и форме вирионы неоднородны, однако многие из них имеют округлую форму.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус очень нестоек в окружающей среде. Он высокочувствителен к эфиру, хлороформу, дезоксихолату, трипсину, низким значениям pH (pH 3,0) и к замораживанию. При 4 °С он сохраняет активность в течение 7 дней, при минус 70 °С — до 2 мес. Инактивация его наступает при 56 °С за 30 мин. В лиофилизированном виде вирус сохраняет активность до одного года.

Антигенная структура. Изучена недостаточно. Установлено, что вирус не содержит нейраминидазы. Показано, что гликопротеид и F-белок имеют решающее значение для формирования защитного иммунитета.

Антигенная вариабельность. Вирус в иммунологическом отношении однороден. Штаммы РС-вируса крупного рогатого скота родственны человеческим штаммам этого вируса.

Антигенная активность. Вирус вызывает образование вирусней-трализующих, комплементсвязывающих и преципитирующих антител. Отмечена линейная корреляция между титрами комплементсвязывающих и нейтрализующих антител. РС-инфекция может развиваться на фоне циркулирующих антител. Показано, что антитела играют защитную роль при наличии их в титрах не ниже 1 : 128 в сыворотке крови.

Культивирование вируса. РС-вирус культивируется в первичных культурах клеток почки, тестикул, легких и селезенки крупного рогатого скота. При первичном выделении из патологического материала его удается выделить на третьем-четвертом пассажах, в которых на 3—7-й дни проявляются выраженные цитопатические изменения: очаги зернистых сморщенных клеток, синцитии, в большинстве которых имеются ацидофильные цитоплазматические включения. Вирус также культивируется в перевиваемых линиях клеток, полученных из слизистой оболочки носа, легких, почек (Таурус-1) крупного рогатого скота и клеток Vero. Куриные эмбрионы к РС-вирусу нечувствительны.

Гемагглютинирующие свойства. У вируса они не установлены.

Экспериментальная инфекция. Ее можно вызвать при итраназальном и интратрахеальном заражении месячных телят, у которых на 5-й день появляются характерные признаки болезни. У зараженных животных с третьего дня РИФ выявляли вирусный антиген в эпителиальных клетках носовой полости, трахеи, бронхов, бронхиол и альвеолярных макрофагах. Кроме того, выделяли вирус из слизистых носа, бронхов и легких. Удавалось воспроизвести экспериментальную инфекцию на ягнятах, обезьянах, хорьках, норках и морских свинках.

Клинические признаки. Вспышки болезни чаще наблюдают в переходные осенне-зимние и зимне-весенние периоды с охватом большого поголовья животных.

Симптомы болезни обычно проявляются слабо и могут быть незамеченными. Проявление клинических признаков болезни зависит от многих предрасполагающих и осложняющих факторов: условий содержания и кормления животных, их физиологического состояния, вирулентности и дозы вируса, присутствия других инфекционных агентов и др.

Болезнь обычно сопровождается повышением температуры тела до 41 °С, затрудненным дыханием, кашлем, слюноотделением, серозными истечениями из носа и развитием бронхопневмонии разной тяжести. Отмечено, что РС-вирус может вызвать аборт. У молодняка болезнь обычно продолжается не более 3—5, а у взрослых животных — 8—10 дней. Прогноз болезни, как прави-

ло, благоприятный, если нет бактериальных осложнений и созданы оптимальные условия содержания животных.

Патологоанатомические изменения. При вскрытии вынужденно убитых животных обнаруживают признаки эмфиземы легких и пневмонии, увеличение бронхиальных лимфатических узлов. При гистологическом исследовании в эпителии альвеол и бронхиол выявляют многоядерные, гигантские клетки.

Локализация вируса. Изучена недостаточно. РС-вирус в течение первой недели после заражения выделяли из носовых и конъюнктивальных смывов. Нередко его изолируют от новорожденных телят. Возможно длительное вирусоносительство.

Из организма больных животных вирус выделяется с носовым экссудатом и выдыхаемым воздухом.

Источник инфекции — больные животные. Инфекция передается воздушно-капельным путем. Считают, что естественная внутриутробная инфекция поддерживает циркуляцию в стаде РС-вируса.

Диагностика. Диагноз на РС-инфекцию ставят на основании эпизоотологических, клинических патологоанатомических данных и лабораторных исследований.

Взятие и подготовка материала. Они идентичны таковым при аденовирусной инфекции. Следует отметить, что РС-вирус очень нестоек, поэтому лучшие результаты выделения вируса получают, проводя заражение культур клеток как можно быстрее после взятия материала и избегая его замораживания до исследования.

Лабораторная диагностика. Диагностику РС-инфекции проводят с использованием набора диагностикума, выпускаемого биопромышленностью. Ее проводят параллельно с исследованием материала на парагрипп-3, аденовирусную инфекцию, инфекционный ринотрахеит и вирусную диарею.

Индикация вируса. В патологическом материале ее проводят путем обнаружения вирусного антигена в мазках, отпечатках из органов или в клетках, полученных после центрифугирования смывов, в РИФ.

Изоляцию вируса патологического материала выполняют в первичной культуре клеток ТБ, ПЭК, ЛЭК или в перевиваемых культурах клеток Таурус 1, ПЛЭК и др. Проводят не менее трех пассажей.

Идентификацию выделенного вируса проводят в РН, РИФ, редко в РДП, РСК.

Обнаруживают антитела в сыворотке крови больных и переболевших животных (ретроспективная диагностика) в РНГА, ИФА, РН, РДП.

Дифференциальный диагноз. Следует исключить парагрипп-3, вирусную диарею, инфекционный ринотрахеит, аденовирусную инфекцию, хламидиоз, так как эпизоотологические, клинические и патологоанатомические данные очень сходны с РС-инфекцией.

Необходимо учитывать вероятность смешанного течения этих инфекций.

Иммунитет и специфическая профилактика. Иммунитет при РС-инфекции изучен недостаточно. У крупного рогатого скота, перенесшего болезнь, вырабатываются антитела, однако уровень гуморальных антител не может быть надежным критерием оценки напряженности иммунитета. Для РС-инфекции характерны повторные заболевания даже при наличии в крови антител, что свидетельствует о второстепенной роли сывороточных антител в иммунитете. Важное значение в иммунитете, вероятно, принадлежит секреторным антителам слизистой оболочки респираторного тракта и клеточным факторам.

Материнские антитела слабо предохраняют потомство от инфекции, но частота и тяжесть болезни обратно пропорциональны уровню специфических материнских антител.

В нашей стране вакцины против этой инфекции не разработаны. В зарубежных странах применяют живые вакцины.

2.10.3. ВИРУС ЧУМЫ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Чума крупного рогатого скота — острая заразная болезнь, характеризующаяся высокой лихорадкой, катарально-геморрагическим, крупозно-дифтеритическим воспалением слизистых оболочек. Регистрируется в ряде стран Африки и Азии. Наносит огромный экономический ущерб. В зонах первичного поражения летальность может достигать 100 %. В нашей стране данное заболевание было ликвидировано к 1928 г.

В естественных условиях к вирусу наиболее восприимчивы крупный рогатый скот, зебу, буйволы, менее — овцы, козы, яки, верблюды, антилопы, газели, жирафы. Дикие жвачные животные болеют в легкой форме и, оставаясь вирусоносителями, способствуют распространению болезни. В Индии наблюдали заболевание свиней, вызванное этим вирусом.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Paramyxoviridae, подсемейству Paramyxovirinae, роду Morbillivirus.

Вирионы вируса — частицы полиморфной (круглой, овальной и нитевидной) формы, состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеидной оболочки. Размер вирионов от 60 до 300 нм. Геном представлен единой линейной молекулой минус-РНК.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус малоустойчив во внешней среде к различным физико-химическим факторам. Чувствителен к эфиру и хлороформу. Ультрафиолетовые лучи и солнечный свет инактивируют его за 1—5 ч. При 60 °С он инактивируется за 15—20 мин, кипячение его убивает моментально. В условиях комнатной температуры вирус сохраняется 4—6 дней, при 0—4 °С — несколько недель, при минус 20 °С — 3—6 мес,

в лиофилизированном виде — несколько лет, в соленом мясе — более месяца. При гниении материала вирус разрушается за 20—30 ч. Дезинфицирующие вещества: щелочи, кислоты в 1—2%-ной концентрации инактивируют вирус в течение нескольких минут.

Антигенная структура. Изучена недостаточно. Выделено 7 основных вирусспецифических полипептидов с молекулярной массой от 37 000 до 98 000 Д. Инфекционная частица вируса содержит преципитирующий, комплементсвязывающий и гемагглютинирующий антигены.

Антигенная вариабельность. У вируса чумы вариабельность не установлена, все его штаммы иммунологически идентичны и несколько различаются по вирулентным свойствам. Между вирусами чумы крупного рогатого скота, кори, чумы собак и чумы мелкого рогатого скота существует антигенное и иммунологическое родство.

Антигенная активность. Вирус чумы крупного рогатого скота имеет выраженную антигенную активность и индуцирует синтез вируснейтрализующих, комплементсвязывающих, преципитирующих и подавляющих гемагглютинацию антител.

Культивирование вируса. Вирус культивируется в организме восприимчивых животных (лучше на телятах 6—12 мес) и в культурах клеток почки телят без предварительной адаптации. Цитопатические изменения в клетках характеризуются округлением и образованием гигантских многоядерных клеток, клеточных синцитиев, начиная с 5—6-го дня после заражения. В клетках обнаруживают цитоплазматические и внутриядерные включения. Вирус накапливается в титре $10^{5,5}$—$10^{6,0}$ $ТЦД_{50}$/мл.

Помимо первичных культур клеток удавалось культивировать вирус на перевиваемых линиях клеток (HeLa, Vero и др.). Вирус индуцирует образование интерферона в культуре клеток.

Гемагглютинирующие свойства. Гемагглютинирующий антиген выявляется только после специальной обработки. Концентрированный вирус с титром не ниже $10^{6,0}$ $ТЦД_{50}$/мл агглютинирует эритроциты обезьян, морских свинок, мышей, крыс, кроликов и человека.

Экспериментальная инфекция. В качестве восприимчивых животных лучше использовать молодых телят (6—12 мес). Заражать можно вируссодержащей кровью, слюной, истечением из носа и влагалища и другими выделениями от животных. К искусственному заражению восприимчивы овцы, козы, верблюды и олени. У зараженных кроликов временно повышается температура тела.

Клинические признаки. Инкубационный период длится 4—5, реже 9 дней и более. Симптомы болезни разнообразны и зависят от штамма вируса, вида животного, породы и иммунного статуса заболевших. Чаще наблюдается острое течение болезни, реже сверхострое и подострое. Острое течение сопровождается лихорадкой, поражением слизистых оболочек и гастроэнтеритом. Температура тела повышается до 41—42 °С, снижается удой, животное угнетено, аппетит отсутствует. Со второго дня болезни развивают-

ся воспаление и некроз слизистых оболочек, сначала появляются мелкие узелки, а затем на их месте образуются эрозии и язвы (цв. вкл., рис. 50). Изо рта выделяется зловонное слизистое истечение, из носа — слизисто-гнойное (рис. 58). Наблюдают конъюнктивиты и вульвовагиниты с эрозиями. Нарушения деятельности желудочно-кишечного тракта проявляются запором, затем профузным поносом с примесью крови на последней стадии (рис. 59). Животные быстро худеют. Дыхание затруднено, со стоном и болезненным кашлем. Большинство животных на 7—9-й день болезни погибают.



Рис. 58. Слизисто-гнойное истечение при чуме

В стационарно неблагополучных по чуме зонах наблюдают абортивное течение болезни, протекающей более доброкачественно (в результате остаточного иммунитета). У больных животных клинические признаки выражены слабо, в большинстве случаев без некротических поражений слизистых, отмечают временную диарею, часто животные выздоравливают. Погибает в основном молодняк. Летальность в таких зонах не выше 40 %.

Патологоанатомические изменения. Наблюдают изъязвления слизистых оболочек пищеварительного тракта. Просветы бронхов закупорены фибринозными массами, в легких — участки гепати-

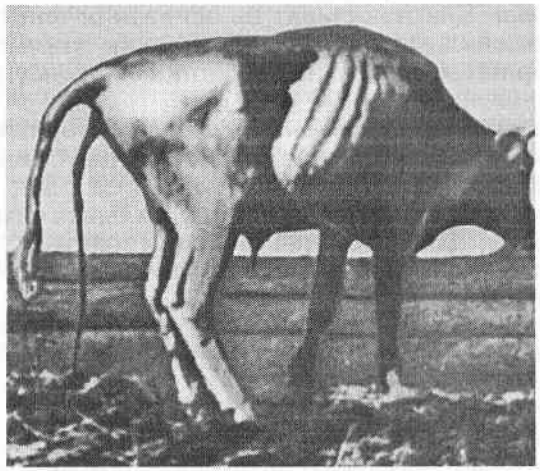


Рис. 59. Истощение и профузный понос у животного, больного чумой

зации, иногда эмфизема. Желчный пузырь переполнен тягучей желчью с ихоразным запахом. На слизистых оболочках сычуга желчного и мочевого пузыря, прямой кишки точечные или полосчатые кровоизлияния. Лимфатические узлы гиперемированы, сочны.

Локализация вируса. У больных животных вирусемия совпадает с периодом гипертермии. Иногда вирус обнаруживают в крови на протяжении всей болезни и даже за 12 ч до начала лихорадки. В крови вирус связан в основном с лейкоцитами и эритроцитами. Концентрация вируса в крови не превышает 10^2—10^4 $ТЦД_{50}$/мл.

Вирус можно обнаружить в носовых и слезных секретах. Вирус чумы — пантропный вирус. В органах и тканях он накапливается неодинаково, в более высоких титрах находится в лимфатических узлах ($10^{6,5}ИД_{50}$/мл), в слизистой сычуга($10^{5,5}$ $ИД_{50}$/мл), в легких и почках (10^3—10^4 $ИД_{50}$/мл).

Источник инфекции — больные и переболевшие животные. Вирус выделяется со слюной, истечениями из глаз и носа, фекалиями и мочой. Особую опасность представляют животные, болеющие чумой в легкой форме, которые длительное время выделяют вирус.

Имеются сообщения о распространении чумы сусликами. Механический перенос вируса возможен через одежду обслуживающего персонала, корм, воду, подстилку, предметы ухода, транспорт. Роль жалящих и кровососущих насекомых в переносе возбудителя чумы, вероятно, незначительна. В естественных условиях заражение чумой происходит через дыхательные пути, пищеварительный тракт и конъюнктиву.

Диагностика. Диагноз ставят на основании эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных, результатов лабораторных исследований и биопробы на восприимчивых животных.

Взятие и подготовка материала. Для лабораторных исследований от больных животных берут кровь и пунктат лимфатических узлов, кроме того, можно брать смывы с носа, глаз, рта, от трупов — кусочки предлопаточных, мезентериальных лимфатических узлов, селезенки. Для выделения вируса используют гепаринизированную кровь или «лаковую кровь» (гемализируют кровь дистиллированной водой).

Патологический материал берут в стерильную, плотно закрывающуюся посуду и доставляют в лабораторию с нарочным в опечатанном термосе с охлаждающейся смесью при строгом соблюдении мер предосторожности.

Лабораторная диагностика. Индикацию вируса проводят путем обнаружения вирусного антигена в патологическом материале; обычно применяют серологические реакции — РИФ,

ИФА, ВИЭОФ, РСК, РДП, РНГА; для обнаружения вирусной нуклеиновой кислоты — ПЦР; для обнаружения и выделения инфекционной активности вируса проводят заражение первичной культуры клеток почки теленка или эмбриона крупного рогатого скота. За культурой наблюдают 9—18 дней. На положительный результат указывает характерный цитопатический эффект (гигантские многоядерные клетки). В зараженных клетках выявляют тельца-включения (цитоплазматические и внутриядерные).

Провести индикацию и идентификацию вируса чумы крупного рогатого скота можно биопробой на иммунном и неиммунном скоте. Для этого двух молодых животных вакцинируют вакциной из штамма ЛТ; через 12 дней вакцинированных и двух невакцинированных животных заражают подкожно испытуемым материалом (кровь или 10—20%-ная суспензия селезенки и лимфатических узлов от больных животных). При наличии у невакцинированных характерных клинических признаков болезни и отсутствии таковых у иммунных животных биопроба считается положительной. У заболевших животных обнаруживают специфические антигены в серологических реакциях (РИФ, РСК, РДП, РНГА и др.).

Идентификацию вируса, выделенного в культуре клеток, проводят в РН, РИФ, РНГА и других серологических реакциях.

Ретроспективная диагностика. Для серологического исследования берут парные сыворотки крови не менее чем от 10 животных (в первые дни болезни и повторно через 14 дней). Сыворотки исследуют в серологических реакциях со стандартным антигеном в РН, РСК, ИФА, РТГА; в качестве антигена в этой реакции используют вирус кори.

Ретроспективную диагностику чумы проводят в очагах этой инфекции при атипичном ее течении. Четырехкратное увеличение титра антител свидетельствует о прошедшей инфекции.

Дифференциальная диагностика. Следует исключить злокачественную катаральную горячку, геморрагическую септицемию, ящур, вирусную диарею и некоторые кровепаразитарные болезни.

Иммунитет и специфическая профилактика. Переболевшие и вакцинированные животные приобретают стойкий иммунитет (после переболевания — практически пожизненный, после иммунизации живыми вакцинами — не менее чем на 3 года). Телята приобретают иммунитет через молозиво от коров вакцинированных или вследствие переболевания. Он сохраняется у них 6—8, иногда до 11 мес.

С целью специфической профилактики чумы с 1965 г. в нашей стране применяют живую сухую вирусвакцину из штамма ЛТ, которая сообщает иммунитет не менее чем на 3 года.

2.10.4. ВИРУС НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ

Ньюкаслская болезнь (НБ, псевдочума птиц) — высококонтагиозная вирусная инфекция главным образом куриных, характеризующаяся пневмонией, энцефалитом и поражением внутренних органов.

Зарегистрирована на всех континентах. Наносит огромный экономический ущерб. Относится к особо опасным инфекциям. Разносится зараженной птицей, с инфицированными предметами, распространяется на большие расстояния (до 15 км) по воздуху.

Характеристика возбудителя. Возбудитель ньюкаслской болезни — вирус семейства Paramyxoviridae. Вирион размером от 120 до 300 нм содержит односпиральную минус-РНК. Оболочка вирионов имеет выступы в форме нитей длиной 8 нм и содержит белки (гемагглютинин, нейраминидазу и фермент слияния). Внутренний компонент вириона — РНК с расположенными по спирали на ней капсомерами (белок S). Внутренняя поверхность оболочки представлена мембранным белком.

В составе вируса обнаружены 3 основных и 5 минорных белковых компонентов. К основным относятся гемагглютинин, белок внутренней оболочки и белок S. Нейраминидаза — один из минорных компонентов. Белок F_0 (слияния) играет основную роль в вирулентности вируса.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Инфекционность, гемагглютинирующая активность и иммуногенность вируса разрушаются при 56 °С в период до 6 ч. Гемагглютинирующие свойства сохраняются при более длительной инактивации, чем инфекционные. Установлено, что вирулентность штаммов прямо не связана с термостабильностью гемагглютининов. В замороженном состоянии вирус сохраняет активность более двух лет.

Инфекционность вируса снижается под воздействием дневного света. Вирус устойчив к изменениям pH в диапазоне от 2 до 10, быстро разрушается при воздействии ультразвука. Дезинфицирующие растворы быстро убивают вирус.

Антигенная структура. Вирус содержит гемагглютинин и нейраминидазу, белки M, F и S (РНП)-антигены, различающиеся по локализации в вирионе, иммуногенности и антигенной активности.

Антигенная вариабельность и родство. Подавляющее большинство полевых и вакцинных штаммов вируса НБ в антигенном и иммунобиологическом отношениях сходно. Некоторые природно-ослабленные штаммы широко используют в качестве живых вакцин. Инфекционность вируса более чувствительна к термальной инактивации, чем его гемагглютинирующая активность.

Полевые и вакцинные штаммы в антигенном и иммунологическом отношениях сходны. Природные штаммы различаются по тропизму к нервной, легочной и энтеральной тканям, что и обусловливает различные формы болезни. Вирулентность у штаммов разная: велогенные штаммы — высоко-, мезогенные — средне- и лентогенные — маловирулентны.

Антигенная активность. Все формы НБ вызываются идентичными в антигенном отношении штаммами и протекают с образованием вируснейтрализующих, антигемагглютинирующих и комплементсвязывающих антител. Наивысший титр антител наблюдают через 3—4 нед, через 8—12 мес их не отмечают.

Геммагглютинирующие и гемадсорбирующие свойства. Вирус ньюкаслской болезни обладает гемагглютинирующими (с эритроцитами кур, морских свинок, мышей, человека), гемадсорбирующими и гемолитическими свойствами, а также высокой интерфероногенной активностью.

Культивирование. Вирус НБ хорошо культивируется не только на восприимчивой птице, но и на куриных эмбрионах, изолированных ХАО, в культуре фибробластов КЭ, некоторых первичных и перевиваемых клетках. Репродукция вируса в культуре клеток сопровождается уплотнением цитоплазмы клеток, появлением в ней вакуолей; через 40 ч в цитоплазме некоторых клеток обнаруживают большое количество малых аморфных, эозинофильных включений.

Экспериментальная инфекция. Отмечена неодинаковая инфекционность различных штаммов вируса. Заболевание легко воспроизводится на курах, цыплятах и индюшатах вирулентными штаммами при любом методе заражения. К экспериментальному заражению восприимчивыми оказались перепела, воробьи, голуби, тетерева. При парентеральном заражении некоторые штаммы оказались патогенными для морских свинок, кошек, собак и других млекопитающих.

Клинические признаки. Инкубационный период длится от 5 до 15 дней. Симптомы болезни довольно разнообразны. Различают четыре формы клинического проявления болезни.

При первой форме — нервной — наблюдают угнетение, слабость, расстройство функций органов дыхания, диарею с водянистыми фекалиями зеленоватого цвета с примесью крови, паралич лап и крыльев. Основной патологоанатомический признак при этой форме — геморрагическое поражение пищеварительного тракта (цв. вкл., рис. 51). Смертность достигает 90 %.

Вторая форма болезни характеризуется поражением органов дыхания (кашель, удушье) и нервной системы. Летальность — от 10 до 50 %.Такая форма НБ вызывается мезофильными штаммами.

Третья форма болезни — наиболее легкая. Проявляется незначительными изменениями респираторного и герминативного трактов, что сопровождается прекращением яйценоскости на 1—3 нед, кашлем.

Четвертая форма болезни протекает без клинических признаков и диагностируется серологически или выделением вируса.

Патологоанатомические изменения. При остром течении болезни они характеризуются воспалением слизистых оболочек носа и ротовой полости, полосчатыми кровоизлияниями на слизистой оболочке пищевода. У 60—70 % взрослых кур отмечают точечные кровоизлияния в виде пояска на границе железистого и мышечного отделов желудка (цв. вкл., рис. 52). В тонком кишечнике отмечают появление очагов некроза и эрозии, в толстом — везикулярные папулы. В селезенке, печени, лимфоузлах и тимусе обнаруживают атрофию и некроз. Головной и спинной мозг гиперемированы.

Проникая в организм через слизистые оболочки, вирус попадает в кровеносные сосуды, в эндотелии которых размножается. Порозность стенок сосудов нарушается, и в них развиваются воспалительно-некротические процессы. Вирус, разнесенный с кровью по организму, вызывает расстройство гемодинамики с некрозо-дистрофическими изменениями.

Локализация вируса. Вирус локализуется в паренхиматозных органах, костном и головном мозге, мышцах, трахеальной слизи, толстом и тонком кишечниках. В период выраженной клинической картины болезни он выделяется во внешнюю среду с фекалиями, трахеальной слизью и выдыхаемым воздухом.

В организме неиммунных птиц вирус можно выделить только в начале болезни (до 10 дней). У иммунных птиц его удается определить более продолжительное время (до 19 дней) и только из железистого желудка, лимфоидных образований слепой кишки, фабрициевой сумки и мозга. Бессимптомное персистирование вируса НБ в организме иммунных птиц возможно в течение 70 дней. Персистирование может обусловить вирусоносительство и вирусовыделение, т. е. поствакцинальный иммунитет не исключает циркуляции полевых вело- и мезогенных штаммов вируса.

Источник инфекции — больная птица. Заражение здоровой птицы происходит при контакте с больной, а также через инфицированные корм и воду. Инфекция быстро распространяется аэрогенно. Больная птица выделяет вирус уже в инкубационном периоде.

Отмечено быстрое распространение заболевания при перевозке тушек вынужденно убитой птицы, использовании необезвреженной одежды, обуви. При инкубации яиц от больной птицы зародыш погибает от вируса.

Имеются данные о передаче вируса некоторыми паразитами. Так, вирус внедрялся в Ascaridae galli, из которой его можно выделить. Такую же роль играют кокцидии.

В естественных условиях вирус удавалось выделять от домашних (индейки, цесарки, утки), синантропных (голуби, вороны, галки) и диких птиц. Высказано предположение о том, что голуби — естественные носители лентогенных штаммов НБ. У норок, погибших в Голландии в 1970—1972 гг., развивался менингоэнцефалит в результате поедания потрохов инфицированной НБ птицы. Описаны случаи заражения НБ людей, у которых развивался конъюнктивит.

Диагностика. Диагноз ставят на основании эпизоотологических исследований, клинических признаков, патологоанатомических данных и результатов лабораторных исследований.

Лабораторная диагностика. В лабораторию направляют трахею, легкие, селезенку, печень, головной мозг (или голову) от свежего трупа курицы. От нескольких кур одного птичника получают парные сыворотки: в начале заболевания и спустя 2—3 нед.

Обнаружение вируса биопробой и выделение его проводят на 9—10-дневных куриных эмбрионах путем заражения их в аллантоисную полость. Через 48—72 ч эмбрионы гибнут. В аллантоисной полости при этом обнаруживают вирус с помощью РГА с эритроцитами кур. При отсутствии признаков размножения вируса на куриных эмбрионах проводят следующий пассаж (до трех раз).

Реже выделяют вирус на культуре клеток (куриных фибробластах). Через двое суток вирус вызывает ЦПД, дает положительную РГАд. В культуральной вируссодержащей жидкости в РГА обнаруживают вирус в существенно меньших титрах, чем в аллантоисной жидкости куриных эмбрионов.

В некоторых случаях ставят биопробу на неиммунных цыплятах 2—4-месячного возраста путем внутримышечного заражения. Болезнь проявляется в течение 10—12 дней.

Идентификацию вируса НБ и дифференциацию его от вируса гриппа кур, сходного по течению болезни, проводят с помощью РТГА. Для этой цели используют специально выпускаемый набор диагностических сывороток.

Перспективны новые методы обнаружения и идентификации вируса ньюкаслской болезни в ИФА, РНГА и ПЦР. Методы высокочувствительны и экспрессны.

Ретроспективная диагностика. Основана на установлении динамики титра антител в парных сыворотках в РТГА. Учитывая тот факт, что на всех птицефабриках кур регулярно вакцинируют живыми вакцинами, НБ может протекать атипично или даже латентно. Не исключена возможность выделения вакцинного вируса. Поэтому задача лаборатории — определить патогенность выделенного вируса. Доказательством патогенности выделенного вируса и персистенции эпизоотического штамма в стаде служат следующие признаки:

гибель зараженных куриных эмбрионов через 60—72 ч после заражения (велогенные штаммы) или через 90 ч (мезогенные штаммы);

полевые изоляты имеют в РГА низкие титры (16—128 ГАЕ), а вакцинные штаммы — высокие (более 256 ГАЕ);

индекс внутримозговой вирулентности (метод Хенсона) на однодневных цыплятах для велогенных штаммов более 1,5, а для лентогенных — 0,2;

у непривитой птицы, подвешенной в клетке, в неблагополучном птичнике, через 3 нед появляются антитела к вирусу НБ;

у вакцинированной птицы через 3—4 мес после вакцинации регистрируют внезапное повышение уровня антител;

поствакцинальные титры антител существенно ниже постинфекционных;

повышение за период между двумя исследованиями числа серопозитивных животных свидетельствуют о распространении инфекции.

Иммунитет и специфическая профилактика. Естественно переболевшая или вакцинированная птица приобретает иммунитет, продолжительность и напряженность которого зависит от возраста птицы, биологических свойств вируса и метода введения его в организм.

Специфическая профилактика ньюкаслской болезни сегодня проводится большей частью живыми вакцинами. В СНГ широко применяют сухие вирусвакцины из штаммов Н, В1, LaSota, Бо/74/ВГНКИ. В профилактике НБ важна разработка оптимальной схемы иммунизации птицы. Наиболее подходящий возраст для первой вакцинации 10—14-й день, а для ревакцинации 5—6-я неделя.

Преимущество гранулированных форм вакцин из штаммов V4 (Австрия) и Roakin — более высокая термостабильность; их можно транспортировать без рефрижератора и смешивать с любым кормом. Пероральная вакцинация штаммом V4 стимулирует лимфоидные ткани кишечного тракта, что индуцирует секреторные иммуноглобулины и обеспечивает защиту даже при низком уровне циркуляторных гуморальных антител.

В механизме формирования ранней невосприимчивости к вирусу НБ ведущая роль принадлежит факторам клеточного иммунитета. Защитное действие гуморальных антител проявляется значительно позже.

Инактивированные вакцины против НБ готовят из вируса, размноженного в КЭ и убитого формальдегидом, β-пропиолактоном или этиленамином. Инактивированные вакцины обычно применяют в сочетании с живыми. Хороший защитный эффект получали прививая однодневных цыплят живой вакциной, а через 3 и 8 нед — инактивированной.

Обнадеживающий результат дает конструирование вируса оспы птиц, экспрессирующий гемагглютинин-нейраминидазный протеин вируса НБ. Считается, что данная векторная система может быть использована не только для получения генно-инженерной вакцины против НБ, но и мультивалентной вакцины, экспрессирующей гены таких патогенных для птиц вирусов, как болезнь Марека, инфекционный ларинготрахеит, инфекционная брусальная болезнь и инфекционный бронхит кур.

2.10.5. ВИРУС ЧУМЫ ПЛОТОЯДНЫХ

Чума плотоядных (ЧП, чума собак, болезнь Карре) — острая или подострая контагиозная вирусная болезнь, проявляющаяся лихорадкой, катаральным воспалением слизистых оболочек, поражениями кожи, центральной нервной системы или сочетанием этих признаков.

Чума известна со времен одомашнивания собак. Вирусную природу чумы собак впервые доказал французский ученый Карре в 1905 г.

В настоящее время чума плотоядных широко распространена в мире. Заболевание регистрируют среди собак, диких плотоядных и пушных зверей в Европе, Азии, Австралии, Африке, Америке, а также в нашей стране.

В естественных условиях вирус чумы плотоядных поражает в основном представителей отряда хищных. К вирусу восприимчивы собаки, лисицы, песцы, норки, медведи, волки. Для животных различных видов патогенность вируса неодинакова — от скрытого бессимптомного до острого течения со 100%-ной смертностью. Наиболее чувствительны хорьки и тхорзофретки (помесь белого африканского хоря с черным лесным хорем).

Кошки в естественных условиях к вирусу чумы плотоядных невосприимчивы. В условиях звероводческих хозяйств чума обычно начинается у животных одного вида, а через 1—2 мес могут заболеть звери другого вида, к которому вирус постепенно адаптируется.

Чаще и тяжелее чума протекает весной и осенью. Наиболее чувствительны к заражению щенки в возрасте 4—6 мес. Щенки вакцинированных и естественно переболевших чумой матерей обычно не болеют за счет колострального иммунитета. Через две недели после отсадки от матери щенков вакцинируют.

Характеристика возбудителя. Вирус чумы плотоядных (ВЧП) входит в семейство Paramyxoviridae, род Morbillivirus. Род включает помимо ВЧП вирус кори, вирусы чумы крупного рогатого скота, мелких жвачных и тюленей. Между вирусами существует выраженное в разной степени антигенное родство, что обеспечивает перекрестный иммунитет.

Вирионы ВЧП диаметром 150—300 нм содержат единую односпиральную линейную молекулу минус-РНК. Нуклеокапсид окружен липопротеидной оболочкой.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Во внешней среде в выделениях больных животных (кал, слизь) вирус сохраняется 7—11 дней, в крови и органах павших животных в условиях лаборатории при 4 °С — до 2 мес, а при минус 20 °С — до 6 мес. Дезинфицирующие вещества инактивируют вирус довольно быстро (2%-ный раствор едкого натра за 1 ч).

Антигенная вариабельность. Вирус чумы в иммунобиологическом отношении однороден, в то же время по происхождению и некото-

рым биологическим особенностям его штаммы разделяют на две подгруппы: классические и вариантные. Классические штаммы высокопатогенны и проявляют строгую видовую специфичность.

Антигенная активность. Вируснейтрализирующие антитела обнаруживают на 8—9-й день после заражения и выявляют постоянно в течение года.

Культивирование вируса. Вирус ЧП после адаптации возможно культивировать на 3—6-месячных хорьках и 6—12-месячных щенках собак.

Вирус может быть адаптирован к куриным эмбрионам и культивироваться в них при заражении на хорионаллантоисную оболочку. В оболочке появляются сероватые фокусы и тяжи; эмбрионы гибнут. Заражение эмбрионов внесением вируссодержащего материала в желточный мешок ведет к гибели их на 7—11-е сут после заражения.

Вирус активно размножается в первичных культурах клеток почки и легких собак, хорьков, слизистой оболочки мочевого пузыря собак, а адаптированные штаммы — в клетках куриного эмбриона и в перевиваемых клетках — MDBC, Vero и др. Цитопатическое действие вируса проявляется образованием синцития через 7—14 дней после заражения монослоя.

Клинические признаки. Инкубационный период длится 4—20 дней. Чума плотоядных может протекать молниеносно, сверхостро, остро, подостро, абортивно, типично и атипично. По клиническим проявлениям различают катаральную, легочную, кишечную и нервную формы болезни. Чаще других (до 52 % случаев) наблюдают нервную форму. Поскольку вирус поражает клетки всех систем организма, разделение на различные формы весьма условно.

При молниеносном течении болезни животные гибнут внезапно, без проявления клинических признаков.

Сверхострое течение болезни продолжается 2—3 дня и характеризуется высокой температурой тела, коматозным состоянием и гибелью.

Острое течение болезни длится 2—4 нед. Начинается лихорадкой с температурой 39,5—41 °С, рвотой. Далее развивается конъюнктивит и ринит — от серозного до гнойного. Появляется кашель как проявление трахеита, бронхита. На коже в области живота, паха, внутренней поверхности бедер появляется пустулезная сыпь. Острое течение часто переходит в хроническое.

Катаральная форма после периода кажущегося выздоровления может перейти в нервную (возбуждение, судороги конечностей, парезы, параличи), заканчивающуюся гибелью.

Абортивное течение чумы чаще наблюдают у вакцинированных животных и проявляется лишь 1—2-дневным недомоганием. Но и в этом случае возможно нарастание нервных явлений и гибель животного.

У животных разных видов клинические признаки чумы несколько отличаются.

Патологоанатомические изменения. Труп павшей от чумы собаки, как правило, истощен. Глаза впавшие, зрачок расширен. На роговице, губах и вокруг ноздрей мелкие эрозии. Слизистая оболочка верхних дыхательных путей гиперемирована. Легкие переполнены кровью, с очагами красной и серой гепатизации. Возможны отеки легких и пневмония. Точечные и полосчатые кровоизлияния видны на плевре, эпикарде и перикарде. В сердечной мышце сероватые и желтоватые очаги. Печень полнокровная, рыхлая, с желтым оттенком, в состоянии жирового перерождения. Селезенка при молниеносном течении чумы по краям имеет инфаркты. В корковом слое почек точечные кровоизлияния. На слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки эрозии, язвы, признаки катарального воспаления. На слизистой мочевого пузыря точечные и полосчатые кровоизлияния. Брыжеечные и мезентериальные лимфоузлы на разрезе сочные, с кровоизлияниями.

Патологоанатомические изменения ЧП весьма неспецифичны и варьируют в зависимости от интенсивности и длительности болезни (цв. вкл., рис. 53).

Локализация вируса. Вирус ЧП, попавший в организм чаще всего аэрогенным или алиментарным путем, размножается в клетках соответствующих слизистых оболочек и через 3—4 нед после заражения может быть обнаружен в носовом и конъюнктивальном экскретах, слюне, фекалиях. В крови вирус находится в период лихорадочного состояния животного. Поскольку вирус пантропен, он размножается и накапливается в клетках трахеи, легких, лимфоузлов, селезенки, почек, головного мозга, слизистой мочевого пузыря.

Установлена персистенция вируса в ЦНС. У переболевших животных наблюдают вирусоносительство в течение 1—2 мес.

Источник инфекции — больное или переболевшее животное, которое может выделять вирус в течение 3 мес после болезни. Резервуаром вируса чумы служат бродячие собаки и дикие плотоядные.

Вирус чумы плотоядных передается главным образом аэрогенно, но возможно также алиментарно, половым путем и даже через плаценту от больной самки потомству. От пути передачи во многом зависит характер развития эпизоотического процесса. Переносится вирус человеком, грызунами, а также птицами и насекомыми.

Эпизоотический процесс при ЧП проявляется неодинаково и зависит от вирулентности возбудителя, степени восприимчивости животных, природно-географических и хозяйственных факторов. На фоне массовой вакцинопрофилактики современный уровень заболеваемости пушных зверей и собак можно считать спорадическим.

Диагностика. Повсеместное применение эффективных вирусвакцин сделало редкостью классическое проявление клинических признаков, патологоанатомических изменений и эпизоотических характеристик этой инфекции. В связи с этим возросла диагностическая ценность лабораторных методов исследований.

Лабораторная диагностика. Она состоит главным образом в обнаружении возбудителя болезни путем выявления в патологическом материале вирусных антигенов и нуклеиновой кислоты генома, реже — активного вируса биопробой, а также установлением нарастания титра антител к вирусу ЧП в парных сыворотках.

Патологическим материалом для лабораторных исследований служат кровь в период острого лихорадочного состояния, а также мазки и смывы со слизистых оболочек носа и гортани, кусочки органов и участки головного мозга вынужденно убитых или только что павших животных. Для ретроспективной серологической диагностики берут парные сыворотки. Обнаружение генома нуклеиновой кислоты вируса проводится полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Разработанная на основе ПЦР тест-система обеспечивает ответ максимально за 8—24 ч, высокую специфичность и предельно возможную чувствительность.

Обнаружение вирусного антигена осуществляют серологическими реакциями, в первую очередь ИФА и РНГА, как наиболее чувствительными, специфичными и экономичными.

ИФА с использованием полистироловых планшет, сенсибилизированных моноклональными антителами, обнаруживает и идентифицирует специфический антиген вируса. Полученный комплекс выявляют конъюгатом моноклональных антител к вирусу ЧП с пероксидазой. Связанная пероксидаза вызывает разложение субстрат-индикаторного раствора и окрашивание содержимого лунок планшета. Результаты ИФА учитывают спектрофотометрически или визуально. Исследование занимает около трех часов.

Вариант метода — *точечный твердофазный иммуноферментный анализ* (dot-ИФА), воспроизводимый на нитроцеллюлезной мембране и занимающий 30—40 мин.

РНГА также является методом экспресс-диагностики ЧП. Для обнаружения и идентификации антигена вируса в РНГА возможно использование латексных или эритроцитарных антительных диагностикумов.

РИФ, *РСК* и *РПД* в диагностике чумы плотоядных высокоспецифичны, однако диагностических наборов для них в настоящее время не выпускают.

Активный вирус ЧП может быть обнаружен на серонегативных естественно-восприимчивых животных (щенках через 15 дней после отъема от самки). Еще более чувствительны к заражению белые хорьки и тхорзофретки (100%-ная гибель на 10—18-й день после заражения). Однако метод биопробы дорог и длителен и потому используется ограниченно.

Вспомогательный метод диагностики — обнаружение оксифильных, чаще цитоплазматических телец-включений в эпителии конъюнктивы, других слизистых оболочек и в лейкоцитах.

Выделение вируса ЧП трудно. Делаются попытки выделения вируса на естественно-восприимчивых животных, куриных эмбрионах и в культуре клеток. Наиболее эффективным для этой цели оказалось использование культуры клеток почек или альвеолярных макрофагов больных животных.

Идентификацию вируса проводят с использованием ПЦР, ИФА, РНГА, РН, РИФ, РСК, РДП. Полученные к отдельным белкам вируса моноклональные антитела позволяют выявлять в ИФА антигенные вариации вируса ЧП.

Серодиагностика чумы плотоядных состоит в выявлении и титровании специфических антител в сыворотке крови больных и переболевших животных, а также животных, контактировавших с больными. В последние годы для обнаружения и титрования антител к вирусу ЧП применяются РНГА и ИФА. РНГА позволяет обнаружить увеличение титра антител уже на 5—7-е сутки болезни вместо 14—21 дня при использовании других серологических методов.

Дифференциальный диагноз. Чуму плотоядных дифференцируют от лептоспироза, инфекционного гепатита собак, бешенства, болезни Ауески, сальмонеллеза, пастереллеза, токсоплазмоза, пироплазмоза.

Иммунитет и специфическая профилактика. Уже на 3—5-й день болезни можно обнаружить проявление специфического иммунитета. Инфицированные вирусом клетки могут уничтожаться фагоцитами и Т-эффекторами. Поскольку эти клетки являются мишенью для вируса, то наблюдается соответствующий им иммунодефицит. В то же время идет процесс антителообразования. У собак-реконвалесцентов наступает продолжительный, практически пожизненный иммунитет. Однако устойчивость переболевших животных к реинфекции не абсолютна.

Иммунопрофилактика чумы плотоядных осуществляется, как правило, живыми вакцинами. Щенков прививают в возрасте 8—10 нед, затем повторно через 21—28 дней и далее ежегодно. Вакцины готовят моновалентные (Мультикан-1) и поливалентные (Мультикан-2, -4, -6, -7, -8, Дипентовак, Гексоканивак, Биовак, Бионор и др.).

Поливалентные вакцины помимо вируса чумы плотоядных содержат в своем составе возбудителей инфекционного гепатита, аденовироза, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, бешенства. В зависимости от эпизоотической необходимости в вакцину включают бактериальный компонент (возбудители лептоспироза двух серогрупп, грибы рода трихофитон и микроспорум, возбудители бутулизма и псевдомоноза). Добавляемые к вирусу ЧП возбудители находятся в живом или инактивированном состоянии.

При необходимости быстрого создания иммунологической защищенности животного на ранних стадиях болезни, невосприимчивости к заражению или с целью обрыва эпизоотии целесообразно применение гипериммунной сыворотки или очищенных иммуноглобулинов.

Для лечения и профилактики чумы собак в настоящее время предложены различные моно- и поливалентные сыворотки и специфические глобулины. Степень иммунной защиты, создаваемой серопрофилактикой, значительно ниже, чем при использовании вакцинопрофилактики, поэтому через 14 дней после введения антител рекомендуется животных вакцинировать.

2.11. СЕМЕЙСТВО РАБДОВИРУСОВ

Семейство Rhabdoviridae (от греч. rhabdos — стержень, полоска) — большая группа вирусов, поражающих позвоночных, беспозвоночных и растения.

Вирион имеет пулевидную форму (длина 100—430 нм, диаметр 45—100 нм). Вирионы состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеидной оболочки, на поверхности которой имеются характерные выступы длиной 5—10 нм и диаметром около 3 нм. Молекулярная масса вирионов 300—1000 МД, плавучая плотность в CsCl 1,19—1,20 г/см^3, коэффициент седиментации 500—1045S.

Геном рабдовирусов представлен односпиральной, линейной минус-РНК с молекулярной массой 3,5—4,6 МД. Генетическая РНК не инфекционна и не обладает функциями иРНК.

Вирионы имеют в составе 5 структурных полипептидов: L, G, N, P и M. В состав наружного слоя оболочки вириона входит гликопротеид G, который образует на поверхности вириона шипы (пепломеры). Этот белок участвует в адсорбции, проникновении и эндоцитозе вируса в клетку, индуцирует образование вируснейтрализирующих антител и клеточно-опосредованного иммунитета, проявляет гемагглютинирующую активность. Белок M составляет внутренний слой вирусной оболочки. Он участвует в регуляции транскрипции геномной РНК, ингибирует транскрипцию клеточной ДНК и принимает участие в заключительной стадии морфогенеза вируса в зараженной клетке. Три белка (N, L, P) являются белками нуклеокапсида, участвуют в регуляции различных процессов при репродукции вируса. В вирионах рабдовирусов обнаружена РНК-зависимая РНК-полимераза (транскриптаза). В вирионах рабдовирусов содержится 65—75 % белка, 15—25 % липидов, 3 % углеводов и 1—2 % РНК.

Рабдовирусы размножаются в цитоплазме клеток. Вирусы проникают в клетку как путем эндоцитоза, так и в результате сплавления липопротеидной оболочки вируса с плазматической мембраной клетки. Вначале вирионная РНК транскрибируется вирионассоциированной транскриптазой с образованием информационных РНК (иРНК), обеспечивающих синтез вирусспецифических белков на цитоплазматических полисомах, а затем происходит репликация РНК. На вирионной минус-РНК синтезируется полная копия плюс-РНК, которая, в свою очередь, служит матрицей для синтеза дочерних геномных минус-РНК. Синтезированные минус-РНК связываются с белками и образуются нуклеокапсиды. Созревание вирионов происходит почкованием нуклеокапсидов через модифицированные участки клеточной оболочки, в которой находятся вирусспецифические белки G и M.

Виды вирусов данного семейства инфицируют млекопитающих, рыб, членистоногих и других беспозвоночных. Отдельные из них поражают растения и определенные виды растительноядных насекомых.

Распространение вирусов позвоночных может быть контактным, аэрозольным, через укус, при половом контакте.

Семейство Rhabdoviridae состоит из шести родов: Vesiculovirus, Lyssavirus, Ephemerovirus, Novirhabdovirus, Cytorhabdovirus, Nukleorhabdovirus.

Род Vesiculovirus (от лат. vesicula — пузырек). Включает вирус везикулярного стоматита, штаммы Индиана (прототипный вирус), Кокал, Алагоас, Нью-Джерси и вирусы Чандипура, Исвахан, Пири, Мараба и др.

Вирусы данного рода были выделены от различных животных, включая млекопитающих, рыб, членистоногих (насекомых). Везикулярный стоматит лошадей, крупного рогатого скота, свиней является одной из известных болезней. Ряд везикуловирусов (Чандипура, Кокал и др.) инфицируют также человека. Заболевание сопровождается гриппоподобными симптомами.

Род Lyssavirus (от греч. lyssa — бешенство). Включает вирус бешенства (прототипный вирус), вирусы Лагос, Мокола, Дювенхейдж и 2 биотипа лиссавирусов европейских летучих мышей. Лиссавирусы размножаются в организме позвоночных и членистоногих. Наибольшую опасность для человека и животных представляет вирус бешенства. Бешенство энзоотично во всех регионах мира, кроме Антарктики. Великобритания, Ирландия и Япония свободны от бешенства.

Вирусы Мокола, Лагос и Дювенхейдж патогенны также для человека. На основании перекрестной реакции нейтрализации некоторые лиссавирусы подразделены на 4 серотипа: первый — вирус бешенства, второй — Лагос, третий — Мокола и четвертый — Дювенхейдж.

Род Ephemerovirus. Включает вирус эфемерной лихорадки крупного рогатого скота (прототипный вирус), вирус Берримах и вирус реки Аделаида. Наибольший экономический ущерб при-

носит эфемерная лихорадка крупного рогатого скота и водяных буйволов в тропических и субтропических регионах Африки, Австралии, Среднего Востока и Азии. Заболевание, вызванное вирусом эфемерной лихорадки крупного рогатого скота, проявляется внезапной лихорадкой, хромотой, анарексией, нарушением моторики рубца и длительным снижением молочной продуктивности. Хотя уровень смертности низок (1—2 %), он выше у высокопродуктивных пород скота. Вирус распространяется кровососущими членистоногими, он выделен от комаров и москитов.

Другие вирусы данного вида не ассоциируются с патологией животных, хотя некоторые были выделены от крупного рогатого скота и насекомых.

Род Novirhabdovirus. Включает вирус инфекционного гематопоэтического некроза (прототипный вирус), вирус геморрагической септицемии и рабдовирус Хирам.

Новирабдовирусы инфицируют многие виды рыб (лососевых, сельдевых и др.) как в естественных, так и в искусственных условиях. Вирусы имеют широкое географическое распространение. Виды данного рода вызывают экономически значимые болезни у культивируемых рыб. Вспышки болезни могут сопровождаться гибелью 50—100 % поголовья лососевых, разводимых в искусственных условиях.

Род Cytorhabdovirus. Включает восемь видов вирусов, инфицирующих многие виды растений, из них вирус желтого некроза салата латука — прототипный.

Род Nukleorhabdovirus. Включает семь видов, из них вирус желтой карликовости картофеля — прототипный. Все виды вирусов данного рода инфицируют растения.

2.11.1. ВИРУС БЕШЕНСТВА

Бешенство — острая инфекционная болезнь, протекающая с тяжелым поражением нервной системы, как правило, с летальным исходом. Восприимчивы человек и все теплокровные животные. Бешенство регистрируется в разных странах мира.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Rhabdoviridae, роду Lyssavirus. РНК-содержащий. Геном представлен единой односпиральной линейной молекулой минус-РНК. Вирионы вируса состоят из нуклеокапсида спиральной симметрии и липопротеидной оболочки с гликопротеиновыми булавовидными выступами. Вирион пулеобразной формы, средний размер его 180—175 нм.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Низкие температуры консервируют вирус. Для него губительны высокие температуры (80—100 °С), в гниющем материале вирус может сохраняться до двух недель. Дезинфицирующие средства (растворы

формальдегида, едкой щелочи, хлорной извести) в обычных концентрациях действуют на вирус губительно.

Антигенная структура. Вирионы вируса бешенства содержат гликопротеидный (наружный) и нуклеокапсидный (внутренний) антигены. Гликопротеидный антиген индуцирует образование вируснейтрализующих и антигемагглютинирующих антител и обеспечивает развитие иммунитета у животных, а нуклеокапсидный — комплементсвязывающих и преципитирующих антител.

Вирус бешенства имеет 4 серотипа (прототипы): вирус бешенства, Лагос, Мокола, Дювенхейдж. Эпизоотические штаммы вируса бешенства в иммунобиологическом отношении родственные, но различаются по вирулентности. Все выделенные штаммы вируса по вирулентности разделяют на 5 групп. Штаммы первой группы характеризуются высокой, а пятой группы — низкой вирулентностью.

Спектр патогенности вируса тесно связан с его экологией, которая имеет особенности. Так, необходимо различать два основных и независимых эпизоотических проявления лиссавирусной инфекции:

1) эпизоотии бешенства, поддерживаемые наземными животными (лисицы, волки, енотовидные собаки, шакалы, мангусты, скунсы, еноты-полоскуны и др.);

2) эпизоотии хироптерного происхождения, поддерживаемые вампирами, насекомоядными и плотоядными летучими мышами.

С 1960-х годов бешенство диких животных стало преобладающим. Основным резервуаром и источником инфекции оказались лисицы и другие дикие животные. Болезнь у них может протекать латентно, обеспечивая персистенцию вируса в естественных условиях. Бешенство собак при городских эпизоотиях, как правило, заканчивается их гибелью.

Антигенная активность. Животные, иммунизированные против бешенства, продуцируют вируснейтрализующие, комплементсвязывающие, преципитирующие, антигемагглютинирующие и литические (разрушающие клетки, зараженные вирусом, в присутствии комплемента) антитела.

Вирус обладает гемагглютинирующими свойствами в отношении эритроцитов гусей, кур, морских свинок, овец, человека (группы 0). Обычно реакцию гемагглютинации ставят с эритроцитами гуся при 0—4 °С, pH 6,2—6,4. Между инфекционной и гемагглютинирующей активностью существует линейная зависимость.

Культивирование вируса. В лабораторных условиях вирус можно культивировать на лабораторных животных (мышатах, кроликах, хомячках, морских свинках и др.) при интрацеребральном методе заражения. Вирус репродуцируется в первичных и перевиваемых культурах клеток (почках сирийского хомячка, эмбрионах овец, телят, ВНК-21, клетках невриномы Гассерова узла крысы и др.). В первых пассажах вирус размножается медленно, не вызывая

ЦПД. К вирусу бешенства после предварительной адаптации восприимчивы и куриные эмбрионы.

Экспериментальная инфекция. Легко воспроизводится на всех видах теплокровных животных.

Клинические признаки. Продолжительность инкубационного периода зависит от места укуса, характера раны, количества и вирулентности попавшего в рану вируса, вида, возраста и резистентности покусанного животного. Инкубационный период длится от одной недели до года и даже дольше. Клиническое проявление болезни в основном одинаково у всех животных, но наиболее типично оно у собак, у которых можно наблюдать как буйное, так и тихое (паралитическое) течение болезни. У крупного рогатого скота бешенство может протекать атипично (потеря аппетита, атония рубца, паралич глотки, слюнотечение). Стадии возбуждения может не быть.

Патологоанатомические изменения. Вскрывать подозрительных по заболеванию бешенством животных в полевых условиях запрещено.

У мясоядных (в основном у собак) в желудке можно обнаружить инородные предметы.

Локализация вируса. Вирус бешенства обладает выраженной нейропробазией. Проникая центростремительно с периферии (место укуса) по нервным стволам в центральную нервную систему, в организме он распространяется центробежно по периферическим нервам и попадает в разные органы, включая слюнные железы.

В организме вирус локализуется главным образом в центральной нервной системе, а также в слюнных железах и слюне. Доказано нахождение вируса в некоторых внутренних органах. Из организма выделяется со слюной, через легкие, кишечник и с мочой.

Источник инфекции — больные животные. Они передают вирус во время укуса. Возможно заражение при ослюнении поврежденной кожи. Плотоядные животные могут заражаться при поедании головного и спинного мозга погибших от бешенства животных. Доказана возможность заражения бешенством аэрогенным путем (в местах, где имеются летучие мыши). До 1960-х годов основным источником распространения бешенства были собаки и кошки, позднее лисицы, волки, корсаки и другие дикие животные.

Диагностика. Диагноз на бешенство ставят на основании эпизоотологических, клинических данных и результатов лабораторных исследований, имеющих решающее значение.

При работе с больными животными и инфекционным материалом необходимо строго соблюдать меры личной безопасности: надевать резиновые перчатки, халаты с нарукавниками, резиновый или полиэтиленовый фартук, резиновые сапоги, защитные очки, защитную маску на лицо.

Лабораторная диагностика. Для исследования на бешенство направляют в лабораторию свежие трупы мелких животных целиком, а от крупных и средних животных — голову с двумя первыми шейными позвонками. Трупы мелких животных перед отправкой на исследование обрабатывают инсектицидами.

Патологический материал упаковывают в пластмассовые мешки, вкладывают в плотно закрывающиеся ящики с влагопоглощающей прокладкой, пропитанной дезинфектантом. Материал и сопроводительное письмо, в котором указывают отправителя и его адрес, вид животного, анамнестические данные и обоснование подозрения в заболевании животного бешенством, дату и подпись врача, отправляют с нарочным.

Лабораторная диагностика включает: обнаружение вирусного антигена в РИФ и РДП, телец Бабеша—Негри и биопробу на белых мышатах.

РИФ. Для данной реакции биопромышленность выпускает флуоресцирующий антирабический γ-глобулин.

На обезжиренных предметных стеклах готовят тонкие отпечатки или мазки из различных отделов головного мозга левой и правой стороны (аммонов рог, кора полушарий, мозжечок и продолговатый мозг). Готовят не менее двух препаратов каждого отдела мозга. Можно также исследовать спинной мозг, подчелюстные слюнные железы. Для контроля делают препараты из мозга здорового животного (обычно белой мыши).

Препараты высушивают на воздухе, фиксируют в охлажденном ацетоне (минус 15—20 °С) от 4 до 12 ч, высушивают на воздухе, наносят специфический флуоресцирующий γ-глобулин, помещают во влажную камеру при 37 °С на 25—30 мин. Затем тщательно промывают физиологическим раствором или фосфатным буфером с pH 7,4, споласкивают дистиллированной водой, высушивают на воздухе, наносят нефлуоресцирующее иммерсионное масло и просматривают под люминесцентным микроскопом. В препаратах, содержащих антиген вируса бешенства, наблюдают разной величины и формы флуоресцирующие желто-зеленым цветом гранулы в нейронах, но чаще вне клеток. В контроле подобного свечения не должно быть, нервная ткань обычно светится тусклым сероватым или зеленоватым цветом. Интенсивность свечения оценивают в крестах. Отрицательным считают результат при отсутствии специфической флуоресценции (см. рис. 43 на стр. 153).

Материал от животных, вакцинированных против бешенства, нельзя исследовать в РИФ 3 мес после прививки, так как может быть флуоресценция антигена вакцинного вируса.

В РИФ не подлежат исследованию ткани, консервированные глицерином, формалином, спиртом и т. д., а также материал, имеющий признаки даже незначительного загнивания.

РДП в агаровом геле. Метод основан на свойстве антител и антигенов диффундировать в агаровом геле и при встрече образовы-

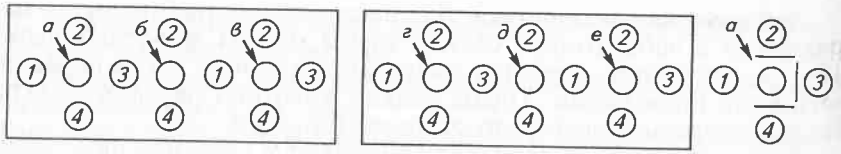


Рис. 60. Схема РДП при диагностике бешенства:

а, б — левое и правое полушария мозга; *в, г* — левый и правый аммоновы рога; *д* — мозжечок; *е* — продолговатый мозг; *1, 2, 3, 4* — разведения антирабического глобулина

вать видимые визуально линии преципитации (комплекс антиген + + антитело). Применяют для обнаружения антигена в мозге животных, павших от уличного вируса бешенства, или при экспериментальной инфекции (биопроба).

Реакцию ставят на предметных стеклах, на которые наливают 2,5—3 мл расплавленного 1,5 %-ного раствора агара*.

После застывания в агаре делают лунки по трафарету диаметром 4—5 мм, помещенному под предметное стекло с агаром. Агаровые столбики вынимают ученическим пером. Лунки в агаре заполняют компонентами по схеме (рис. 60).

От крупных животных исследуют все отделы головного мозга (левой и правой стороны), от средних (крысы, хомяки и др.) — какие-либо три отдела мозга, у мышей — весь мозг. С помощью пинцета из мозга готовят пастообразную массу, которую и помещают в соответствующие лунки.

Контроли с положительным и отрицательным антигенами ставят на отдельном стекле по тому же трафарету.

После заполнения лунок компонентами препараты помещают во влажную камеру и ставят в термостат при 37 °С на 6 ч, затем оставляют при комнатной температуре на 18 ч. Учет результатов ведут в течение 48 ч.

Реакцию считают положительной при появлении между лунками, содержащими суспензию мозга и антирабический γ-глобулин, одной или двух-трех линий преципитации любой интенсивности.

Бактериальная контаминация и загнивание мозга не препятствуют использованию его для РДП. Материал, консервированный глицерином, формалином и другими средствами, для РДП непригоден.

Выявление телец Бабеша—Негри. На предметных стеклах делают тонкие мазки или отпечатки из всех отделов головного мозга (как для РИФ), не менее двух препаратов из каждого отдела мозга, и окрашивают по одному из методов (по Селлерсу, Муромцеву, Манну, Ленцу и т. д.) (цв. вкл., рис. 22).

* Агаровый гель: агар Дифко — 15 г, натрия хлорид — 8,5 г, 1%-ный раствор метилового оранжевого в 50%-ном этиловом спирте — 10 мл, мертиолят — 0,01 г, дистиллированная вода — 1000 мл.

Пример окраски по Селлерсу: на свежий, невысохший препарат наносят краситель*, покрывая им весь препарат, выдерживают 10—30 с и смывают фосфатным буфером (pH 7,0—7,5), высушивают в вертикальном положении при комнатной температуре (в затемненном месте) и просматривают под микроскопом с масляной иммерсией.

Положительным результатом считают наличие телец Бабеша—Негри — четко очерченных овальных или продолговатых гранулированных образований розово-красного цвета, расположенных в цитоплазме клеток или вне их.

Данный метод имеет диагностическое значение только при обнаружении типичных специфических включений.

Биопроба. Она более эффективна по сравнению со всеми указанными выше методами. Ее ставят при получении отрицательных результатов предыдущими методами и в сомнительных случаях.

Для биопробы отбирают белых мышей массой 16—20 г. Нервную ткань из всех отделов головного мозга растирают в ступке со стерильным песком, добавляют физиологический раствор до получения 10%-ной суспензии, отстаивают 30—40 мин и используют надосадочную жидкость для заражения мышат. При подозрении на бактериальное загрязнение добавляют на 1 мл суспензии по 500 ЕД пенициллина и стрептомицина и выдерживают 30—40 мин при комнатной температуре.

На одну биопробу заражают 10 — 12 мышат: половину интрацеребрально по 0,03 мл, половину подкожно в область носика или в верхнюю губу по 0,1—0,2 мл.

Зараженных мышат помещают в стеклянные банки (лучше аквариумы) и наблюдают за ними в течение 30 дней, ведя ежедневную регистрацию. Гибель мышей в течение 48 ч считают неспецифической и не учитывают в оценке результатов. При наличии вируса бешенства в патологическом материале с 7—10-го дня после заражения у мышей наблюдают следующие симптомы: взъерошенность шерсти, своеобразную горбатость спины, нарушение координации движений, паралич задних, затем передних конечностей и гибель. У павших мышей головной мозг исследуют в РИФ, на обнаружение телец Бабеша—Негри и ставят РДП.

Биопробу на бешенство считают положительной, если в препаратах из мозга зараженных мышат обнаруживают тельца Бабеша—Негри или выявляют антиген методами РИФ или РДП. Отрицательный диагноз — отсутствие гибели мышат в течение 30 дней.

Рекомендуют для ранней диагностики методом биопробы (особенно это важно, когда исследуемое животное покусало человека) использовать для заражения не 10—12, а 20—30 мышат, и с третье-

* Одна часть 1%-ного раствора основного фуксина, смешанная с двумя частями 1%-ного метилового синего.

го дня после заражения ежедневно забивать по 1—2 мышонка для исследования их головного мозга в РИФ. Это позволяет (в положительных случаях) сократить срок исследования на несколько дней.

В лабораторной практике иногда ставят метод так называемой специфической биопробы. Сущность его в том, что мыши заболевают при заражении мозговой тканью больных бешенством животных и не заболевают, если эту ткань предварительно обработать (10 мин при 37 °С) антирабической сывороткой.

Некоторые исследователи рекомендуют проводить прижизненную диагностику бешенства *методом иммунофлуоресцентного исследования* отпечатков роговицы подозреваемых в заболевании бешенством животных, но эффективность этого метода невысока.

Обычно в лаборатории проводят исследование в следующей последовательности: из головного мозга делают мазки-отпечатки для РИФ и обнаружения телец Бабеша—Негри, ставят РДП, при получении отрицательных результатов делают биопробу.

При высококвалифицированном выполнении РИФ получают 99—100 % совпадения с биопробой. Тельца Бабеша—Негри выявляют лишь в 65—85 % случаев бешенства, в РДП — от 45 до 70 %.

Специфическая профилактика. В настоящее время для профилактики бешенства применяют инактивированные и живые вакцины. Условно вакцины можно разделить:

на вакцины первого поколения, которые готовят из головного мозга животных, инфицированных фиксированным вирусом бешенства;

вакцины второго поколения, которые готовят из штаммов вируса бешенства, адаптированных к культуре клеток;

вакцины третьего поколения, которые получают с помощью генно-инженерных методов.

За рубежом разработали и в некоторых странах успешно применяют рекомбинантную вакцину, которая содержит рекомбинантный вирус оспы, несущий ген основного гликопротеида оболочки вируса бешенства.

В настоящее время начата разработка и показана возможность применения ДНК-вакцин для профилактики бешенства. В России и СНГ широко применяют инактивированную вакцину из штамма Щелково-51, которую готовят с использованием культуры клеток ВНК-21.

Достижения науки по оральной вакцинации лисиц в естественных условиях природы представляют значительную веху в борьбе с природными очагами инфекции.

2.12. СЕМЕЙСТВО ФЛАВИВИРУСОВ

Флавивирусы размножаются в клетках насекомых, грызунов, свиней, крупного рогатого скота и человека. Вирионы флавивирусов сферической формы, диаметром 40—60 нм, имеют липидную

оболочку. Капсид образован капсидным протеином, а оболочка содержит 2—3 мембранных протеина, кодируемых вирусом.

Геном представлен одной односпиральной, линейной, позитивной молекулой РНК. Размер РНК флави-, пести- и гепацивирусов соответственно 11,0, 12,3 и 9,6 kb. Все вирусы семейства Flaviviridae имеют один небольшой основной капсидный протеин и два (Hepacivirus и Flavivirus) или три (Pestivirus) мембрано-ассоциированных протеина. Липиды оболочки флавивирусов имеют клеточное происхождение. Липидные компоненты пести- и гепацивирусов не идентифицированы. Углеводороды присутствуют в вирионе в виде гликолипидов и гликопротеинов.

Геномная РНК вирусов всех трех родов имеет сходную организацию. В инфицированных клетках обнаруживают мРНК. Синтез РНК происходит в цитоплазме в ассоциации с мембранами через синтез негативных промежуточных форм. Сборка вириона и приобретение оболочки происходят на внутриклеточных мембранах, после чего частицы транспортируются в секреторных цитоплазматических везикулах и высвобождаются из клетки путем экзоцитоза.

Между вирусами разных родов антигенного родства нет. Перекрестная активность в серологических тестах наблюдается на внутриродовом уровне.

Семейство флавивирусов имеет в своем составе три рода: Flavivirus, Hepacivirus, Pestivirus.

Род Flavivirus. Включает только вирус желтой лихорадки, распространяемый членистоногими переносчиками (москитами и клещами), в которых он активно размножается. Некоторые флавивирусы являются биологическими агентами зоонозов грызунов и летучих мышей, не связанных с участием членистоногих переносчиков.

Род Hepacivirus. Включает в себя патогенный для людей вирус гепатита С, который передается с контаминированной кровью или продуктами крови.

Род Pestivirus. Включает вирусы вирусной диареи крупного рогатого скота 1 (BVDV-1) и 2 (BVDV-2), а также вирус классической чумы свиней (CSFV).

Вирионы сферические, оболочечные; диаметр их 40—60 нм. На поверхности вириона различают кольцевидные субъединицы размером 10—12 нм. Структура и симметрия пока не изучена. Плавучая плотность в сахарозе 1,10—1,15 г/см^3, коэффициент седиментации 140—150S. Инфекционность вируса стабильна в пределах широкого спектра pH, но быстро снижается при воздействии растворителей и детергентов.

Геном представлен односпиральной, позитивной, линейной РНК; размер ее примерно 12,3 kb. У некоторых цитопатогенных штаммов BVDV-1 в определенных участках генома идентифицированы небольшие вариабельные интегрированные фрагменты

нуклеиновой кислоты. В состав вириона входит четыре структурных протеина и липидная оболочка.

Репродукция пестивирусов начинается рецептор-опосредованным эндоцитозом. Затем после раздевания геномная РНК служит в качестве иРНК. Субгеномных молекул мРНК нет. В ассоциации с внутрицитоплазматическими мембранами образуются репликативные формы РНК пестивирусов. Вирионы созревают во внутриклеточных везикулах и высвобождаются путем экзоцитоза. Значительное количество инфекционных вирусных частиц остается клеточно-ассоциированным. Синтез клеточных РНК и протеинов продолжается в процессе инфекции.

Пестивирусы антигенно родственны, имеют общие эпитопы, участвующие в перекрестной активности. Они инфицируют свиней и жвачных, включая крупный рогатый скот, овец, коз и диких жвачных. Пестивирусные инфекции могут протекать субклинически и сопровождаться различными клиническими состояниями, включая диарею, острый геморрагический синдром, острую фатальную болезнь. Трансплацентарное инфицирование может приводить к смерти плода или развитию пожизненной персистентной инфекции.

Большинство вирусных изолятов нецитопатогенны и создают персистентную инфекцию в культуре клеток.

2.12.1. ВИРУС ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Вирусная диарея (ВД) крупного рогатого скота — контагиозная болезнь преимущественно молодых животных, характеризующаяся эрозивными и язвенными поражениями слизистых пищеварительного тракта, ринитом, увеличением лимфатических узлов, лейкопенией, постоянной или перемежающейся диареей. У коров возможны аборты.

Впервые вирусную природу болезни установил в 1946 г. американский исследователь П. Олофсон.

Болезнь широко распространена во многих странах мира, в том числе и в России.

Восприимчив крупный рогатый скот, буйволы, олени, косули. Чаще заболевают животные в возрасте от 2 мес до 2 лет, иногда болеют коровы, особенно первого отела. У свиней описана бессимптомная естественная инфекция.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Flaviviridae, роду Pestivirus. Вирионы вируса представляют собой сферические частицы диаметром 40—60 нм, состоящие из нуклеокапсида кубической симметрии и наружной оболочки. Геном вируса содержит единую односпиральную линейную молекулу плюс-РНК.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Последовательное замораживание и оттаивание ведет к инактивации вируса.

В культуральной жидкости при минус 15 °С он активен более года, в патологическом материале сохраняется более 6 мес. Быстро инактивируется при pH — 3,0, при 37 °С погибает за 5 дней, при 56 °С — за 1 ч. Вирус чувствителен к эфиру, хлороформу, трипсину.

Антигенная структура. В состав вириона входит четыре структурных протеина: основной нуклеокапсидный протеин и три оболочечных гликопротеина. За индукцию вируснейтрализующих антител ответственны два гликопротеина оболочки вируса (E_0 и E_2).

Антигенная вариабельность. Различные штаммы вируса различаются по вирулентности, тропизму и цитопатическому действию, но они идентичны в антигенном отношении. Обнаружена тесная антигенная связь вируса диареи с вирусом классической чумы свиней и вирусом пограничной болезни овец.

Антигенная активность. В организме животных вирус индуцирует образование вируснейтрализующих, комплементсвязывающих и преципитирующих антител. Ракетным ИЭФ показано различие JgG в сыворотке плодов и телят, что указывает на то, что антитела плода не материнского, а фетального происхождения, индуцированные вирусным антигеном.

Культивирование вирусов. Все штаммы вирусов по цитопатической активности подразделяют на две группы: цитопатогенные и нецитопатогенные. Вирусы диареи размножаются в первичных культурах клеток ПЭК, тестикул быка, макрофагах и лейкоцитах, а также в перевиваемых линиях клеток МДВК, ПСЭК. В последние годы для культивирования вируса чаще используют перевиваемую линию клеток эпителия коронарных сосудов теленка (КСТ). В этой культуре клеток вирус вызывает ЦПД через 48 ч и накапливается с высоким инфекционным титром ($10^{7,5}$—$10^{8,0}$ $ТЦД_{50}$/мл). Нецитопатогенные вирусы в культуре клеток обнаруживают в РИФ. Некоторые штаммы вируса удалось адаптировать к КЭ после нескольких пассажей через желточный мешок.

Гемагглютинирующие свойства. У вируса не установлены.

Экспериментальная инфекция. Воспроизводится с характерной клинической картиной болезни на 2—6-месячных телятах при внутривенном, интраназальном, внутрибрюшинном и подкожном введении вируссодержащего материала.

При заражении per os, внутривенно и подкожно коров в разные сроки стельности вирус проникает в плод, вызывая его гибель (мумификация), аборт или рождение телят с поражением глаз, нервной системы. Заражение на 40—120-й день стельности приводит к рождению инфицированных и иммунотолерантных телят, которые не продуцируют антител и длительно выделяют вирус во внешнюю среду. Нередко позднее (в 6—18-месячном возрасте) у них развивается ярко выраженная клиническая картина с гибелью животных через 1—3 нед. Имеются сообщения о возможности экспериментального заражения овец, коз, поросят и крольчат.

Клинические признаки. На основании различий в клинических проявлениях вирусную диарею и болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота вначале рассматривали как разные болезни. Позднее была установлена идентичность возбудителей этих болезней, поэтому их считают одной инфекцией с разными клиническими проявлениями, с преимущественным развитием респираторного или диарейного синдрома. Клинические признаки болезни, тяжесть переболевания, широта распространения и летальность зависят от вирулентности вируса, чувствительности животных, наличия неблагоприятных факторов.

Заболевание может протекать остро, подостро, хронически и латентно.

При остром течении симптомы появляются внезапно. Наблюдаются высокая температура тела (до 42 °С), учащенное дыхание, кашель, гиперемия и отечность конъюнктивы, слизистых оболочек носа и рта. Отмечаются обильное слезотечение, слюноотделение и выделение из носа, лейкопения; через 1—5 дней после начала болезни появляется понос. Затем на слизистых оболочках, в том числе и во влагалище, появляются эрозии и язвы. Аналогичные изменения часто обнаруживают в области межкопытной щели. Животные быстро худеют. У коров снижается молочная продуктивность, отмечаются аборты. Телята от больных коров рождаются с признаками вирусной диареи: некроз легких, кожи, мозга, лихорадка, лейкопения, поражение ротовой и носовой полостей. Через 18—36 ч они гибнут при явлениях дегидратации.

Хроническое течение чаще наблюдают после острой вспышки болезни. Оно характеризуется длительной диареей и кахексией, иногда абортами и появлением слабого потомства.

При латентном течении симптомы болезни не выражены и о переболевании судят по наличию в организме специфических антител.

Необходимо отметить, что вирус диареи оказывает сильное иммунодепрессивное действие, поражая иммунокомпетентные клетки, это резко снижает устойчивость телят и повышает тяжесть болезни, поэтому ВД часто осложняется бактериальными инфекциями.

Патологоанатомические изменения. Характерные изменения обнаруживают на слизистых желудочно-кишечного тракта и верхних дыхательных путей. Эрозии и язвы находят на слизистых губ, щек, десен, на боковых поверхностях языка, на нёбе, у основания гортани, в сычуге и рубце. В тонком кишечнике отмечают изменения, характерные для катарального, фибринозно-некротического или геморрагического энтерита. У некоторых животных отмечают поражение глаз.

Локализация вируса. Попав в организм, вирус диареи поступает в кровеносную и лимфатическую системы и размножается во многих органах. У больных естественно-восприимчивых животных вирусный антиген обнаруживали практически во всех органах, в клетках эпителия, моноцитов и макрофагов. Переболевшие животные длительное время остаются вирусоносителями (до 200 дней).

Источники инфекции — больные и персистентно-инфицированные животные, которые выделяют вирус в окружающую среду с истечениями из носа, глаз и фекалиями, а также со слюной, мочой и спермой. У персистентно-инфицированных коров потомство всегда бывает инфицировано. Вирус обнаруживали в кишечнике новорожденных телят, которые могли заразиться внутриутробно и постнатально. Такое заражение клинически может не проявляться. Вирус выделяется со спермой как у персистентно, так и у клинически инфицированных быков. Наличие персистентно инфицированных животных поддерживает постоянные вспышки в стаде, где процент серопозитивных животных достигает более 80. Дикие животные, инфицированные вирусом, также могут быть резервуаром возбудителя.

Заражение происходит воздушно-капельным, алиментарным, а также половым путем. От коров потомству возбудитель передается путем проникновения через плацентарный барьер. В результате возникает внутриутробная инфекция плода — это один из наиболее важных путей распространения ВД.

Диагностика. Диагноз ставят, исходя из анализа эпизоотологических, клинических данных, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований. Решающее значение при этом имеют лабораторные исследования, так как сходную патологию могут вызвать вирусы парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, аденовирусной и респираторно-синтициальной инфекции, а также хламидии и другие агенты. Поэтому материал, поступивший в лабораторию, исследуют параллельно на все вышеуказанные инфекции, используя диагностические наборы, выпускаемые биологической промышленностью.

Взятие и подготовка материала. В лабораторию отправляют патологический материал от больных животных, взятый в первые 2—3 дня болезни при выраженной клинической картине или от животных, убитых с диагностической целью в острой стадии заболевания.

От больных животных берут смывы со слизистых оболочек носа, глаз и прямой кишки с помощью стерильного ватно-марлевого или поролонового тампона; соскобы с изъязвленных и эрозированных участков слизистых ротовой полости и носового зеркала; кровь в первые три дня заболевания (не менее чем от 10 животных) и через три недели от тех же животных (для получения парных сывороток).

От животных, убитых с диагностической целью, берут кусочки легких, селезенки, слизистые носовой и ротовой полости, трахеи, кишечника, регионарные лимфатические узлы и пробы крови для вирусовыделения.

Подготовка материала к исследованию описана на с. 181.

Лабораторная диагностика. Индикацию вируса в патологическом материале проводят путем обнаружения вирусного антигена в мазках-отпечатках (органов и смывов). Для этой цели в РИФ используют флуоресцирующие антитела (из диагностических наборов) к вирусам: ПГ-3, ВД, ИРТ, РС, аденовирусам подгрупп 1 и 2. Иммунофлуоресценция биопсийного материала слизистых ротовой и носовой полостей пригодна для ранней прижизненной диагностики ВД.

Для обнаружения вирусной нуклеиновой кислоты в смывах и фекалиях используют ДНК-зонд, ПЦР. Эти методы очень важны для выявления персистентной инфекции ВД у крупного рогатого скота. ПЦР успешно применяют для выявления вируса в пробах молока. Она оказалась в 14,6 раза чувствительнее других методов.

Обнаружение вируса методом биопробы на естественно-восприимчивых животных проводят очень редко — в отдельных особенных случаях. Обычно используют проверенных на отсутствие антител к ВД телят 2—6-месячного или 4—6-дневного возраста из благополучных хозяйств.

Изоляция вируса. Лабораторных животных и куриные эмбрионы для этой цели не используют. Выделяют вирус в первично-трипсинизированных культурах клеток эмбрионов крупного рогатого скота (почки, легкие, селезенка) и тестикул бычка, в которых вирус вызывает характерные цитопатические изменения: мелкозернистую инфильтрацию клеток, их округление и отторжение от стекла через 2—5 дней после заражения. Из перевиваемых культур клеток более эффективно использовать перевиваемую линию эпителия коронарных сосудов теленка (КСТ), в которой цитопатические изменения появляются почти одновременно во всех клетках монослоя.

Изолят считается выделенным в том случае, если он вызывает стабильное, однотипное ЦПД не менее чем в трех последовательных пассажах. Для обнаружения не цитопатогенных штаммов ВД проводят четвертый пассаж на культуре клеток, выращенной на покровных стеклах, с последующей постановкой РИФ. Некоторые исследователи рекомендуют для выявления таких штаммов использовать феномен экзальтации вируса ньюкаслской болезни в присутствии вируса диареи крупного рогатого скота. Сущность метода сводится к появлению цитопатических изменений в культуре клеток крупного рогатого скота при совместном культивировании вирусов ньюкаслской болезни и диареи. В контрольных культурах, где культивируют только вирус ньюкаслской болезни, изменений нет. При наличии ЦПД в культурах клеток, зараженных смешанным изолятом, и положительной РИФ проводят окончательную идентификацию вируса.

Идентификацию вируса проводят в серологических реакциях: РИФ, ИФА, РДП (менее чувствительна), РН. Кроме того,

рекомендуют применять ПЦР. Новые изоляты возбудителя ВД, не обладающие цитопатогенной активностью, могут быть идентифицированы при помощи специфической сыворотки к вирусу диареи, используемой для индикации подобных штаммов, по подавлению феномена экзальтации вируса НБ.

Ретроспективная диагностика. Проводят ее с целью обнаружения специфических антител в сыворотке крови переболевших ВД животных в РНГА, ИФА, РН, (РСК и РДП — не нашли широкого применения). При этом используют парные сыворотки крови, взятые в первые 2—3 сут болезни и через 3—4 нед. Диагностическое значение имеют обнаружение четырехкратного и большего нарастания титра антител во второй сыворотке переболевшего животного и увеличение количества серопозитивных проб. Исследуют сыворотки не менее чем от 10—15 животных.

Дифференциальная диагностика. На основании эпизоотологических, клинических данных и патологоанатомических изменений точный диагноз поставить трудно из-за сходства вирусной диареи с парагриппом-3, аденовирусной инфекцией, инфекционным ринотрахеитом, респираторно-синтициальной инфекцией, хламидиозом, ящуром, паратуберкулезным энтеритом, злокачественной катаральной горячкой и другими заболеваниями, поражающими респираторно-кишечный тракт животных. Необходимо отметить, что ВД ассоциирует с другими инфекционными болезнями, такими как ПГ-3, аденоинфекция, хламидиоз, пастереллез и др.

Иммунитет и специфическая профилактика. Вопросы иммунитета при ВД изучены недостаточно. Показано, что переболевшие животные сохраняют невосприимчивость к повторному заражению 2—3 года. Однако у них образуется нестерильный иммунитет. Такие животные длительное время являются вирусоносителями. Телята пассивный иммунитет к ВД приобретают через молозиво матери; продолжительность колострального иммунитета составляет 4—6 нед. Образование иммунитета сопровождается повышением уровня вируснейтрализующих и других антител. Вируснейтрализующие антитела образуются и у плода при заражении матери во второй половине стельности.

В нашей стране применяют инактивированную и живую вакцины. Существуют различные рекомендации их применения. Сроки и кратность прививок определяют в зависимости от вакцин, направления хозяйства, возраста животных и других условий.

Для первичной иммунизации стад, в которых вакцины раньше не применяли, желательно использовать инактивированные, безвредные для стельных коров и молодняка вакцины. В отношении живых вакцин имеются весьма разноречивые данные. Они обладают иммунодепрессивными свойствами, потенциально могут вызвать поствакцинальную болезнь, неблагоприятно воздействовать на плод. У коров, вакцинированных живой вакциной на ранней

стадии беременности, могут родиться персистентно инфицированные телята. Все это создает опасность реверсии вируса и препятствует проведению диагностических мероприятий. Применение живых вакцин, видимо, целесообразно в крупных откормочных комплексах.

Как живые, так и инактивированные вакцины для профилактики ВД постоянно совершенствуются. Большие перспективы представляют генно-инженерные субъединичные вакцины.

В большинстве стран, в том числе и в России, вакцины против ВД используют в 2-, 3- и поливалентных сочетаниях с препаратами против ПГ-3, ИРТ, РЕО, адено- и РС-инфекции, хламидиоза, лептоспироза, пастереллеза.

Профилактика инфекции заключается в индикации возбудителя болезни, удалении животных с персистирующей инфекцией и вакцинации иммунокомпетентного поголовья.

2.12.2. ВИРУС КЛАССИЧЕСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Классическая чума свиней (КЧС, чума свиней) — высококонтагиозная вирусная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, поражением кровеносной и кроветворной систем, крупозным воспалением легких и крупозно-дифтеритическим воспалением толстого кишечника.

Первые описания болезни относятся к 1810 г. в Северной Америке, к 1822 г. во Франции, к 1833 г. в Германии. Позже ее регистрировали в Южной Америке и Южной Африке. В настоящее время она встречается повсеместно, за исключением США, Канады, Австралии, Исландии, Новой Зеландии, Норвегии, Швеции. Вирусную природу КЧС установили Швейниц и Дорсет в 1903 г.

Характеристика возбудителя. Вирус классической чумы свиней (ВКЧС) — РНК-содержащий; относится к семейству Flaviviridae, роду Pestivirus. Геном вируса — односпиральная РНК положительной полярности. Он кодирует четыре структурных белка (три гликопротеина — VP1, VP2, VP3 и один капсидный белок — CP) и 3—7 неструктурных белков. Вирионы вируса диаметром 40—60 нм, с суперкапсидной оболочкой. Диаметр нуклеокапсида вириона 29 нм.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. В сыворотке крови больных животных вирус сохраняет активность при температуре 38 °С до 18—20 сут. Кипячение инактивирует его моментально. На стенах свинарников, на полях вирус остается вирулентным в течение года, а в свиных тушах при температуре минус 20—25 °С — до 6 мес. Лучшие дезинфицирующие средства для него — 2%-ный раствор NaOH, раствор хлорной извести 1 : 20 и 3—6%-ное крезоловое масло.

Антигенная вариабельность. По вирулентности различают А-, В-, С-варианты вируса. К варианту А относят вирулентные эпизоотические штаммы, вызывающие у свиней всех возрастов остропротекающую болезнь. Вирусы варианта В вирулентны только для поросят, и при циркуляции в стаде вызывают атипичную или хроническую чуму. К варианту С относится американский слабовирулентный штамм.

Антигенная вариабельность вируса не установлена. В то же время имеется антигенное различие среди штаммов ВКЧС. Установлено одностороннее родство между вирусами КЧС и диареи крупного рогатого скота: антитела к вирусу диареи нейтрализуют ВКЧС, но антитела к вирусу КЧС не нейтрализуют вирус диареи.

Антигенная активность. В сыворотке свиней-реконвалесцентов обнаруживают вируснейтрализующие и комплементсвязывающие антитела. Вируснейтрализующие антитела достигают максимума через 3—4 нед после инфицирования или иммунизации и сохраняются более года.

Культивирование вируса. В лаборатории его можно довольно легко проводить на неимунных свиньях. Однако это дорого и небезопасно. Лабораторные животные к ВКЧС невосприимчивы. В то же время возможна адаптация вируса к организму кролика.

ВКЧС удается репродуцировать в первичной культуре клеток легких, селезенки, почки, тестикул и лейкоцитов свиней, однако без выраженного ЦПД. В перевиваемой линии клеток почки поросенка (РК-15) размножение вируса сопровождается проявлением ЦПД. Для репродукции вируса оптимальной является температура 39 °С. В случае отсутствия ЦПД инфекционная активность вируса может быть определена с помощью РИФ методом флуоресцирующих бляшек, учета негативных колоний под агаровым покрытием, с помощью феномена экзальтации вируса ньюкаслской болезни. Для промышленного выращивания вируса может быть использована перевиваемая линия клеток почки эмбриона кролика (ПЭКр).

Гемагглютинирующие и гемадсорбирующие свойства. У ВКЧС они не установлены.

Клинические признаки. Инкубационный период в зависимости от вирулентности вируса и резистентности животного длится 3—9, иногда до 20 дней. Болезнь может протекать сверхостро, остро, подостро и хронически.

Сверхострое течение болезни наблюдают редко и у молодых животных. Оно характеризуется повышением температуры тела до 41—42 °С, угнетением, отсутствием аппетита и рвотой, появлением ярко-красных пятен на коже. Гибель наступает через 1—2 дня.

Острое течение помимо наблюдаемых при сверхостром течении неспецифических признаков болезни сопровождается за-

пором, затем поносом, а также слизисто-гнойным ринитом. На коже живота, внутренней поверхности бедер, шеи и в основании ушных раковин появляются пустулы, заполненные желтоватым экссудатом. Позже на коже можно видеть точечные кровоизлияния, сливающиеся затем в темно-багровые пятна и не исчезающие при надавливании. Дыхание затрудненное, учащенное; в результате сердечной недостаточности пятачок, ушные раковины, кожа живота и конечностей приобретает синюшную окраску. Развивается лейкопения. Больные животные погибают на 7—10-й день.

При остром течении болезни нередко наблюдают нервную форму с судорожными сокращениями групп мышц, манежными движениями, параличами задних конечностей, нервным возбуждением и гибелью через 1—2 дня.

Подострое течение нередко бывает после острого переболевания. При этом болезнь длится до трех недель, иногда животные выздоравливают. Состояние свиней отягощается наслоением вторичных бактериальных инфекций: сальмонеллеза и пастереллеза. В случае осложнения чумы сальмонеллезом вторичные поражения наблюдают в желудочно-кишечном тракте (кишечная форма чумы). Запор сменяется поносом. Животные худеют и гибнут.

Осложнение чумы пастереллезом ведет к развитию легочной формы чумы, сопровождаемой кашлем, признаками бронхопневмонии и заканчивающейся, как правило, гибелью животного.

Хроническое течение болезни наблюдается в течение нескольких месяцев. Проявляется оно тяжелым крупозно-дифтероидным поражением желудочно-кишечного тракта, гнойно-фибринозным воспалением легких и плевритом. Поносы сменяются запорами, прогрессирует исхудание. Температура тела повышена. Осложнение вторичными инфекциями (сальмонеллезом и пастереллезом) ведет к обострению болезни и гибели животного. Возможны аборты, мертворождаемость. Плоды заражаются через плаценту, и у поросят развивается хронически протекающая болезнь с гибелью в возрасте 1—2 мес.

Причина хронического течения чумы — размножение вирулентных штаммов в недостаточно иммунном организме, при использовании инактивированных вакцин.

Латентное течение наблюдают при внутриутробном заражении. У поросят отмечаются угнетение, конъюнктивиты, дерматиты, двигательные нарушения. Гибель наступает через 2—11 мес. На вскрытии отмечают увеличение лимфоузлов и атрофию тимуса. КЧС передается алиментарно, аэрогенно, трансмиссивно (комарами). Мертворождаемость, отставание в росте свидетельствуют о внутриутробном заражении плодов и установлении у них персистентной виремии.

Воротами инфекции чаще являются миндалины и носоглотка. В их лимфоидно-ретикулярной ткани происходят первичная ло-

кализация и размножение вируса. Через 16—24 ч вирус проникает в регионарные лимфатические узлы.

Для вируса характерна пантропность, однако он преимущественно репродуцируется и накапливается в органах, богатых лимфоидно-ретикулярными клетками (селезенка, лимфатические узлы, костный мозг, пейеровы бляшки слизистой кишечника, эндотелий кровеносных сосудов). В местах размножения вируса происходят дистрофические и некротические изменения. Патологический процесс в стенках кровеносных сосудов микроциркуляторного русла значительно повышает их проницаемость и приводит к возникновению кровоизлияний, отеков, некродистрофических и воспалительных процессов в различных тканях и органах. Появление геморрагий связывают также с нарушениями в системе свертывания крови.

В результате поражения кроветворных органов развиваются анемия и лейкопения (2500—3000 лейкоцитов/мм^3), угнетение опсоно-фагоцитарной реакции и резкое снижение бактерицидности сыворотки крови. Разрушение клеток иммунной системы в результате размножения в них вируса и повышения литической активности макрофагов снижает уровень иммунитета.

Ослабленный организм не может противостоять секундарной бактериальной микрофлоре. Развивается вторичная инфекция, которая отягощает состояние организма.

Воспалительные процессы в мозговой ткани сопровождаются появлением в ней периваскулярных инфильтратов и как следствие — нервных явлений (депрессии, возбуждения, припадков). Смерть наступает в результате поражения клеток, нарушения функции всех систем организма, особенно органов кроветворения и кровообращения.

Виремия и выделения вируса с секретами и экскретами происходят в течение всего периода болезни. У хронически больных животных вирус выделяется до трех месяцев.

Патологоанатомические изменения. При КЧС они очень разнообразны и зависят от течения болезни и наличия осложнений секундарной инфекцией. Кожа ушей, шеи, живота, внутренней стороны бедер багрово-красная с точечно-пятнистыми кровоизлияниями. Лимфатические узлы, особенно головы, шеи, мраморные на разрезе; в различных органах выраженные явления геморрагического диатеза. Кровоизлияния встречаются в корковом слое почек, в слизистой оболочке лоханки, мочеточников и мочевого пузыря. По краям селезенки часто наблюдают инфаркты. На слизистой кишечника и легких — серозно-катаральные или крупозно-геморрагические воспаления (цв. вкл., рис. 53).

При чуме, осложненной пастереллезом (грудная форма), основные изменения наблюдают в органах грудной полости: крупозно-геморрагическая пневмония, плеврит, перикардит, кровоизлияния на слизистой гортани, трахеи, в почках и кишечнике.

При чуме, осложненной сальмонеллезом (кишечная форма), болезнь протекает чаще хронически и характеризуется язвенно-некротическими процессами в глотке, миндалинах, желудке и кишечнике. Преимущественно поражаются слепая и ободочная кишки, где находят дифтеритические «бутоны» и язвы. «Бутоны» представляют собой округлые возвышения диаметром около 1 см с концентрическим слоистым строением.

Гистологические изменения при КЧС неспецифичны. В селезенке, в зоне инфаркта, отмечают некроз ткани, а вне зоны — кровоизлияния, группы незрелых клеток лимфоидного ряда. В ЦНС обнаруживают признаки негнойного лимфоцитарного энцефаломиелита.

Локализация вируса. Вирус пантропен, накапливается во всех органах и тканях, но преимущественно в лимфоузлах, костном мозге, слизистой оболочке кишечника и эндотелии кровеносных сосудов. Наибольшая его концентрация отмечается в тонзиллярных лимфоузлах.

Вирус размножается в лейкоцитах периферической крови и накапливается в крови в максимальной концентрации уже на третий день после подъема температуры тела. Он выявлен также в эпителии миндалин, подчелюстных, заглоточных, мезентериальных и других лимфоузлах, в респираторных путях и кишечном тракте, слизистой мочевого и желчного пузыря, поджелудочной, щитовидной и слюнных железах. Наивысшие титры вируса обнаруживают в период с 3-го по 7-й день болезни.

Трансплацентарная передача ВКЧС приводит к рождению клинически здоровых, но инфицированных поросят, которые в течение 4—6 мес выделяют вирус в больших количествах.

Источник инфекции — больные свиньи и вирусоносители. К КЧС восприимчивы только свиньи независимо от возраста. Особую опасность представляют свиньи с хроническим, инаппарантным и атипичным течением болезни, а также вирусоносители в инкубационном периоде болезни и реконвалесценты. Вирусоносительство сохраняется до гибели животного. Рассеивание вируса происходит с экскретами и секретами.

Главный путь распространения чумы — реализация продуктов убоя свиней-вирусоносителей. Есть данные о передаче вируса комарами. Циркуляция в природе главным образом осуществляется трансплацентарной передачей, обеспечивающей врожденную персистенцию вируса у плодов и новорожденных поросят.

Большое значение для распространения болезни имеет существование резервуаров инфекции среди диких кабанов. Передача вируса от диких свиней домашним происходит в случаях пользования ими одних и тех же кормов (корнеплодов в буртах, соломы в скирдах). Заражению же диких кабанов способствует несоблюдение ветеринарно-санитарных правил в неблагополучных по КЧС хозяйствах (отсутствие скотомогильников, убойных площадок).

Природная очаговость КЧС определяется активным расселением кабанов. Распространению вируса способствует миграция отдельных кабанов на расстояние до 20 км в день, поэтому необходим регулярный эпизоотологический надзор за дикими кабанами.

Чума свиней не имеет сезонности и периодичности. При заносе вируса протекает она в виде эпизоотий. В свежих очагах при наличии неиммунного поголовья через 10—14 дней заболевают почти все. В случае заноса вируса с инфицированным кормом поголовное заболевание наблюдают через 2—3 дня. Заболеваемость составляет 95—100 %, летальность — 60—100 %.

Диагностика. Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований. Частая вакцинация свиней против чумы создает иммунный фон, который влияет на клинико-эпизоотологические характеристики болезни, поэтому только лабораторная диагностика позволяет установить правильный диагноз.

Патологическим материалом для лабораторной диагностики служат полученные от больных животных пробы крови, взятой с антикоагулянтом, и от вынужденно убитых животных или трупов — кусочки селезенки, миндалин, лимфатических узлов, почек, легких, поджелудочной железы, грудная кость.

Лабораторная диагностика. Обнаружение вирусной нуклеиновой кислоты. Методы ПЦР и ДНК-зонда позволяют дифференцировать пестивирусы (КЧС и вирусы диареи КРС).

ПЦР. Выделяют рибонуклеиновую кислоту из образцов тканей животных фенольным методом, подвергают обратной транскрипции и амплифицируют. Метод обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

ДНК-зонд. В качестве гибридизационного зонда используют комплементарную ДНК к участку гена белка Р125, меченную ^{32}P.

Обнаружение вирусного антигена (белка).

РИФ. Из лейкоцитарного концентрата проб крови больных или подозрительных по заболеванию животных, а также из костного мозга грудной кости делают мазки, а из их органов — срезы. На наличие вируса КЧС указывает специфическое свечение цитоплазмы. Следует иметь в виду, что вакцинный вирус сохраняется в организме свиней до 15 дней после вакцинации и в этот период не дифференцируется в РИФ от полевого вируса.

РНГА с антительным эритроцитарным диагностикумом. Вирус считается обнаруженным при наличии гемагглютинации в суспензии из патологического материала в разведениях не менее чем 1 : 8.

ИФА. В иммуноферментных конъюгатах используют иммуноглобулины баранов, инфицированных ВКЧС. Метод позволяет при постмортальной диагностике выявлять вирус со 100%-ной эффективностью без предварительного биологического накопления. Обнаруживают вирус также в культуре клеток и в объектах ветеринарного надзора (зерне, почве, воде). На основе моноклональных антител разработана тест-система, позволяющая дифференцировать вакцинный и полевые штаммы ВКЧС, а также вирус диареи КРС.

РДП слабочувствительна, дает положительный результат в 50 % случаев.

РИОЭФ (реакция иммуноэлектроосмофореза), в которой антигены и антитела движутся строго навстречу друг другу под действием электрического поля. РИЭОФ значительно чувствительнее, чем РДП, и скорее (за 30 мин) выявляет вирус в мезентериальных лимфоузлах и суспензии ткани поджелудочной железы.

Обнаружение вируса биопробой. Биопробу при диагностике КЧС ставят в сомнительных случаях. Она позволяет, с одной стороны, обнаружить ВКЧС, с другой — дифференцировать его от сходно протекающей африканской чумы свиней. Биопробу ставят по схеме иммунологической биопробы.

Из благополучного по инфекционным болезням хозяйства берут иммунизированных и неиммунизированных против КЧС поросят в возрасте 2—3 мес массой 20—30 кг. В качестве материала для заражения используют 10%-ную суспензию органов (селезенки, лимфоузлов, костного мозга) или кровь от павших животных. Материал вводят подкожно. Диагноз на КЧС считают установленным, если неиммунизированные животные на 2—5-й день заболевают и в течение 7—10 дней погибают, а иммунизированные остаются здоровыми. Если же в результате заражения заболевают и иммунизированные животные, то имеются основания для установления африканской чумы свиней, что должно быть подтверждено выделением вируса и его идентификацией.

Выделение вируса проводят на перевиваемой линии культуры клеток РК-15 (почки поросенка), выращенной на покровных стеклах в пробирках. Вирус КЧС в культуре клеток РК-15 не вызывает ЦПД; поэтому индикацию его проводят методом РИФ.

Идентификацию вируса проводят с помощью серологических реакций РИФ и РНГА.

Ретроспективная серологическая диагностика. В настоящее время в лабораторной диагностике используют три метода обнаружения специфических к вирусу КЧС антител:

твердофазный непрямой вариант ИФА. Метод легок в выполнении, дешев, высокочувствителен и рекомендован к использованию при крупномасштабных обследованиях;

непрямой метод РИФ;

РН в сочетании с РИФ. РН ставят в культуре клеток РК-15, выращенной на покровных стеклах в пробирках. Учет реакции проводят через 48 ч. Присутствие вируса обнаруживают в люминесцентном микроскопе — видны флуоресцирующие фокусы (бляшки), состоящие из 20—30 инфицированных клеток. Присутствие антител нейтрализует вирус и вызываемый им эффект. Поэтому реакцию часто называют РНФБ (РН флуоресцирующих микробляшек). Реакция очень трудоемка.

Дифференциальная диагностика. КЧС необходимо отличать от африканской чумы свиней, болезни Ауэски, вирусной диареи, парагриппа и бактериальных инфекций (пастереллеза, сальмонеллеза, рожи).

При африканской чуме свиней все клинические и патологоанатомические признаки выражены ярче. Для дифференциации ставят иммунологическую биопробу. Вирусную диарею у инфицированных свиней устанавливают с помощью ПЦР. Другие предполагаемые вирусные болезни свиней исключают вирусологическими исследованиями.

Бактериальные инфекции дифференцируют по эпизоотологическим особенностям (возрастная чувствительность), клиническим и патологоанатомическим признакам, результатам бактериологических исследований и эффективности лечения антибиотиками.

Иммунитет и специфическая профилактика. Животные-реконвалесценты приобретают стойкий иммунитет, продолжающийся несколько лет. Пассивный иммунитет непродолжителен — до 10—12 дней.

Иммунитет при КЧС обусловлен вируснейтрализующими антителами. Однако формирование резистентности к заражению вакцинированных свиней происходит до выявления вируснейтрализующих антител. Вероятно, вирус нейтрализуется клетками, в частности естественными киллерами и цитотоксическими лимфоцитами.

С 1980 г. специфическая профилактика КЧС с успехом осуществляется живыми вакцинами из штаммов К и ЛК-ВНИИВВиМ. С помощью живой вакцины ЛК-ВНИИВВиМ можно создавать специфическую защиту от заболевания свиней уже через 48 ч после однократного внутримышечного ее введения. Новорожденных поросят вакцинируют перорально тотчас после рождения до приема молозива. Получена живая вакцина для пероральной иммунизации диких кабанов. Инактивированные вакцины в настоящее время не применяют. Разработаны генно-инженерные вакцины против КЧС, но и они пока не имеют широкого применения.

Лечение поросят осуществлялось гипериммунными сыворотками с различной эффективностью, что зависело от стадии болезни в момент серотерапии.

Разработан эффективный фармакокомплекс препаратов «Анти-КЧС», позволяющий добиваться лечебного эффекта в 100 % случаев при применении не позднее чем за четверо суток до гибели животного.

23—7291

2.13. СЕМЕЙСТВО РЕОВИРУСОВ

Семейство Reoviridae (от первых букв английских слов respiratory enteric orphan viruses) — большая группа вирусов, поражающая позвоночных, насекомых и растения.

Вирионы реовирусов сферической формы, диаметром 60—70 нм, с двойным капсидом — наружным и внутренним, кубического типа симметрии; суперкапсидной оболочки нет.

Геном представлен двуспиральной фрагментированной (10—12 сегментов) линейной РНК. Вирион содержит транскриптазу (РНК-зависимую РНК-полимеразу). Внутренний капсид и геномная РНК составляют сердцевину вириона.

В вирионах реовирусов обнаружено 6—10 полипептидов с молекулярной массой 15—155 кД. Некоторые белки гликозилированы. Липиды в составе вирионов не выявлены. Реовирусы содержат 78—86 % белка и 14—22 % РНК.

Реовирусы репродуцируются в цитоплазме клетки с образованием характерных цитоплазматических включений, содержащих РНК, вирусные белки, зрелые и незрелые вирусные частицы.

Размножаются вирусы в цитоплазме инфицированных клеток. Вирионы вирусов адсорбируются на клетке (с помощью прикрепительного белка — сигма) и проникают путем эндоцитоза в цитоплазму клетки, где под влиянием ферментов лизосом происходят частичная депротеинизация, разрушение наружного капсида, освобождение сердцевины. Ферменты сердцевины инициируют продукцию иРНК, используя в качестве матрицы минус-нить РНК. С каждого фрагмента геномной РНК считывается индивидуальная иРНК.

Все 10 видов иРНК связываются с рибосомами и обеспечивают синтез структурных и неструктурных вирусспецифических белков. Плюс-РНК является иРНК, она в составе субвирусных частиц (внутри капсида) является матрицей для образования новых двуспиральных РНК. Вирионы реовирусов формируются в цитоплазматических «фабриках», расположенных около ядра. Вирусы выходят при лизисе клетки.

При пассировании реовирусов в клеточных культурах с высокой множественностью заражения образуются дефектные инфекционные частицы, в которых отсутствуют 1—2 фрагмента РНК.

Биологические особенности реовирусов зависят от их родовой принадлежности. Некоторые вирусы репродуцируются только в позвоночных определенных видов и передаются между хозяевами алиментарно или аэрозольно. Другие вирусы позвоночных (орби- и колтивирусы) репродуцируются как в позвоночных, так и в беспозвоночных (москиты, клещи, комары и т. д.). Вирусы растений реплицируются как в растениях, так и в членистоногих.

Генетическая рекомбинация между различными реовирусами в пределах рода происходит очень эффективно. В основе механизма рекомбинации лежит перераспределение (реассортация) фрагментов РНК.

Семейство Reoviridae включает девять родов: Orthoreovirus, Orbivirus, Rotavirus, Coltivirus, Aquareovirus, Cypovirus, Eijivirus, Phytoreovirus, Oryzavirus.

В ветеринарной практике имеют значение вирусы трех первых родов этого семейства.

Род Orthoreovirus (от греч. orthos — правильный). Прототипный вирус — ортореовирус млекопитающих. Среди вирусов этого рода отмечается специфичность по отношению к естественным хозяевам (человеку, крупному рогатому скоту, овцам, свиньям, птицам, бабуинам и др.). Ортореовирусы распространяются алиментарно и аэрозольно, членистоногих переносчиков нет. У человека они, как правило, авирулентны, но могут вызывать заболевание верхних дыхательных путей и энтерит у детей. У домашних животных инфекция сопровождается поражением дыхательных путей и диареями. Птичьи ортореовирусы не инфицируют млекопитающих. Исход болезни у птиц варьирует от инаппарантной формы до гибели, что зависит от штамма вируса и возраста птицы. У цыплят болезнь может проявляться нарушением оперения, гастроэнтеритами, гепатитами, миокардитами, пневмониями, слабым ростом и гибелью.

Род Orbivirus (от лат. orbis — кольцо). Прототипный вирус — вирус блютанга. Орбивирусы инфицируют широкий спектр позвоночных, включая жвачных, однокопытных, птиц, грызунов, летучих мышей, приматов и человека. Репродуцируются в членистоногих (комары, москиты, клещи др.), которые являются основным фактором их распространения. Инфекция у членистоногих не проявляется или проявляется очень незаметно. У позвоночных она может варьировать от инаппарантной до фатальной, в зависимости от вида вируса и животного-хозяина.

К данному роду относятся вирус блютанга, или вирус катаральной лихорадки овец (24 серотипа). На территории России крайне редко регистрируют вирус африканской чумы лошадей (9 серотипов), вирус эпизоотической геморрагической болезни оленей (8 серотипов), вирус энцефалоза лошадей и др.

Род Rotavirus (от лат. rota — колесо). Под электронным микроскопом вирионы напоминают колесо, поэтому они и получили такое название. Прототипный вирус — ротавирус А. Все вирусы этого рода по наличию группоспецифического антигена, обусловленного белком внутреннего капсида (VP6), подразделяются на семь видов: A, B, C, D, E, F, G. Ротавирусы вида А обнаружены у млекопитающих многих видов и птиц; вида В — у человека, крупного рогатого скота, свиней, овец, крыс; вида С — у человека, крупного рогатого скота, свиней; вида Е — у свиней; виды D, F, G — у птиц. Белки наружного капсида ротавирусов ответственны за адсорбцию, проникновение вируса в клетку и индукцию вируснейтрализующих антител.

Ротавирусы являются этиологическими агентами острых гастроэнтеритов новорожденных животных различных видов, а также детей раннего возраста.

Род Coltivirus (от англ. Colorade tick fever). Прототипный вирус — вирус колорадской клещевой лихорадки. Колтивирусы были выделены от нескольких видов млекопитающих (включая человека), а также от клещей, москитов и комаров.

Род Aquareovirus (от лат. aqua — вода). Прототипный вирус — аквареовирус А. Аквареовирусы были выделены от позвоночных животных (рыб разных видов, устриц, моллюсков и др.), обитающих в пресной и соленой воде.

Род Cypovirus (от англ. Cytoplasmic poliherosis). Включает вирусы цитоплазматического полиэдроза тутового шелкопряда Bombyxmori (прототипный вирус) и многих насекомых отрядов двукрылых, чешуекрылых и перепончатокрылых. Официально зарегестрировано 14 видов этого рода.

Роды **Eijivirus, Phytoreovirus** и **Oryzavirus** включают реовирусы растений.

2.13.1. РОТАВИРУС ДИАРЕИ НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ

Ротавирусная диарея новорожденных телят — остропротекающая контагиозная болезнь, характеризующаяся поражением желудочно-кишечного тракта.

Заболевание широко распространено во всех географических районах земного шара. В СССР в 1976 г. было впервые сообщено об обнаружении ротавирусов в фекалиях телят с признаками диареи (О. В. Богатыренко и др., 1976).

Заболевание наносит значительный экономический ущерб в связи с гибелью животных, замедлением роста и развития телят, затратами на лечение, организацию и проведение оздоровительных мероприятий. Предполагают, что ротавирус вызывает до 60—100 % случаев заболеваний телят к 25 % общего числа погибших телят.

В естественных условиях болеют телята первых двух недель жизни. Некоторые авторы наблюдали диарею, вызванную ротавирусом, у телят вплоть до 4-недельного и даже 6—7-недельного возраста. О спектре патогенности ротавируса крупного рогатого скота можно косвенно судить по выявлению вируснейтрализующих антител у животных различных видов. Частота положительных находок у животных каждого вида колеблется от 30 до 100 %. Высокие титры антител (до 1 : 250) характерны для лошадей, овец, свиней и телят. Результаты серологических исследований свидетельствуют о широком распространении ротавирусной инфекции.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Reoviridae, роду Rotavirus. Название «ротавирус» (от лат. rota — колесо) вирионы получили за свою форму: при электронной микроскопии они напоминают маленькие колеса с широкой ступицей, короткими спицами и тонким четко выделенным ободком.

Вирионы — это икосаэдрические частицы диаметром 60—80 нм. Состоят из сердцевины, содержащей двуспиральную РНК и внутренние белки, и двойного капсида — наружного и внутреннего. Суперкапсидной оболочки нет. Встречаются частицы, лишенные наружного капсида, а также пустые частицы без сердцевины; и те и другие не обладают инфекционностью. Геном вируса состоит из 11 уникальных фрагментов двуспиральной РНК. Вирусы размножаются в цитоплазме клетки.

Представители рода ротавирус являются возбудителями диареи многих видов животных (крупного рогатого скота, овец, лошадей, собак, кроликов, мышей и др.), а также человека.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус не чувствителен к хлороформу, эфиру, фреону, устойчив к pH 3,0 и относительно резистентен к тепловому воздействию. Его не удается полностью инактивировать при 60 °С в течение 30 мин. В фекалиях при комнатной температуре вирус сохраняет свои свойства в течение 7 мес. Формалин (10%-ный) и лизол (5%-ный) в течение 2 ч инактивируют вирус.

Антигенная структура. В сердцевине вируса локализовано три белка (VPI, VP2 и VP3), внутренний капсид содержит белок VP6, наружный капсид построен из белков VP7 и VP4. Белки наружного капсида вируса играют основную роль в возникновении инфекционного процесса и развитии иммунитета. Они ответственны за осуществление ранних этапов взаимодействия вирионов с чувствительными клетками — адсорбцию и проникновение, с ними связывают вирулентность ротавирусов. Эти же белки (VP7 и VP4) вызывают образование специфических вируснейтрализующих антител. Они ответственны за иммуногенность ротавирусов.

Антигенная вариабельность. Ротавирусу крупного рогатого скота присуща значительная вариабельность вирулентности и антигенности. Все вирусы человека и животных по наличию группоспецифического антигена, обусловленного белком внутреннего капсида VP6, подразделяются на семь групп (A, B, C, D, E, F, Y) и выявляются в РСК, РДП, РИФ, ИЭМ. Большинство ротавирусов входят в группу А — типичные ротавирусы.

По наличию типоспецифических антигенных детерминант на белках наружного капсида VP7 и VP4 ротавирусы группы А подразделяются на несколько серотипов. Известно три серотипа возбудителя у крупного рогатого скота и, кроме того, у него выявлены антитела к трем серотипам ротавируса человека. Впервые серологическая связь между ротавирусом телят и человека была показана в 1974 г.

Заражение разными серотипами ротавируса крупного рогатого скота не сопровождается перекрестной защитой. Реинфекция те-

лят даже через 4 нед после перенесенной диареи другим серотипом вируса приводит к повторному заболеванию.

Антигенная активность. При естественном и экспериментальном заражении вирус индуцирует образование вируснейтрализующих, комплементсвязывающих, преципитирующих антител, которые выявляют в РН, РСК, РДП, РНИФ и др.

В организме, пораженном ротавирусом, главную роль играют антитела, продуцируемые слизистой кишечника. Показано, что в кишечнике антитела появляются между третьим и двенадцатым днями, а в фекалиях — между четвертым и восемнадцатым днями после инфицирования телят ротавирусом. У разных телят наблюдается значительное различие в сроках и количестве продукции кишечных антител. В жидкости из тощей кишки выявляли антитела классов IgM, IgY, IgG. Установлено, что иммуноглобулины могут пассивно передаваться плоду через неповрежденную плаценту, поэтому антитела против ротавируса обнаруживают в сыворотке эмбриона крупного рогатого скота.

Культивирование вируса. Ротавирус крупного рогатого скота трудно культивируется в культуре клеток. Показана возможность адаптации вируса к ряду культур клеток как первичных (клетки легких и почек эмбриона коровы, ягненка, теленка, обезьян и др.), так и перевиваемых (МДВК, L, Vero и др.). Большинство исследователей считают, что лучшей культурой является почка эмбриона коровы или кишечник плода коровы. Вирус вызывает специфические ЦДП — появление очагов серповидных клеток. Эпителиоподобные клетки более чувствительны к ротавирусу по сравнению с фибробластоподобными.

Установлено, что обработка вируссодержащей суспензии трипсином облегчает выделение ротавируса и его адаптацию к культуре клеток. Оптимальный эффект достигается при контакте вируса с трипсином (30 мин при 22—37 °С) и добавлении в поддерживающую среду трипсина (5—10 мкг/мл). Титр вируса повышается в 10—1000 раз. Полагают, что механизм этого феномена обусловлен диспергирующим действием фермента на вирусные агрегаты, повышением проницаемости клеточных мембран, а также инактивацией интерферона. Кроме того, при вирусовыделении трипсин способствует удалению антител, присутствующих в фекалиях. Некоторые штаммы способны образовывать бляшки в культуре клеток под агаром.

Гемагглютинирующие свойства. Опубликованы данные о гемагглютинирующей активности некоторых штаммов ротавируса. Гемагглютинирующая активность вируса обусловлена наличием на поверхности полноценных частиц вируса гемагглютинина, который очень нестабилен, при 22 °С его активность снижается на 50 % за 24 ч. Наивысшие титры получены с эритроцитами морской свинки и человека группы 0.

Гемадсорбирующие свойства не установлены.

Интерфероногенная активность. Инокуляция в культуру клеток интактного или инактивированного УФ-лучами ротавируса вызывала образование в клетках интерферона. Заражение новорожденных телят ротавирусом сопровождается продукцией интерферона.

Экспериментальная инфекция. При экспериментальном заражении телят, лишенных молозива, и гнотобионтов диарея развивается обычно через 18—24 ч после орального введения им вируса. При заражении телят, получивших молозиво, наблюдали слабовыраженные признаки болезни. Удалось вызвать заболевание телят-гнотобионтов 10-недельного возраста и даже в возрасте 14—17 мес. Вирус в фекалиях зараженных телят появляется через 1—2 дня и выделяется в течение месяца. Вируснейтрализующие антитела в крови обнаруживают на 7-й день, и максимума их количество достигает через 4 нед после заражения.

Долгое время вирус, выделенный у человека, считали апатогенным для телят. Однако С. А. Мебус с сотр. в 1976 г. воспроизвел диарею у телят-гнотобионтов, заразив их ротавирусом, выделенным у больных гастроэнтеритом детей младшего возраста. Ротавирусы крупного рогатого скота и человека патогенны и для поросят.

Клинические признаки. Инкубационный период болезни зависит от возраста и иммунологического состояния теленка и составляет от 14 до 72 ч. Болеют телята в возрасте 1—12 дней. Клинически болезнь характеризуется депрессией, потерей аппетита и наличием водянистого соломенно-желтого поноса со слизью. Температура тела иногда поднимается до 41 °С. Если инфекция не осложняется E. coli, то через 2—3 дня телята выздоравливают. Обычно животные болеют 1—8 сут, а в некоторых случаях до 15 дней. Чем моложе теленок, тем дольше наблюдается диарея. Тяжесть заболевания зависит от степени вирулентности штаммов вируса и резистентности животных. Большую роль играют условия содержания и кормления. Ротавирусы, повреждая эпителий кишечника, способствуют проникновению кишечной палочки и тем самым осложняют заболевание. Особенно тяжело болезнь протекает в хозяйствах, где животные поражены рота- и коронавирусами. В таких хозяйствах погибает до 75 % заболевших животных. Большинство исследователей считают, что неосложненная ротавирусная инфекция протекает легко.

Патологоанатомические изменения. Основные изменения наблюдаются в тонком кишечнике, в котором вирус поражает цилиндрические эпителиальные клетки ворсинок. Размножаясь в этих клетках, он вызывает их гибель и десквамацию, что приводит к нарушению процессов переваривания и всасывания. При микроскопическом исследовании находят уменьшение кишечных ворсинок, прогрессирующее замещение эпителия кубическими клетками. Верхушки ворсинок часто обнажаются, увеличивается количество ретикулоподобных клеток. В отдельных участках ки-

шечника полностью исчезают ворсинки. У переболевших животных патологические изменения в кишечнике исчезают через 8—10 сут.

Локализация вируса. Ротавирус обнаруживают в кишечнике (в основном в тонком отделе), в мезентериальных лимфатических узлах и легких. Пораженные вирусом клетки кишечника выделяются с фекалиями в первые 4—5 ч от начала диареи и обычно в течение 2—3 дней. Удавалось выделить вирус из фекалий клинически здоровых телят через 30—49 дней после болезни.

Источник инфекции — больные телята и вирусоносители. Из 1 г фекалий больных телят выделяют 10^9—10^{10} вирусных частиц. Выделение вируса с фекалиями продолжается до трех недель. Возможно скрытое течение диареи ротавирусной этиологии, а также реинфекция ротавирусами телят более старшего возраста.

Основной путь передачи инфекции — алиментарный: при контакте с больными, а также через обслуживающий персонал и инфицированный инвентарь. Вопрос о прохождении ротавируса через плаценту коров остается открытым, так как получены противоречивые данные. Видимо, заражение телят возможно в момент отела и при совместном содержании их с матерью.

Диагностика. Предварительный диагноз ставят на основании эпизоотологических, клинических и патологоанатомических данных. Окончательный диагноз устанавливают лабораторными методами. При диагностике кишечных заболеваний необходимо обследовать животных на наличие нескольких патогенных агентов. Так, например, показано, что в 93 % случаев причиной диареи были рота- и коронавирусы: в 25 % — только ротавирусы; в 24 % — только коронавирусы; в 13 % — одновременно рота- и коронавирусы, а в 38 % — одновременно бактерии, рота- и коронавирусы.

Взятие и подготовка материала. В лабораторию направляют не менее 10 проб жидких фекалий, взятых в первые (1—3) дни болезни, фрагмент тонкого кишечника с содержимым, полученный не позднее 1—2 ч с момента гибели или вынужденного убоя телят. Для серологического исследования направляют 10—15 проб парных сывороток крови от больных животных и не менее 10 проб сыворотки крови коров и 10 проб молозива. Материал направляют в термосе с охлаждающей смесью.

Для вирусологических и электронно-микроскопических исследований готовят 10%-ную суспензию фекалий на растворе Хенкса, гомогенизируют, центрифугируют (1 ч при 3000 $мин^{-1}$), надосадочную жидкость обрабатывают антибиотиками, выдерживают 10—16 ч при 4 °С и исследуют.

Лабораторная диагностика. Индикацию вируса в патологическом материале проводят путем:

обнаружения вирионов ротавируса методом электронной и иммуноэлектронной микроскопии;

обнаружения вирусного антигена с помощью РИФ, ИФА, ВИЭФ, РДП, РСК. Предложены и другие методы, такие, как реакция латексагглютинации (РЛА), а также метод с использованием специфических антител, фиксированных на белке А золотистого стафилококка;

обнаружения вирусной нуклеиновой кислоты методом точечной гибридизации, ПЦР.

Изоляцию вируса из патологического материала в диагностических лабораториях обычно не проводят, так как лабораторные животные и куриные эмбрионы нечувствительны к вирусу, а выделение ротавируса в культурах клеток требует предварительной адаптации и проведения дополнительных манипуляций: применение трипсина или центрифугирование вируса на слое клеток. Наличие вируса в культурах клеток проверяют методом РИФ или электронной микроскопии.

Идентификацию вируса проводят в указанных выше серологических реакциях.

Ретроспективная диагностика. Для этой цели парные сыворотки крови исследуют в серологических реакциях РСК, РТГА (с эритроцитами человека группы 0 или морской свинки), непрямой РИФ, РН. Некоторые исследователи считают, что серологические исследования сывороток крови телят имеют весьма ограниченную ценность, так как в течение первых недель жизни не удается обнаружить прирост титра антител, несмотря на прошедшую болезнь. Для установления общего иммунного состояния стада до и после вакцинации определенное практическое значение имеет исследование сывороток и молозива коров. Уровень антител можно определить с помощью РН при наличии в лаборатории адаптированного к культуре клеток штамма ротавируса телят.

Дифференциальный диагноз. Ротавирусную инфекцию у новорожденных телят следует дифференцировать от коронавирусной инфекции, колибактериоза и диареи алиментарного происхождения.

Иммунитет и специфическая профилактика. При ротавирусной инфекции иммунитет изучен недостаточно. Установлено, что наличие антител в сыворотке крови не играет существенной роли в обеспечении защиты против ротавирусной инфекции. Гуморальные антитела только облегчают течение естественного заболевания.

Большое значение имеет местный иммунитет, возникающий при контакте вируса с клетками кишечного эпителия. У новорожденных животных защитную роль играют антитела, полученные с молозивом. Относительно в высоком титре обнаруживают антитела к ротавирусам непосредственно после отела (в молозиве 1 : 320—1 : 240, в крови 1 : 20—1 : 80), но их количество в молоке быстро снижается уже в течение первых суток; через 4—6 дней они не выявлялись. Иммунитет после скармливания молозива

связан с антителами, остающимися в просвете кишечника, а не с антителами, всосавшимися в кровь. Поэтому телята, сосущие иммунную мать, поражаются к 5-дневному возрасту. Рекомендуется молозиво консервировать путем замораживания и скармливать телятам в первые недели жизни. Титр антител в сыворотке крови, молозиве и молоке многих нетелей относительно низок, поэтому их телята поражаются чаще и болеют тяжелее.

Специфическая профилактика ротавирусной инфекции крупного рогатого скота находится в стадии разработки и испытания. Создаются и проверяются инактивированные и живые вакцины. Предпочтение отдается инактивированным вакцинам. Защита телят через молозиво и молоко бустеризованных коров представляется более надежной, чем вакцинация самих телят. Кормление телят молозивом от матерей, ранее иммунизированных инактивированной вакциной, предотвращает появление диареи новорожденных.

Бельгийские ученые предложили для продления секреции специфических антител в молозиве и молоке до 20 дней вводить отелившимся коровам адъювант, что усиливает секреции антител в молоке только против вирусов, которые были в организме коровы. Если у коров не было вирусов, обусловливающих диарею телят, то матерей до или во время стельности необходимо обработать вакциной.

В настоящее время считают, что более эффективна иммунизация матерей перед отелом с последующей подкормкой телят молозивом.

2.14. СЕМЕЙСТВО АРТЕРИВИРУСОВ

Семейство Arteriviridae имеет всего один род — Arterivirus. В него входят вирусы артериита лошадей (прототипный вирус), респираторно-репродуктивного синдрома свиней, геморрагической лихорадки обезьян и подъема лактатдегидрогеназы.

Вирионы сферические, диаметром 45—60 нм. Состоят из изометрического нуклеокапсида диаметром 25—35 нм, окруженного липидной оболочкой. Наблюдается определенный поверхностный профиль.

Плавучая плотность в сахарозе 1,13—1,17 г/см^3, коэффициент седиментации — 230S. Вирус хорошо сохраняется при температуре минус 70 °С и pH 6,0—7,5; теряет инфекционную активность под воздействием жирорастворителей (эфира, хлороформа) и детергентов.

Геном представлен одной односпиральной, линейной, позитивной молекулой РНК; размер 12,7—15,7 kb. Вирусный нуклеокапид сформирован одним основным нуклеокапсидным протеином. Артеривирусы кодируют два крупных неструктурных полипротеина, которые разрезаются вирусными протеазами до зрелых протеинов. Имеется липопротеидная оболочка клеточного происхождения.

В клетку вирионы проникают путем эндоцитоза. Артеривирусы реплицируются в цитоплазме инфицированных клеток. Нуклеокапсид почкуется внутрь гладкого эндоплазматического ретикулума и (или) везикулы аппарата Гольджи.

Высвобождение вирионов из клеток происходит путем экзоцитоза.

Первичными клетками-мишенями для артеривирусов являются макрофаги. Репликация артеривирусов характеризуется формированием в индуцированных клетках спаренных мембран и двухмембранных везикул.

Аминокислотная идентичность по нуклекапсидным протеинам вируса артериита лошадей и трех других артеривирусов варьирует в пределах 22—33,3 %. Все четыре вида вируса антигенно различны. Больше всего отличается от других вирус артериита лошадей.

Организация генома и стратегия репликации у представителей семейства Arteriviridae сходны с таковыми у представителей семейства Coronaviridae.

Перекрестной антигенной реактивности между артеривирусами не обнаружено.

Артеривирусы передаются горизонтально (вирусы артериита лошадей и вирус респираторно-репродуктивного синдрома свиней) и вертикально, т. е. внутриутробно (вирус респираторно-репродуктивного синдрома свиней).

Инфекции могут протекать остро или бессимптомно. При этом наблюдают болезни респираторных органов, аборты, фатальный полиомиелит или фатальную геморрагическую лихорадку.

2.14.1. ВИРУС АРТЕРИИТА ЛОШАДЕЙ

Вирусный артериит лошадей (ВАЛ, эпизоотический целлюлит, острая септицемия, острое воспаление легких, инфекционный артериит, «розовый глаз») — остропротекающая инфекционная болезнь, характеризующаяся конъюнктивитом, гиперемией слизистых оболочек, некротическим поражением малых артерий и вен, отеками живота и конечностей, у кобыл — абортами.

Характеристика возбудителя. Возбудитель ВАЛ входит в семейство Arteriviridae, род Arterivirus. Вирионы размером около 60 нм, сферической формы. Тип симметрии кубический, некоторые из них имеют хвостоподобные выступы. Состоят из нуклеокапсида и липидсодержащей суперкапсидной оболочки клеточного происхождения, на поверхности которой имеются выступы длиной 12—15 нм.

В основном вирион обладает свойствами, описанными для всех представителей семейства Arteriviridae.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус чувствителен к эфиру, низким значениям pH, нагреванию. В инфицированных тканях при минус 20 °С вирус сохраняется до 6 лет, но быстро погибает при высоких температурах (при 37 °С за 2 суток).

Антигенная активность и антигенная вариабельность. У животных-реконвалесцентов обнаруживают вируснейтрализующие и комплементсвязывающие антитела. В настоящее время различают шесть серотипов вируса. Установлено антигенное родство возбудителя ВАЛ с вирусом катаральной лихорадки овец.

Экспериментальная инфекция. Воспроизводилась только на жеребятах и жеребых кобылах. Мелкие лабораторные животные и куриные эмбрионы не чувствительны к данному вирусу.

Культивирование вируса. При первичном выделении его можно размножать на культуре клеток почки лошади. Адаптированные штаммы размножаются в культуре клеток и других животных (почках кролика, обезьяны, хомяка).

Клинические признаки. Болезнь протекает остро. Инкубационный период длится 1—5 дней, а у жеребых кобыл 10—33 дня после экспериментального заражения. Болезнь характеризуется повышением температуры тела, гиперемией слизистых оболочек, слезотечением, серозными выделениями из носа, отеками век, конечностей, живота. У больных лошадей наблюдают светобоязнь, помутнение роговицы, кашель, затрудненное дыхание, беспокойство, шаткую походку. Жеребые кобылы абортируют. Основной клинический признак болезни — септицемия и высокая летальность.

Патологоанатомические изменения. Обнаруживают множественные кровоизлияния на плевре и слизистых серозных оболочках полостей, отек легких, катаральный и катарально-геморрагический энтерит и колит. В селезенке находят кровоизлияния, инфаркты, в печени и почках — дегенеративные изменения.

У абортированных плодов заметны геморрагии на конъюнктиве, слизистых оболочках носовой и ротовой полостей, желудочно-кишечного тракта, трахее, плевры.

Гистологическими исследованиями находят некротические очаги, локализованные в мышечном слое мелких артерий. Чаще микроскопические изменения в стенках сосудов выявляют в ободочной кишке, селезенке, лимфоузлах. В подслизистой оболочке кишечника обнаруживают тромбозы сосудов, инфаркты.

Вирус проникает через слизистые оболочки и с кровью разносится по организму, интенсивно размножается в селезенке и стенке вен. Здесь наблюдаются инваскулиты. Позже, примерно на 10-й

день после заражения, поражаются стенки артерий. В этот период активно синтезируются антитела, и возможность изменения стенок артерий связана с иммунной реакцией организма. Размножение вируса в стенках артерий ведет к накоплению его в тканях мозга, паренхиматозных органах, в крови и лимфоузлах.

Локализация вируса. Вирус содержится в тканях мозга, селезенки, почек, легких, бронхиальных и мезентериальных лимфоузлов и в сыворотке крови в течение 18 дней с момента заражения. У плодов он содержится в легких и селезенке. Может быть выделен из спермы и гепаринизированной крови. Выделение вируса происходит с истечениями из носа, глаз, а также с калом.

Источник инфекции — больные лошади. Заражение происходит аэрогенно, контактно и алиментарно. В естественных условиях восприимчивы только однокопытные независимо от пола и возраста.

Диагностика. Диагноз на ВАЛ ставят исходя из эпизоотических данных, клинических признаков болезни, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований.

Лабораторная диагностика. Включает в себя гистологические исследования, обнаружение, выделение, идентификацию вируса, серологическую диагностику.

Материалом для лабораторной диагностики являются взятые от больных животных смывы со слизистой носа, конъюнктивы, легкие, селезенка, почки. От абортированного плода берут кусочки легких и печени.

Гистологическими исследованиями находят некротические очаги в мышечном слое мелких артерий, тромбозы сосудов, инфаркты.

Обнаружение вируса возможно в РСК и биопробой. Биопроба на жеребятах при подкожном, интраназальном, интратрахеальном введении вируссодержащего материала приводит к развитию болезни через 1—5 дней, а у жеребых кобыл — к аборту через 33 дня, но такие биопробы ставят очень редко.

Как правило, биопробу и последующее выделение вируса проводят в культуре клеток почки лошади.

Идентифицируют вирус в РН.

Парные сыворотки исследуют в РН, РСК или ИФА. Продолжительность постинфекционного иммунитета не изучена.

Дифференциальный диагноз. Вирусный артериит необходимо дифференцировать от ринопневмонии лошадей. Отличительные особенности последней — проявление в виде легкой респираторной инфекции и массовые аборты в последней стадии жеребости.

Дифференцировать ВАЛ приходится также от африканской чумы однокопытных.

Иммунитет и специфическая профилактика. У переболевших животных развивается иммунитет, продолжительность которого не изучена.

Специфическая профилактика осуществляется живой вакциной, представляющей собой вирус, аттенуированный пассажами в культуре клеток почки лошади, кролика, кожи лошади. Лошадей можно прививать в любом возрасте, но не в последней стадии жеребости. Изготовлена также формолвакцина против вирусного артериита лошадей.

2.15. СЕМЕЙСТВО БИРНАВИРУСОВ

Семейство Birnaviridae включает в себя вирусы, вызывающие поражения живых организмов — от насекомых до птиц.

Вирион безоболочечный, икосаэдральной симметрии, диаметром 60 нм, с одним протеиновым чехлом. Капсид образован 260 тримерными субъединицами. Плавучая плотность в CsCl 1,33 г/см^3, коэффициент седиментации 435S.

Вирусные частицы стабильны при pH 3—9 и нагревании до 60 °С в течение 1 ч, устойчивы к воздействию эфира.

Геном представлен двумя сегментами двуспиральной РНК — большего сегмента А и меньшего сегмента В. Вирион содержит пять полипептидов, липидов в нем не обнаружено. Организация сегмента А разных бирнавирусов сходна, хотя отмечается некоторое различие по размеру протеинов.

Единичный цикл репродукции занимает у вируса инфекционной бурсальной болезни 6—8 ч. Вируссвязывающие протеины обнаруживают на поверхности разных типов клеток цыплят. Транскрипция вирусной РНК происходит по полуконсервативному механизму смещения цепи. Данных о синтезе минус-цепей нет. Обе иРНК обнаруживаются в клетке через 3—4 ч после заражения и накапливаются в одинаковых пропорциях в течение всего репликативного цикла (молекул А примерно в 2 раза больше, чем молекул В).

Вируспецифические белки обнаруживаются в клетке через 4—5 ч после заражения. Нет ранних и поздних протеинов, иРНК сегмента А транслируется в полипротеин, содержащий три полипептида; иРНК сегмента В транслируется в полипептид, являющийся вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой.

Сборка и накопление вируса инфекционной бурсальной болезни происходит в ядре и цитоплазме. Механизм высвобождения вируса не ясен. При культивировании в культуре клеток примерно половина популяции вируса остается клеточно-ассоциированной.

Между вирусами, относящимися к разным родам, перекрестной серологической активности не наблюдается.

Естественные хозяева вируса инфекционной бурсальной болезни — цыплята кур и индеек. Реже его выделяли от уток и домашней птицы других видов. Распространяется возбудитель повсеместно, горизонтально, векторы не описаны. Инфицирование цыплят раннего возраста сопровождается поражением фабрициевой сумки, приводящим к дефициту В-лимфоцитов. Смертность наблюдается у цыплят 3—6-месячного возраста и ассоциируется с воспалительными процессами фабрициевой сумки, образованием иммунных комплексов, истощением комплемента и нарушением тромбообразования.

В семейство включены три рода: Aquabirnavirus, Avibirnavirus и Entomobirnavirus.

Род Aquabirnavirus содержит вирус, инфицирующий рыб, моллюсков и ракообразных.

Род Entomobirnavirus инфицирует только насекомых.

Род Avibirnavirus содержит инфицирующий только птиц вирус инфекционной бурсальной болезни — типовой вид. Заболевание характеризуется иммуносупрессией, обусловленной поражением лимфоидных клеток в фабрициевой сумке. В перекрестной нейтрализации идентифицировано два серотипа. Штаммы серотипа 1 патогенны для цыплят, штаммы серотипа 2 не патогенны.

2.15.1. ВИРУС ИНФЕКЦИОННОЙ БУРСАЛЬНОЙ БОЛЕЗНИ

Инфекционная бурсальная болезнь (ИББ, болезнь Гамборо) — остропротекающая контагиозная болезнь цыплят, характеризующаяся поражением фабрициевой сумки, диареей, нефрозом, внутримышечными геморрагиями.

Впервые болезнь зарегистрирована в 1957 г. в местечке Гамборо (США), что дало заболеванию второе название.

В настоящее время болезнь зарегистрирована во всех странах мира. Зараженность стад колеблется от 2 до 100 % и проявляется вспышками болезни. Экономический ущерб складывается из потерь, связанных с гибелью цыплят, вынужденной выбраковки птицы, снижения мясной продуктивности молодняка, а также из затрат на профилактические мероприятия и низкого уровня реагирования на вакцинацию ввиду иммуннодепрессии, обусловленной патологией бурсы.

Характеристика возбудителя. Возбудитель ИББ представляет собой вирус, относящийся к семейству Birnaviridae (от англ. bi — двойной, rna — рибонуклеиновая кислота), роду Avibirnavirus. Вирионы вируса безоболочечные, представляют собой сферические частицы диаметром 55 и 18—22 нм. Они состоят из сердцевины, содержащей двуспиральную линейную РНК, и белка — икосаэдрического капсида, построенного из 92 капсомеров.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус резистентен к эфиру, хлороформу, изменению pH (2—11), УФ-облучению. При воздействии 0,5%-ного раствора формалина инактивируется за 6 ч, 0,5%-ного хлорамина за 10 мин.

Антигенная структура. В структурах вирионов обнаружено пять белков. Один из них ответственен за группоспецифичность, другой — за типоспецифичность и индукцию вируснейтрализирующих антител.

Антигенная вариабельность. Вирус обладает антигенной вариабельностью: один серотип с шестью подтипами патогенен для цыплят, два серотипа патогенны для индеек. Наличие антигенной вариабельности вируса требует использования в качестве вакцины штамма, обладающего максимальной степенью антигенной гомологичности с эпизоотическим штаммом.

Гемагглютинирующие свойства. Не установлены.

Культивирование вируса. Вирус ИББ можно размножать в куриных эмбрионах, свободных от материнских антител к ряду вирусов, в том числе к вирусу ИББ. При заражении в аллантоисную полость или желточный мешок эмбрионы гибнут на 3—8-й день после заражения. Признаки размножения вируса в курином эмбрионе — некрозы и кровоизлияния на теле зародыша, в печени, почках. Вирус хорошо репродуцируется в культуре почечных клеток и фибробластов куриных эмбрионов, вызывая на 3—5-й день после заражения ЦПД. Возможно культивирование его на SPF-цыплятах (свободных от патогенной флоры) 21—25-дневного возраста.

Клинические признаки. У цыплят 3—6-недельного возраста болезнь протекает остро, однако в зависимости от иммунного состояния поголовья возможно подострое течение или летальный исход. Инкубационный период составляет 1—3 дня, и болезнь длится 5—7 дней.

У заболевших цыплят проявляется диарея с выделением водянистого, беловато-желтоватого помета, затем появляются дрожание головы, шеи, глубокая прострация. Заболеваемость и смертность нарастают быстро и достигают максимума на 3—4-й день болезни, далее в течение 5—7 дней она обычно идет на убыль. Отличительные признаки болезни — внезапность, высокий уровень поражения и быстрое выздоровление. Смертность составляет 6—37 %. Субклинически протекающая инфекция выражается главным образом замедлением роста. При заболевании взрослой птицы наблюдается лишь некоторое снижение процента жизнеспособности эмбрионов.

Патологоанатомические изменения. На разных стадиях болезни они различны. Вначале отмечают гипертрофию бурсы и петехии в ее слизистой, экссудат с хлопьями фибрина между ее складками, геморрагии в грудных мышцах и мышцах ног, серозных оболочках. Через неделю поражения становятся иными: серофиброзный

перикардит, гепатит и нефрит. Через месяц после инфекции бурса атрофируется и имеет размер в 3—4 раза меньший, чем у здоровой птицы того же возраста. Микроскопические изменения, характерные для ИББ, находят в фабрициевой сумке больных птиц. В основном они представлены некрозами лимфоидных и гиперплазией ретикулоэндотелиальных клеток, утолщением межфолликулярных соединительных перегородок, образованием вместо фолликул железистых структур (цв. вкл., рис. 54).

Локализация вируса. Вирус проникает через пищеварительный тракт и поражает лимфоидную ткань. Спустя 24—28 ч он локализуется в фабрициевой сумке. Наиболее чувствительны к вирусу лимфоциты, на поверхности которых фиксируются IgM. Поэтому основная мишень для вируса — подкласс В-лимфоцитов, особенно их незрелые формы. Кроме того, разрушаются лимфоциты селезенки, цекальных желез слепых отростков и др. Поражением лимфоидной ткани объясняется вызываемый вирусом иммунодепрессивный эффект.

ЦПД иммунных комплексов, включающих инфицированные вирусом лимфоциты, антитела, комплемент, приводит к появлению геморрагических поражений в скелетных мышцах, печени и других органах. Осаждение иммунных комплексов в клубочках и извитых канальцах почек снижает их фильтрационную способность, и в почках скапливаются ураты.

Диарея при ИББ развивается вследствие репродукции вируса в клетках эпителия кишечника, что приводит к обезвоживанию организма. Ослабление иммунного статуса птицы ведет к дополнительному инфицированию ее вирусами и бактериями.

Источник инфекции — больная птица. Возбудитель передается с инфицированными кормами, водой, аэрогенно, а также с инвентарем и через яйцо. Гельминтов и вшей считают прямыми векторами передачи. Дикие птицы могут быть прямым и непрямым векторами. В естественных условиях ИББ болеют только куры, а именно цыплята 2—15-недельного возраста. Однако удалось выделить вирус от индюшат, летучих мышей и москитов.

Диагностика. Только при типичном течении болезнь сравнительно легко диагностируют по клиническим и патологоанатомическим признакам. На ранних стадиях или при субклиническом течении необходимы лабораторные исследования.

Лабораторная диагностика. Для лабораторных исследований от павшей или убитой в течение первых 7 дней болезни птицы берут фабрициеву сумку, печень, почки.

Обнаружение вируса в патологическом материале возможно установить экспресс-методами: непрямым вариантом ИФА, РИФ и ПЦР.

Изоляцию вируса проводят путем биопробы с последующим выделением вируса на куриных эмбрионах, в культуре клеток и заражением цыплят. Выделить вирус из пораженных органов

удается не всегда, поэтому более надежный метод диагностики ИББ — серодиагностика. Сыворотку крови исследуют и при бессимптомном течении болезни. Важное значение в профилактике ИББ имеет систематический контроль за иммунным состоянием стада. Такой контроль осуществляется путем исследования парных сывороток крови.

Идентификацию выделенного вируса проводят с помощью РН на куриных эмбрионах, в РИФ и РДП.

Обнаружение антител к вирусу ИББ в сыворотках крови больных и переболевших птиц проводят в РН, РНГА, РДП, ИФА.

Вируснейтрализующие антитела достигают максимальных титров к седьмому дню после заражения и сохраняются в организме птицы до трех месяцев. Сыворотки с высоким титром вируснейтрализующих антител обычно бывают положительными и в РДП. РНГА выявляет антитела уже на 3—5-й день после заражения с максимальными титрами их на 3—4-й нед. Для широкого серологического исследования применяют ИФА.

Дифференциальная диагностика. ИББ необходимо дифференцировать от инфекционного бронхита кур, ньюкаслской болезни, болезни Марека, саркомы Рауса, кокцидиоза, нефрита, авитаминоза А. Однако только обнаружение антител не позволяет поставить диагноз, необходимо выделить вирус, установить его серотип, подтип и вирулентность.

Иммунитет и специфическая профилактика. При проведении мер специфической профилактики необходимо учитывать факторы, отрицательно влияющие на формирование стойкого иммунитета у птицы. Это прежде всего тип антигена, способ и частота его применения в процессе вакцинации, степень аттенуации или инактивации.

При иммунизации против ИББ живой вакциной необходимо установить соответствие применяемого препарата с циркулирующим среди птиц эпизоотическим штаммом. Кроме того, вакцинация должна проводиться с учетом материнских антител.

В настоящее время широко применяют живые вакцины из природно-ослабленных штаммов, а также ослабленных путем пассирования на КЭ и в культуре клеток. У птицы разных возрастных групп напряженность и длительность поствакцинального иммунитета не одинакова. Уровень специфических антител у цыплят соответствует концентрации вируснейтрализующих антител у взрослых кур-матерей в период яйцекладки.

В настоящее время применяют сухие живые вакцины штаммов Д-78 и «Винтерфильд 2512» орально и в виде спрея.

Инактивированную вакцину готовят из вируса, размноженного в КЭ и в культурах клеток. Вирус инактивируют формалином или β-пропиолактоном, добавляют гидроксид алюминия. Вакцину применяют подкожно или внутримышечно, вводя ее в возрасте 2—4 мес. Титры поствакцинальных антител изучают в ИФА и РН.

2.16. СЕМЕЙСТВО РЕТРОВИРУСОВ

Семейство Retroviridae (от лат. retro — обратно) — большая группа РНК-содержащих вирусов, поражающих позвоночных и даже беспозвоночных. Название семейства указывает на наличие в составе вирионов РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы), обеспечивающей синтез ДНК на матрице вирионной РНК.

Вирион всех представителей семейства сферической формы, диаметром 80—100 нм, оболочечный с гликопротеиновыми поверхностными выступами 8 нм в длину. Внутреннее ядро включает сферический нуклеокапсид (нуклеоид), расположенный у представителей разных родов семейства эксцентрично, по центру и в виде стержня или усеченного конуса.

Геном представлен димером молекул РНК (мономер РНК: односпиральная, линейная с позитивной полярностью, размер 7—11 kb), связанных между собой водородными связями и составляющих 2 % сухого веса вириона. На протеины приходится около 60 % сухой массы вириона, на липиды — 35 и на углеводы — 3 %.

В сердцевине находится фермент — обратная транскриптаза (РНК-зависимая ДНК-полимераза). С ее помощью образуется двуспиральная ДНК — провирус, который интегрирует с клеточным геномом. Транскрипция осуществляется клеточной РНК-полимеразой. Вирионы созревают при почковании на клеточных мембранах. Они чувствительны к нагреванию, УФ-облучению, детергентам и формальдегиду. Плавучая плотность в CsCl 1,16—1,18 г/см^3, коэффициент седиментации 600S.

Некоторые ретровирусы содержат клеточные гены (онкогены), играющие ведущую роль в индукции неопластической трансформации клеток. Вирусная ДНК встраивается во многие участки клеточной ДНК, реплицируется вместе с ней и передается дочерним клеткам. Такие ретровирусы содержатся в геноме животного уже с рождения и передаются потомству по наследству. Переход эндогенного ретровируса из «молчащего» состояния к активному может быть вызван действием ионизирующего излучения, каких-либо химических или биологических факторов.

Другая группа вирусов — экзогенные. Они могут попасть в клетку хозяина только путем инфекции извне. Такие вирусы передаются как горизонтально (через кровь, слюну, половые контакты и т. п.), так и вертикально (прямое инфицирование плода, инфицирование через молоко или при прохождении через родовые пути).

Культивируют онковирусы на животных и в культуре клеток. Онковирусы хорошо накапливаются в перевиваемых хронически зараженных культурах клеток, которые постоянно продуцируют вирус.

Семейство ретровирусов подразделяется на семь родов. Из них наибольший интерес представляют: четвертый род — включает вирусы лейкоза и саркомы птиц, пятый род — Spumavirus, зараженная ими культура клеток выглядит вспененной. В род включены синцитиальные вирусы крупного рогатого скота и кошек), шестой род (включает вирусы лейкоза крупного рогатого скота и Т-клеточного лейкоза человека) и седьмой род — Lentivirus (от лат. lenti — медленный). Сюда входят вирусы иммунодефицита человека, крупного рогатого скота, кошек, инфекционной анемии лошадей. Между представителями разных родов отмечена слабая перекрестная активность.

2.16.1. ВИРУС ЛЕЙКОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Лейкоз крупного рогатого скота — хроническая инфекционная болезнь опухолевой природы, основным признаком которой является злокачественное разрастание клеток кроветворных органов с нарушением их созревания. В результате происходит диффузная инфильтрация органов этими клетками или появляются опухоли.

Болезнь регистрируется почти во всех странах мира и наносит значительный экономический ущерб. Особую актуальность она приобрела из-за близкого родства ее возбудителя с вирусом Т-клеточного лейкоза человека.

К вирусу восприимчивы крупный рогатый скот, овцы, зебу, буйволы и, по некоторым данным, лоси.

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Retroviridae, подсемейству Oncovirinae, роду Oncovirus. Вирионы сферической формы, размером 40—90 нм и состоят из нуклеотида (сердцевины) с кубическим типом симметрии и липопротеидной оболочки, образующей на поверхности выступы. Нуклеотид содержит диплоидный геном, представленный двумя односпиральными линейными молекулами РНК.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус неустойчив к факторам внешней среды. Инактивируется при высоких температурах (56 °С и выше), УФ-излучении, под действием ультразвука. Повторные размораживания и оттаивания разрушают вирус. Дезинфицирующие растворы (формальдегид, едкие щелочи, хлорная известь и т. д.) в обычных концентрациях действуют на него губительно. Вирус чувствителен к жирорастворителям (эфиру, хлороформу, ацетону и т. д.).

Антигенная структура и активность. Вирионы вируса содержат наружные гликопротеидные и внутренние полипептидные антигены. Гликопротеидные антигены обладают гемагглютинирующей активностью и индуцируют образование вируснейтрализующих антител, которые защищают животных от инфицирования. Полипептидные антигены индуцируют образование преципитирующих

и комплементсвязывающих антител. Кроме того, преципитирующие антитела синтезируются и к гликопротеидному антигену и обнаруживаются у инфицированных животных в более ранние сроки в РДП.

Антигенная вариабельность и родство. В антигенном отношении штаммы вируса лейкоза крупного рогатого скота родственны, но отличаются от ретровирусов и вирусов других родов по антигенным свойствам, морфогенезу, синцитиобразованию, образованию в монослойных культурах клеток, свойством ревертазы. На основании этих различий вирус лейкоза рекомендуют отнести к особой группе, именуемой как тип Е.

Культивирование вируса. В лабораторных условиях вирус размножается в краткосрочных субкультурах лейкоцитов крови и перевиваемых культурах клеток животных различных видов (крупного рогатого скота, овец, летучих мышей, обезьян, собак и т. д.) и человека. Наиболее чувствительны — монослойные культуры клеток селезенки на ранних пассажах.

Репродукция вируса в культуре клеток не вызывает нарушения монослоя, а сопровождается образованием многоядерных клеток (синцитиев) уже в ранних пассажах. Это свойство вируса (синцитиобразование) было использовано в диагностическом методе по выявлению инфекционного вируса и вируснейтрализующих антител.

Гемагглютинирующая активность. Вирус агглютинирует эритроциты мышей при pH 6,0 и 4 °С.

Экспериментальная инфекция. Ее можно воспроизвести на новорожденных телятах и овцах, которым инокулируют разными способами (внутриперитонеально, подкожно, внутримышечно, аэрозольно) нативные лейкоциты или краткосрочные культуры клеток от больных лейкозом коров, или вируссодержащую культуральную жидкость. После длительной инкубации (от нескольких месяцев до нескольких лет) развивается характерная клиническая картина лейко- и лимфоцитоза, которая заканчиваются опухолевой стадией болезни и гибелью.

При экспериментальном заражении коз, свиней, кроликов наблюдается длительное выявление вирусспецифических антител без клинических проявлений болезни.

Клинические признаки. Различают две формы клинического течения болезни: энзоотическую и спорадическую.

Энзоотический лейкоз поражает взрослых (5—8 лет) животных и протекает с длительным латентным периодом (до нескольких лет), который характеризуется стойким лимфолейкозом без клинических признаков болезни. Терминальная стадия сопровождается снижением массы тела, молочной продуктивности, увеличением лимфоузлов и заканчивается смертью. Экономический ущерб очень высокий.

Спорадический лейкоз встречается редко и в экономическом отношении малоактуален. Поражается молодняк до трех

лет. Болезнь протекает в трех формах: ювенальной, тимусной и кожной.

Патологоанатомические изменения. Они специфичны и характеризуются диффузной инфильтрацией различных тканей клетками кроветворных органов и образованием опухолевых масс во внутренних органах (костном мозге, тимусе, селезенке, лимфоузлах, сердце, сычуге, почках, матке, скелетных мышцах). Лимфоузлы и селезенка увеличены, бугристые, с очагами некроза и кровоизлияниями.

Локализация вируса. Вирус локализуется в лимфоидных клетках разных органов, хотя обнаружить его удается только в молозиве и молоке. В инфицированных клетках естественно и экспериментально зараженных животных вирус сохраняется пожизненно (персистирует). В инфицированных лимфоцитах в форме провируса (непродуктивное состояние) вирус защищен от действия вируснейтрализующих антител и может передаваться потомству во время деления клеток. Провирус может изменять экспрессию генов клетки, что приводит к ее трансформации и развитию опухолевой стадии лейкоза.

Источник инфекции — больные животные. Основной путь передачи инфекции в естественных условиях через контаминированные вирусом инъекционные иглы, хирургические инструменты и т. д. при проведении санитарно-ветеринарных мероприятий. Кроме того, вирус может передаваться трансплацентарно (хромосомная или экстрахромосомная трансмиссия) от матери к плоду, алиментарно через молоко и молозиво, а также половым путем через инфицированную сперму. Распространяться инфекция может кровососущими насекомыми.

Диагностика. Диагноз на лейкоз ставят на основании эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатов лабораторных исследований, которые играют решающее значение.

Взятие материала. От больных и подозрительных на лейкоз животных берут кровь. Для гематологических исследований ее берут из яремной вены с антикоагулянтом. Для серологических исследований используют сыворотку крови от животных в возрасте 6 мес и старше. Транспортируют в термосе со льдом.

От трупов берут кусочки пораженных органов: селезенки, лимфоузлов, грудной кости, печени, почек, легких, сердца, сычуга, матки, скелетных мышц. Транспортируют в свежем виде или в растворе консерванта (10%-ном формалине) в термосе со льдом.

Лабораторная диагностика. Проводят гематологические, гистологические и специфические исследования.

Гематологический метод основан на подсчете лейкоцитов периферической крови и выведении лейкоцитарной формулы. Для этого используют электронный счетчик или камеру Горяева. Из проб крови, где установлен лимфолейкоз, готовят

мазки и подсчитывают клетки белой крови в зависимости от их морфологии.

У больных лейкозом повышено содержание лейкоцитов за счет клеток лимфоцитарного ряда, а также слабодифференцированных ретикулярных и антигенных (опухолевых) клеток.

У подозрительных на лейкоз животных гематологические исследования повторяют через равные интервалы (2—3 мес).

Для гистологических исследований из кусочков пораженных органов готовят специальные срезы и окрашивают гематоксилин-эозином. У больных лейкозом наблюдают диффузную инфильтрацию клетками лимфоидного ряда разной степени зрелости, склеротические изменения и некрозы.

Помимо этого для подтверждения диагноза могут проводить индикацию и идентификацию вируса.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. Используют серологические реакции, из которых наиболее чувствительны РДП и ИФА. Они позволяют обнаружить специфические антитела у инфицированных животных, начиная с 6-месячного возраста и старше. Это объясняется тем, что телята, выпаиваемые молозивом и молоком инфицированных коров, получают материнские антитела, которые сохраняются до 6 мес.

РДП (РИД). Для постановки реакции используют диагностический набор, содержащий необходимые компоненты (специфический антиген и сыворотку к нему, отрицательную сыворотку). Реакцию ставят микро- или макрометодом по общепринятой методике, используя 0,8%-ный агар на трис-буфере. Учет проводят через 48 ч. Животные, сыворотки крови которых положительно прореагировали (полоса преципитации между испытуемой сывороткой и антигеном) в РДП, считаются зараженными лейкозом.

ИФА. Применяют для обнаружения специфических антител в сыворотках крови, молоке и молозиве. Используются диагностические наборы для непрямого и конкурентного вариантов ИФА. Данный метод в 100 раз чувствительнее РДП и позволяет проводить широкомасштабные исследования по эпизоотическому лейкозу в стадах крупного рогатого скота.

Другие серологические методы уступают по чувствительности (% выявляемости) РДП и ИФА, поэтому могут рекомендоваться в качестве дополнительных. К ним относятся реакции латексагглютинации (РЛА), непрямой гемагглютинации (РНГА), непрямой иммунодиффузии (РИФ), а также встречного иммуноэлектрофореза (ВИЭФ).

Индикация и идентификация вируса. В диагностике лейкоза крупного рогатого скота они имеют скорее дополнительное значение и используются менее широко. С этой целью применяют ПЦР для обнаружения вирусного генома (провирусной ДНК), выделение вируса в культуре клеток и его индикацию в месте синцитиобразования, электронно-микроскопический ме-

тод, реакции бласттрансформации лейкоцитов (РБТЛ), а также обнаружение вирусных антигенов методом радиоиммунологического анализа (РИА).

ПЦР. Реакция позволяет обнаружить провирусную ДНК в патологическом материале через две недели после заражения. В диагностический набор входят праймеры, соответствующие участкам определенных генов некоторых структурных белков. Чувствительность данного набора достаточно высокая и позволяет выявлять до десяти копий ДНК в 1 мкг исследуемой пробы.

Тест синцитиобразования (ТСО). Основан на выделении инфекционного вируса в субкультурах и перевиваемых культурах клеток лимфоцитов, где он размножается с образованием многоядерных клеток (синцитиев), которые выявляются при окрашивании монослоя.

Электронно-микроскопический метод. Позволяет обнаруживать вирусные частицы в препаратах, полученных из краткосрочных культур клеток лейкоцитов крови, зараженных вирусом лейкоза, и из перевиваемых культурах клеток, сокультивируемых с инфицированными лимфоцитами. Вирионы обнаруживают в основном в межклеточном пространстве и на внешней мембране лимфоидных клеток. Они имеют ультраструктуру, характерную для онковирусов типа С.

Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ). Основана на способности лимфоцитов трансформироваться в переходные клеточные формы в питательной среде (в присутствии фитогемагглютинина) при определенном режиме культивирования (36 °С, 72 ч). Такие же процессы происходят in vivo у клинически здоровых животных. В препаратах, полученных в результате культивирования и окрашенных по Романовскому—Гимзе, определяют количество трансформированных лимфоцитов на 1000 учтенных клеток и выражают показателем бласттрансформации. В норме у клинически здоровых коров он составляет в среднем 60 % (40—90 %). Диагноз на лейкоз считается подтвержденным, если этот показатель не выше 35 %.

РИА. Метод конкурентного радиоиммунного анализа позволяет обнаруживать вирусные антигены в краткосрочных культурах лимфоцитов крови инфицированных животных. Основан на конкуренции вирусного антигена, выделенного из зараженных клеток, с контрольным (специфическим) антигеном, меченным изотопом, за связывание со специфическими антителами. Метод — наиболее чувствителен и специфичен.

Дифференциальный диагноз. Лейкоз крупного рогатого скота дифференцируют от актиномикоза, туберкулеза, паратуберкулеза и бруцеллеза.

Иммунитет и специфическая профилактика. Вакцины против лейкоза крупного рогатого скота нет, но исследования в этой области продолжаются. В основном, они идут по двум направлениям: созданию вакцины на основании культурального вируса и разработки рекомбинантной вирусвакцины. Достижение первого направления исследований — получение культурального вируса с использованием перевиваемых культур клеток (LK-15, FLK и др.), выбор эффективного инактиванта (формальдегида, этиленимина и его производных), который обеспечивает сохранение антигенной активности и полностью устраняет инфекционность вируса, и, наконец, проведение испытаний опытных серий полученного препарата на естественно-восприимчивых животных (телятах).

Что касается генно-инженерных разработок, то на сегодняшний день в качестве вирусного вектора используют осповакцину, содержащую рекомбинантные гены, кодирующие наружные антигены вируса лейкоза. После адаптации таких штаммов к культурам клеток (NP-2) получена живая культуральная рекомбинантная вакцина, опытные серии которой испытаны на телятах и овцах.

2.16.2. ВИРУС ИНФЕКЦИОННОЙ АНЕМИИ ЛОШАДЕЙ

Инфекционная анемия лошадей (ИНАН) — вирусная болезнь однокопытных, характеризующаяся поражением кроветворных органов и в целом мезенхимы, преимущественно хроническим течением, рецидивирующей лихорадкой (в периоды обострения) и анемией.

ИНАН регистрируют в странах Западной Европы, США, Японии, Индии, Австралии, в России, Белоруссии и на Украине. В естественных условиях болеют лошади всех возрастов, а также ослы и мулы. Заболевшие жеребята часто погибают.

Болезнь чаще всего встречается в лесисто-болотистых зонах в летне-осеннее время в период массового размножения и лёта жалящих насекомых (гнуса).

Характеристика возбудителя. Вирус относится к семейству Retroviridae (от лат. retro — обратный), роду Lentivirus (от лат lenti — медленный), т. е. включающий в себя медленные вирусы. К этому же роду относятся вирусы иммунодефицита крупного рогатого скота, кошек, а также человека.

Вирус содержит односпиральную РНК, но геном его в отличие от такового всех других известных вирусов диплоиден и представлен двумя идентичными молекулами РНК, соединенными водородными связями. В составе вириона, как и у всех ретровирусов, содержится РНК-зависимая ДНК-полимераза (обратная транскриптаза), обеспечивающая синтез ДНК на матрице вирионной РНК. Репликация вирионной нуклеиновой кислоты проходит стадии образования двуспиральной ДНК провируса с интеграцией его с клеточным геномом.

Вирус ИНАН кубической симметрии, имеет двухслойный капсид длиной около 120 нм и шириной 60 и 20 нм соответственно на

широком и узком концах. Вирионы покрыты суперкапсидной оболочкой.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям. Вирус чувствителен к эфиру, термостабилен, кипячение разрушает его через 1—2 мин, солнечные лучи инактивируют через 1—3 ч. В моче, навозе вирус сохраняется до 2,5 мес, в инфицированном сене — до 9 мес. Дезинфицирующие растворы довольно быстро инактивируют его: 2—4%-ный раствор NaOH за 20 мин, 2%-ный раствор формалина за 5 мин.

Антигенная вариабельность и родство. Штаммы вируса ИНАН, выделенные в различных частях земного шара, в антигенном отношении идентичны. Общий для них белок сердцевины обнаруживается в РСК, РЗСК и РДП. В то же время гликопротеиды оболочек всегда вариабельны, что выявляется в РН и отличает один штамм от другого.

Вирус ИНАН дает перекрестные серологические реакции с вирусом иммунодефицита человека, но не с другими ретровирусами.

Антигенная активность. В ответ на проникновение вируса ИНАН вырабатываются комплементсвязывающие антитела (обнаруживаются через 2—3 нед и сохраняются несколько недель), преципитирующие антитела (обнаруживаются через 1,5 мес и сохраняются до 7 лет), вируснейтрализующие антитела выявляются после 40 дней. В селезенке больных лошадей с помощью РДП обнаруживают антиген вируса ИНАН.

Культивирование вируса. Вирус можно репродуцировать в переживающей культуре ткани селезенки, лимфоузлов, надпочечников, в культуре эмбриональной ткани лошади. После нескольких «слепых» пассажей размножение вируса в культуре сопровождается появлением ЦПД. Установлено, что вирус ИНАН может размножаться в клетках комара.

Гемагглютинирующие и гемадсорбирующие свойства. Вирус ИНАН проявляет их с эритроцитами морской свинки, гемолитические свойства проявляет при адсорбции вируса на эритроцитах лошади в присутствии комплемента.

Клинические признаки. Инкубационный период болезни длится 2—6 нед. Болезнь проявляется повторяющимися обострениями (рецидивами) и периодами затухания (ремиссиями). Различают сверхострое, острое, подострое, хроническое и латентное течения.

Сверхострое течение характеризуется быстрым подъемом температуры тела, геморрагическим гастроэнтеритом, сердечной слабостью, асфиксией, атаксией, параличом задних конечностей и гибелью в течение 1—2 нед.

Острое течение проявляется развитием болезни в течение 1—3 нед и тоже гибелью. В дополнение к клиническим признакам, характерным для сверхострого течения, у животных наблюдают отеки в области живота, препуция, конечностей, шаткость походки, одышку, быстрое развитие анемии. Содержание эритроцитов снижается до 1 млн/мм^3, гемоглобина до 20—30 г/л, СОЭ ускоряется, наблюдается гипергамма-глобулинемия и тромбоцитопения. Кровь становится водянистой.

При подостром течении болезнь длится 2—3 мес и сопровождается рецидивирующей лихорадкой. В периоды рецидивов наблюдаются такие же клинические признаки, как при остром течении. В период ремиссии животное выглядит здоровым. Чем чаще и продолжительнее периоды лихорадки, тем скорее животные погибают в результате истощения защитных сил организма.

Хроническое течение характеризуется продолжительными ремиссиями — до нескольких месяцев. В периоды рецидивов наблюдаются такие же клинические признаки, как и при остром течении, а также утомляемость, одышка, сердцебиение, потливость, тремор мышц, исхудание.

Латентное течение наблюдают у животных в стационарно неблагополучных пунктах. У лошадей временами резко повышается температура тела. Периодически животные худеют, быстро утомляются, отмечается сердцебиение. В остальное время лошади выглядят здоровыми, оставаясь при этом вирусоносителями многие годы.

Патологоанатомические и гистологические изменения. Патологические изменения имеют особенности в зависимости от тяжести и продолжительности течения болезни. В случае острого течения болезни обычно наблюдают исхудание животного, желтушные отеки конъюнктивы, слизистой носа, рта с точечными кровоизлияниями. При вскрытии отмечают признаки геморрагического диатеза — множественные кровоизлияния на слизистых и серозных оболочках, в паренхиматозных органах. Селезенка, печень, почки, сердце увеличены и кровенаполнены. Отмечают геморрагические воспаления слизистой желудочно-кишечного тракта с кровотечением в полость. Кровь водянистая, алая.

После хронического течения также наблюдают истощение животных, бледность и желтушность слизистых, мелкие кровоизлияния на серозных оболочках сердца и кишечника. В подкожной клетчатке конечностей, подгрудка, брюшной стенки отеки и кровоизлияния. Печень увеличена, с мускатным рисунком на разрезе. Миокард в состоянии зернистой и жировой дистрофии с очагами некроза (серо-белые участки).

Патологоанатомические изменения после латентного течения нехарактерны. Иногда обнаруживают селезенку светло-красного цвета, пигментные пятна, как результат старых кровоизлияний на эндокарде, очаги некроза в миокарде.

Наиболее характерны изменения в печени и селезенке. При остром течении болезни в них наблюдают скопления гистиоцитов, макрофагов и лимфоидных клеток. В них отмечают скопления гемосидерина. Клетки сердца, печени, почек в состоянии жировой и зернистой дистрофии.

При хроническом течении болезни наблюдают лимфоцитоз паренхимы селезенки и ее гиперплазию, признаки хронического гломерулонефрита, склерозы эндо- и миокарда.

Патогенез ИНАН изучен пока недостаточно. Вирус передается от больного животного к здоровому с кровью через укус насекомых (слепней, комаров), при работе со шприцами, при искусственном осеменении, случке.

С кровью вирус разносится по организму и достигает максимальной концентрации в селезенке, лимфоузлах, печени. Размножается в эритроцитах, кроветворных клетках костного мозга, макрофагах. Наиболее высокие титры вируса в крови определяют в периоды лихорадки и тогда его легко выявляют. В период ремиссии вирус можно обнаружить только путем заражения здоровой лошади.

Наиболее характерный признак болезни — анемия. Проявляется резким уменьшением количества эритроцитов, гемоглобина, разжижением крови, ухудшением ее свертываемости. Анемия при этом заболевании по современному представлению обусловлена двумя механизмами: первый — угнетение под действием вируса кроветворной функции костного мозга; второй, очевидно главный, — иммунологический, объясняющий причину причисления ИНАН к болезням иммунных комплексов.

Персистирующий характер течения болезни связывают с патологией иммунной системы, при которой наблюдается низкое содержание в организме такого гуморального фактора, как комплемент. Как известно, только в присутствии последнего антитела прочно связываются с антигеном и таким образом нейтрализуют вирус. При недостатке комплемента в иммунный комплекс включаются только антиген или антитело. Такие комплексы непрочны, легко диссоциируют, 99 % включенного в них вируса не утрачивает инфекционности. Вирус снова размножается и является постоянным антигенным раздражителем. В результате синтезируется огромное количество антител, а организм не освобождается от вируса.

Существует и другое объяснение иммунологического механизма патогенеза ИНАН. Суть его заключается в том, что образующиеся в организме в ответ на проникновение вируса антитела вместе с комплементом покрывают поверхность зараженных вирусом эритроцитов лошади. В результате эритроциты разрушаются и вместе с иммунным комплексом фагоцитируются макрофагами.

Обычно эту функцию выполняют макрофаги селезенки. При ИНАН макрофаги селезенки полностью не справляются с этой задачей, и переработку отмирающих эритроцитов начинают выполнять макрофаги печени, почек и других органов. При хроническом течении болезни возможности ретикулоэндотелиальной системы органов истощаются, в органах наблюдаются дистрофические изменения, а гемоглобин выводится из организма. Наблюдаемые при ИНАН воспаления клубочков обусловлены отложением комплекса вирус — антитело. Иммунологическим механизмом объясняется появление у больного животного не только анемии, но и гепатита, гломерулонефрита, гипергамма-глобулонемии и лимфаденопатии.

Локализация вируса. ИНАН — лимфопролиферативная болезнь с непрерывной виремией при наличии антител. Особенно интенсивно вирус размножается в костном мозге и крови, вызывая угнетение эритропоэза и гемолиз части эритроцитов во время приступа лихорадки. Наиболее высокие титры вируса в период рецидива лихорадки. Вирусный антиген в организме экспериментально зараженных лошадей обнаруживали с помощью РИФ через 6—38 дней после заражения в клетках селезенки, лимфоузлов, костного и головного мозга, зобной железы, почек, легких.

Выделение вируса происходит с мочой, калом, молоком, носовыми и конъюнктивальными выделениями.

Источники инфекции — лошади при остром течении болезни, при обострении хронического течения и при латентном течении. Вирусоносительство удавалось выявлять в течение 10—18 лет после острого переболевания. Основными переносчиками вируса считают слепней и комаров. Факторами передачи могут быть загрязненные выделениями больных животных корма, вода, предметы ухода.

Диагностика. Диагноз на ИНАН ставят, учитывая эпизоотологические особенности, клинические признаки, патологоанатомические и гистологические изменения, результаты гематологических, вирусологических и серологических исследований.

Лабораторная диагностика. Для лабораторных исследований берут следующие материалы:

для гистологического исследования — биопсийный материал печени больного животного или кусочки печени, селезенки, сердца, лимфатических узлов, почек трупа, консервированные 10%-ным раствором формалина;

для гематологических исследований — 10—12 мл крови, стабилизированной 5%-ным раствором лимоннокислого натрия;

для биопробы на жеребятах — 300—500 мл крови, взятой в период лихорадки от положительных по заболеванию лошадей;

для серологических исследований — 5—6 мл сыворотки без консерванта, сохраняющуюся в замороженном состоянии, или с консервантом мертиолатом (1 : 10 000), находящуюся при 4 °С.

Гематологическими исследованиями устанавливают снижение содержания эритроцитов до 4,5 млн/мм^3 и ниже (норма 5—9 млн/мм^3), гемоглобина до 30 г/л и ниже, увеличение количества лимфоцитов до 60—75 % (норма 25—30 %), возрастание СОЭ до 60—70 делений в первые 15 мин.

Биопробу на жеребятах ставят только в сомнительных случаях при проверке особо ценных лошадей или группы их, смешивая сыворотки от 10—15 животных. При этом двум жеребятам в возрасте 6—12 мес подкожно вводят исследуемую кровь или сыворотку и наблюдают за ними 3 мес. Контроль над зараженными животными включает гематологические и серологические исследования.

Вирусологические исследования включают в себя обнаружение вируса в сыворотке крови при остром, подостром течении болезни с помощью РГА, выделение вируса в культуре клеток лейкоцитов лошади и идентификацию этого вируса в НРИФ и ИФА.

Ретроспективная серологическая диагностика. Состоит в обнаружении в сыворотке крови антител к вирусу ИНАН в основном в РДП. В качестве специфического антигена в реакции используют либо вирус, накопленный на культуре лейкоцитов лошади, либо суспензию селезенки больных лошадей. Те животные, у которых в РДП обнаруживают антитела, считаются больными и подлежат уничтожению. РДП выявляет общий для всех штаммов вируса ИНАН белок.

Применяют также такой чувствительный метод, как ИФА. Кроме того, антитела к вирусу ИНАН могут быть обнаружены в РСК или РТГА с 0,2%-ной взвесью эритроцитов морской свинки.

В определенные периоды болезни антитела могут не выявляться, поэтому проводят повторные исследования.

Иммунитет и специфическая профилактика. Иммунитет при ИНАН изучен недостаточно. Антитела часто выявляют на протяжении всей жизни лошади, однако они не избавляют от вируса. Причина этого — сохранение инфекционности вирусом, входящим в состав комплекса антиген + антитело.

Высокая антигенная вариабельность вируса объясняется появлением точечных мутаций в генах при размножении его в присутствии антител. Изменение антигенных свойств вируса возможно в организме одного и того же животного. Во время двух лихорадочных циклов от больной лошади могут быть выделены два штамма вируса, что называют антигенным дрейфом. На новый антиген вируса снова возникает реакция организма с лихорадкой, отеками, анемией и другими клиническими признаками, т. е. наблюдают рецидив.

Значительные отличия штаммов вируса ИНАН по антигенным и иммуногенным свойствам служат серьезным препятствием созданию вакцины против данного заболевания.

Глава 3
ПРИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

В 1980-е годы был открыт необычайный этиологический агент — инфекционный прионный белок, принципиально отличающийся от возбудителей всех известных до сих пор классов инфекционных агентов — простейших, микробов, вирусов и вироидов.

Проблема прионных болезней родилась в рамках учения о медленных инфекциях, когда в 1954 г. B. Sigurdsson сообщил о своих многолетних исследованиях массовых заболеваний среди овец под названием «скрепи». В 1957 г. D. Yajdusek и V. Zigas обнаружили и описали новое заболевание среди папуасов-каннибалов (о. Новая Гвинея), которое известно сегодня под названием «Куру».

Благодаря исследованиям W. Hadlow (1959) было выявлено большое сходство между клиническими проявлениями, эпидемиологическими показателями и патоморфологической картиной «Куру» у человека и «скрепи» у овец, на основании чего стало очевидно, что медленные инфекции могут поражать не только животных, но и человека. Массовый характер медленных инфекций, естественно, ставил вопрос об их этиологии и начался энергичный поиск в этом направлении.

Начиная с сообщений B. Sigurdsson в литературе постепенно накапливались данные об особой группе медленных инфекций человека и животных, патоморфологические признаки которых существенно отличались выраженным своеобразием, проявляющимся только в поражении центральной нервной системы, с отсутствием признаков воспаления, дегенерации нейронов, гиперплазии и пролиферации астроцитов, формировании амилоидных бляшек. Эти нарушения приводят к тому, что серое вещество мозга принимает губкообразный вид (status spongiosus).

Подобное своеобразие патоморфологической картины определило первичное (до сих пор используемое) название этой группы болезней — трансмиссивные губкообразные энцефалопатии (ТГЭ).

Болезни, объединенные данным названием, характеризуются длительным инкубационным периодом (от года до 30 лет и более), медленным прогрессирующим течением, патологическими изменениями исключительно в нервной ткани, отсутствием признаков воспаления и иммунного ответа, неизбежным летальным исходом. Основные клинические признаки ТГЭ обусловлены медленно прогрессирующим расстройством нервной системы: отклонение

в психическом и умственном состоянии, положения тела и координации движений, нарушение реактивности, облысение.

На протяжении нескольких десятилетий все попытки обнаружить возбудителей ТГЭ заканчивались неудачей, хотя инфекционная природа их была точно доказана многочисленными опытами передачи заболеваний различным животным и не вызывала сомнений. Исследователи установили, что наивысшее количество инфекционного агента содержится в инфицированной мозговой ткани.

Были предложены различные гипотезы о природе этих возбудителей: вирусная, вироидная, белковая, полисахаридная, мембранная и др. Многие вирусологи поддерживали гипотезы о вирусной и вироидной природе агента. Они базировались на таких данных, как малые размеры возбудителя, его инфекционность, фильтруемость и неспособность расти на питательных средах. Однако наряду с приведенными признаками у возбудителя были обнаружены свойства, которые отличались от таковых у известных вирусов, а именно: необычайно высокая резистентность возбудителя к УФ-лучам, ионизирующей радиации, ультразвуку, нагреванию, нуклеазам, действию формальдегида и другим дезинфектантам. Сочетание таких своеобразных свойств возбудителей ТГЭ дали основания рассматривать их как «необычайные вирусы». Однако в начале 1980-х годов была расшифрована природа возбудителей ТГЭ.

Американский биохимик С. Прузинер (1982), используя новые подходы к накоплению и очистке инфекционного начала в мозговой ткани зараженных хомяков, показал, что возбудителем наиболее распространенной в природе ТГЭ — скрепи овец является безнуклеиновый низкомолекулярный (27—30 кД) белок Pr P27—30*, который он назвал «инфекционный прионный белок». В качестве инфекционной единицы С. Прузинер предложил наименование «прион». Термин «прион» образован как анаграмма английских слов proteinaceons infections particles — белковая инфекционная частица. Прион как инфекционная единица состоит из инфекционного прионного белка и сокращенно обозначают — Pr P^{sc}.

Применение электронной микроскопии позволило выявить в очищенных препаратах палочковидные структуры (фибриллы) диаметром 10—20 нм и длиной 100—200 нм, которые состояли примерно из 1000 молекул прионного белка. Все попытки обнаружить в этих препаратах нуклеиновую кислоту оказались безуспешными.

Результаты исследований последних лет полностью подтвердили природу ТГЭ, и на этом основании эти заболевания обозначают как **прионные болезни.**

* По химической характеристике Pr P27-30 представляет собой сиалогликопротеид, в котором к боковым цепям аминокислот подсоединены остатки сахаров.

Различают инфекционную, спорадическую и наследственную формы прионных болезней. К группе прионных болезней человека относят болезни Крейцфельда—Якоба, Герстманна—Штройслера—Шайнкера, куру, летальную семейную бессонницу. У животных группа прионных болезней включает скрепи овец и коз, трансмиссивную энцефалопатию норок, губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота, хроническую изнуряющую болезнь оленей и лосей, губкообразную энцефалопатию кошек и экзотических животных (антилопы и большой куду).

В последние 20 лет были получены весьма ценные сведения по проблеме ТГЭ, чему в большей степени способствовала разразившаяся в 1986 г. в Великобритании эпизоотия губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота («бешенство» крупного рогатого скота). Предполагают, что возникновение этой болезни в Великобритании было обусловлено скармливанием мясокостной муки, полученной при использовании боенских отходов овец, больных скрепи. Режим переработки сырья животного происхождения не обеспечивал инактивацию возбудителя скрепи.

Установлено, что нормальный (клеточный) прионный белок (Pr P^c) синтезируется во многих органах и тканях человека и животных. Функция его изучена недостаточно, но полагают, что он необходим для функционирования нейронов, межклеточного узнавания и клеточной активации и т. д. Ген, кодирующий синтез прионного белка, картирован в 20-й хромосоме у человека, во 2-й — у мыши и в 14-й — у серебристо-черной лисицы. Ген* имеет мозайчатую структуру и состоит из экзонов и интронов. Он транскрибируется полностью с образованием предшественника иРНК, из которого удаляются интроны, а экзоны соединяются и формируется зрелая иРНК, которая транспортируется в цитоплазму и на рибосомах обеспечивает синтез прионного белка. Длина молекулы прионного белка у человека и различных животных составляет 252—264 аминокислотных остатка. Синтезированный в клетке нормальный белок обозначают Pr P^c — клеточная изоформа. Конформационно измененный прионный белок (аномальный, инфекционный) обозначают Pr P^{sc} — скрепийная изоформа.

Обработка нормального прионного белка протеинкиназой К приводит к полному его разрушению, тогда как в этих же условиях расщепляется только N-концевая часть инфекционного прионного белка. Чувствительность к протеинкиназе К является маркером, отличающим Pr P^c от Pr P^{sc} .

Установлено, что Pr P^c синтезируется в эндоплазматической сети и довольно быстро деградирует (продолжительность его полураспада составляет всего 5—6 ч). Синтезированный Pr P^c, проходя через аппарат Гольджи, транспортируется на поверхность клетки, переносится вдоль аксона. В отличие от Pr P^c инфекцион-

* Ген прионного белка крысы имеет 1600 пар нуклеотидов.

ный прионный белок (Pr P^{sc}) первично аккумулируется в клетках, накапливаясь в цитоплазматических везикулах. Дальнейшее его накопление в синаптических структурах и связанная с этим дезорганизация синапсов, возможно, является причиной развития глубоких неврологических дефектов. Позднее Pr P^{sc} высвобождается во внеклеточное пространство и откладывается в виде амилоидных бляшек.

Механизм накопления инфекционного белка в зараженном организме сегодня точно не известен. Однако, исходя из определения, что это пострансляционный процесс, очевидно, что инфекционный прионный белок вызывает в здоровом организме трансформацию нормального прионного белка в инфекционную форму за счет его (нормального белка) конформационных (т. е. пространственных) изменений. В этом случае речь идет об изменении третичной или даже четвертичной структуры исходного белка Pr P^{c}.

Таким образом, процесс накопления инфекционного прионного белка происходит не в результате синтеза в зараженном организме молекул Pr P^{sc}, а вследствие конформационных изменений уже синтезированных перед этим нормальных молекул Pr P^{c} под влиянием инфекционного белка (рис. 61).

Процесс накопления инфекционного прионного белка обусловлен прежде всего необходимостью контакта двух молекул. В результате под влиянием одной молекулы Pr P^{sc} происходит трансформация одной молекулы Pr P^{c} в ее инфекционную форму Pr P^{sc}. Следующий этап, как видно на схеме, включает уже наличие двух молекул Pr P^{sc}, под воздействием которых образуются уже четыре молекулы Pr P^{sc} и т. д.

Этот сложный пострансляционный процесс характеризуется большими структурными изменениями прионного белка, в результате которого α-спирали превращаются в β-складчатые структуры. Установлено, что Pr P^{c} содержит 42 % α-спиралей и почти не содержит β-тяжей (около 3 %), в то время как в инфекционной форме Pr P^{sc} выявляется 30 % α-спиралей и 43 % β-тяжей (цв. вкл., рис. 55).

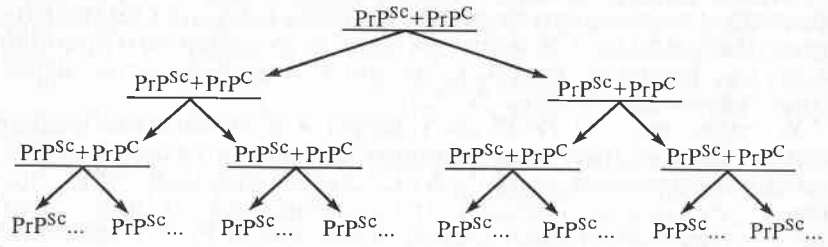


Рис. 61. Процесс накопления молекул инфекционного прионного белка

Превращение нормального прионного белка в инфекционную форму может происходить:

спонтанно, это встречается редко, например, при спорадической форме болезни Крейцфельда — Якоба (частота заболевания составляет 0,5—1 случай в год на 1 млн жителей);

под воздействием экзогенного инфекционного прионного белка, например, губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, болезнь куру у человека, новый вариант болезни Крейцфельда—Якоба, случайная передача болезни Крейцфельда—Якоба при хирургических и других медицинских манипуляциях*;

при мутациях в кодирующей части гена прионного белка, например болезнь Герстманна—Штройслера—Шайнкера, летальная семейная бессонница у людей.

В литературе приводится предполагаемый патогенез ТГЭ на примере скрейпи овец: оральная инфекция → репликация в мононуклеарных фагоцитах → отсутствие иммунного ответа → распространение с кровотоком → внедрение в центральную нервную систему (ЦНС) → репликация в ЦНС → индукция амилоидоза → дегенерация нервной ткани → клинический симптомокомплекс → смерть.

Исследования показали, что после заражения возбудитель широко распространяется в организме, размножается в различных органах, прежде чем его обнаружат в ЦНС. Места самой ранней локализации инфекции — миндалины, подвздошная кишка, проксимальная часть толстой кишки, а также селезенка и различные лимфатические узлы. В центральной нервной системе первое место репликации локализуется в грудном отделе спинного мозга, далее возбудитель распространяется вдоль висцеральных симпатических волокон и достигает передних областей головного мозга. Установлено, что в ранние сроки наивысшие титры возбудителя обнаруживаются в лимфоидной ткани (селезенка, лимфатические узлы), однако их величина в 10—100 раз ниже концентрации возбудителя в ЦНС.

Некоторые особенности эпизоотологии прионных болезней обусловлены, во-первых, необычной природой возбудителя и, во-вторых, необычностью его происхождения. Благодаря высокой устойчивости инфекционного прионного белка к целому ряду неблагоприятных факторов внешней среды (повышенная температура, УФ, свет, ионизирующая радиация, дезинфектанты и т. д.) пути передачи возбудителя оказываются в меньшей степени подвержены риску прерывания, как это имеет место при различных воздействиях на пути передачи инфекционных агентов паразитарной, бактериальной и вирусной природы.

---

* Ятрогенный путь передачи прионных болезней — сюда относятся использование недостаточно простерилизованных инструментов, пересадка твердой мозговой оболочки и роговицы, использование гормона роста или гонадотропина, полученных из гипофизов умерших людей.

Что касается первого звена эпизоотической цепи, то источником инфекционного прионного белка при прионных болезнях, как правило, является больное животное или больной человек. Путь передачи инфекционного агента — алиментарный и передача возбудителя при хирургических операциях, введении гормональных препаратов. Показана контактная передача скрейпи у овец.

В отношении последнего звена эпизоотической цепи — восприимчивого организма — накоплен уже значительный фактический материал, свидетельствующий о существовании определенного уровня чувствительности (или нечувствительности) к инфекционному прионному белку.

Так, известна высокая чувствительность к скрейпи овец романовской породы и до 100 % устойчивость у овец породы «дорсет». Таким образом, уровень чувствительности к инфекционному агенту определяется генетической характеристикой хозяина, а также степенью структурного родства инфекционного прионного белка донора и нормального клеточного белка реципиента.

Особый эпидемиологический и эпизоотологический интерес представляет вопрос о формировании и поддержании скрытых трансмиссивных форм губкообразных энцефалопатий. Накопленные за последние десятилетия данные свидетельствуют о способности инфекционного прионного белка поддерживать латентную форму инфекционного процесса. Кроме того, инфекционные прионы способны преодолевать видовые (родовые и др.) барьеры не только в условиях эксперимента, но и вызывать развитие эпизоотического процесса среди популяций млекопитающих, считающихся ранее нечувствительными к данному возбудителю.

Возможность заражения людей возбудителем губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота связывают с появлением в 1994—1997 гг. в Великобритании и Франции нетипичных случаев болезни Крейцфельда—Якоба, которая отличалась от классических проявлений этого заболевания и была обозначена как новый вариант болезни Крейцфельда—Якоба. К концу 2001 г. было отмечено 93 случая нового варианта этого заболевания, которое развивалось у людей в возрасте от 16 до 40 лет; длительность течения болезни составляла в среднем 13 мес.

В настоящее время в европейских странах, в том числе и в Российской Федерации, осуществляется ряд мероприятий по профилактике прионных инфекций. Диагностика их основывается на эпизоотологических данных, клинических признаках и лабораторных исследованиях, включающих патогистологический анализ пораженных участков мозговой ткани (цв. вкл., рис. 56) и иммуноцитохимический анализ на присутствие инфекционного прионного белка (цв. вкл., рис. 57). Лечение не разработано.

Профилактические мероприятия направлены на охрану здоровья как человека, так и животных. Для нашей страны, свободной от губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота, особенно актуально недопущение завоза крупного рогатого скота, а также мяса и мясных продуктов из Великобритании и тех регионов других стран, где зарегистрированы случаи заболевания. Профилактические меры в отношении скрейпи сводятся к уничтожению больных животных, строгому соблюдению правил термической обработки при приготовлении кормов в звероводческих хозяйствах, многоразовой дезинфекции помещений, инвентаря, территории и только через 1—2 года после ликвидации болезни завозу ягнят из благополучных хозяйств.

Трансмиссивные губкообразные энцефалопатии животных представляют серьезную проблему не только в ветеринарии и эпизоотологии, но и, что может быть даже важнее, в области ветсанэкспертизы продуктов животноводства, производства и применения препаратов животного происхождения.

Изучение прионов и вызываемых ими заболеваний является новой, быстроразвивающейся областью биомедицинских исследований, которая в последние годы приобрела важное научно-практическое значение.

Результаты молекулярно-биологических исследований структуры прионных белков дали основание наметить новые направления в дальнейших подходах в терапии прионных болезней. Более перспективным рассматривается подход, включающий создание некого «молекулярного клея», который смог бы преодолеть гематоэнцефалический барьер и связываться с гидрофобной сердцевиной $Pr\ P^c$. Такой химиопрепарат, по мнению авторов, смог бы стабилизировать α-спирали в молекуле $Pr\ P^c$ и таким образом эффективно предотвращать его трансформацию в $Pr\ P^{sc}$.

Другой подход основан на конструировании молекул, которые бы могли связывать поверхностное взаимодействие инфекционного $Pr\ P^{sc}$ и таким образом прекращать (или приостанавливать) их способность к взаимодействию с молекулами нормального (клеточного) $Pr\ P^c$, прекращая тем самым процесс конформационных изменений последних.

Многие считают, что патологические прионы более правильно относить к возбудителям конформационных болезнй, вызывающим диспротеиноз.

Предполагают существование болезней конформации белков, возникающих в результате неправильного сворачивания (нарушения правильной конформации) клеточного белка, необходимого для нормального функционирования организма. Сворачивание, или фолдинг (от англ. folding — сворачивание), вновь синтезированных клеточных белков в правильную функциональную конформацию обеспечивают особые белки-шарперы.

Очевидно, что сегодня встает новая проблема, которая обозначена как «конформационные болезни», при которых конститутивные белки подвергаются изменениям по размеру или форме и вследствие этих изменений из жизненно необходимых могут превратиться в смертельно опасные, вызывающие тяжелые, а порой и фатальные последствия.

Контрольные вопросы

1. Кто и когда открыл прионы? 2. Каковы природа прионов и их основные свойства? 3. Каков патогенез прионных болезней? 4. Какие прионные болезни вы знаете у человека и животных?

ПРИЛОЖЕНИЕ

●

ИТОГОВЫЕ КОНТРОЛЬНЫЕ ЗАДАНИЯ

№	Наименование дидактической единицы (ДЕ) дисциплины	Наименование задания		Требования ГОСТа к содержанию и уровню подготовки	
				степень освоения ДЕ	уровень деятельности при контроле ДЕ
1	Введение в ветеринарную вирусологию			Знать	Применять в типовой ситуации
2	Структура и химический состав вирионов	2.1	Структура вирусов	»	То же
		2.2	Химический состав вирусов (нуклеиновые кислоты, белки, другие компоненты)		
3	Систематика вирусов	3.1	Принцип систематики	»	»
		3.2	Краткая характеристика основных семейств		
4	Репродукция вирусов	4.1	Адсорбция и проникновение вирусов	»	»
		4.2	Транскрипция, трансляция, репликация		
		4.3	Формирование вирионов и выход их из клеток		
5	Культивирование вирусов	5.1	Место размножения вирусов	»	»
		5.2	На чем культивируют вирусы?		
		5.3	Живые системы, преимущественно используемые для культивирования вирусов		
6	Генетика вирусов	6.1	Мутации и их механизмы	»	»
		6.2	Рекомбинации и их механизмы		
7	Особенности противовирусного иммунитета	7.1	Факторы неспецифического иммунитета	»	»
		7.2	Факторы специфического иммунитета	»	»
8	Патогенез вирусных болезней	8.1	Патогенез на клеточном уровне	»	»
		8.2	Патогенез на уровне организма	»	»
9	Специфическая и неспецифическая профилактика вирусных болезней	9.1	Специфическая профилактика	»	»
		9.2	Неспецифическая профилактика		
10	Серологические реакции в вирусологии			»	»

Продолжение

№	Наименование дидактической единицы (ДЕ) дисциплины	Наименование задания		Требования ГОСТа к содержанию и уровню подготовки	
				степень освоения ДЕ	уровень деятельности при контроле ДЕ
11	Принципы диагностики вирусных болезней	11.1	Индикация вирусов	Знать	Применять в типовой ситуации
		11.2	Выделение вирусов		
		11.3	Идентификация вирусов		
		11.4	Ретроспективная серодиагностика		
12	Правила работы в вирусологической лаборатории. Получение и транспортировка патологического материала	12.1	Правила работы с вирусами и техника безопасности	»	»
		12.2	Получение и транспортировка патологического материала		
		12.3	Этапы лабораторной диагностики вирусных болезней		
13	Заражение и вскрытие лабораторных животных	13.1	Заражение лабораторных животных	»	»
		13.2	Индикация вирусов в организме		
14	Индикация вирусов путем биопробы на куриных эмбрионах	14.1	Заражение куриных эмбрионов	»	»
		14.2	Индикация вируса в куриных эмбрионах		
15	Культуры клеток, их использование в вирусологии	15.1	Культуры клеток и их получение	»	»
		15.2	Индикация вирусов в культуре клеток		
16	Титрование вирусов по инфекционному действию			»	»
17	Титрование вирусов по гемагглютинирующему действию				
18	Индикация вирусов путем обнаружения вирионов и телец-включений	18.1	Электронная и световая микроскопия вирионов вирусов	»	»
		18.2	Тельца-включения		
19	Реакция нейтрализации (РН)			»	»
20	Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)			»	»
21	Реакция диффузной преципитации (РДП)			»	»
22	Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)			»	»

Продолжение

№	Наименование дидактической единицы (ДЕ) дисциплины	Наименование задания		Требования ГОСТа к содержанию и уровню подготовки	
				степень освоения ДЕ	уровень деятельности при контроле ДЕ
23	Реакция иммунофлуоресценции (РИФ)			Знать	Применять в типовой ситуации
24	Иммуноферментный анализ (ИФА)			»	»
25	Полимеразная цепная реакция (ПЦР)			»	»
26	Вирусы, вызывающие пневмоэнтериты у телят			»	»
27	Вирусы гриппа и болезнь Ауески	27.1	Вирусы гриппа	»	»
		27.2	Болезнь Ауески	»	»
28	Вирусы, вызывающие болезни у крупного и мелкого рогатого скота	28.1	Вирусные болезни крупного рогатого скота	»	»
		28.2	Вирусные болезни мелкого рогатого скота	»	»
29	Вирусы, вызывающие болезни у птиц			»	»
30	Вирусы, вызывающие болезни у свиней				
31	Вирусы, вызывающие болезни у собак, кошек и кроликов	31.1	Вирусные болезни собак	»	»
		31.2	Вирусные болезни кошек		
		31.3	Вирусные болезни кроликов		
32	Вирусы, вызывающие болезни у лошадей			»	»
33	Решение диагностических задач на вирусные болезни телят			»	»
34	Решение диагностических задач на вирусные болезни птиц			»	»
35	Лабораторная диагностика оспы			»	»
36	Лабораторная диагностика ящура			»	»
37	Лабораторная диагностика бешенства			»	»
38	Решение диагностических задач на вирусные болезни свиней			»	»
39	Решение диагностических задач на вирусные болезни собак			»	»

1. Введение в ветеринарную вирусологию

1.1. Кто открыл вирусы?
Л. Пастер
В. Бабеш
Д. Ивановский*
В. Жданов
1.2. Кто установил вирусную природу ящура?
Р. Кох
Ф. Леффлер*
Д. Ивановский
А. Боррель
1.3. Какой способ размножения (репродукции) у вирусов?
Деление
Спорообразование
Почкование
Дисъюнктивный*
1.4. Чем отличаются вирусы от бактерий?
Имеют ядро
Имеют лизосомы
Имеют обмен веществ
Не имеют обмена веществ*

2.1. Структура вирусов

2.1.1.Как расположены белки в вирионе?
Отдельными группами
Произвольно
В виде оболочки*
Тяжами
2.1.2. Какие вирусы имеют спиральный тип симметрии нуклеокапсида?
Герпесвирусы
Аденовирусы
Вирусы гриппа*
Вирус ящура
2.1.3. Какие вирусы имеют кубический тип симметрии нуклеокапсида?
Вирусы гриппа
Аденовирусы*
Вирусы парагриппа
Вирус бешенства
2.1.4. Какие вирусы имеют смешанный (сложный) тип симметрии нуклеокапсида?
Вирус чумы плотоядных
Вирус болезни Марека
Вирус оспы*
Вирус респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота

* Правильный ответ.

2.2. Химический состав вирусов

2.2.1. Из чего состоят нуклеиновые кислоты?
Из капсомеров
Из остатков фосфорной кислоты
Из нуклеотидов*
Из рибозы
2.2.2. Из чего состоит капсид?
Из белков*
Из липидов
Из нуклеотидов
Из азотистых оснований
2.2.3. Что располагается на поверхности вирусной частицы?
Белки*
Нуклеиновые кислоты
Азотистые основания
Остатки фосфорной кислоты
2.2.4. Как называется белковый слой вируса?
Нуклеотид
Капсид*
Капсомер
Азотистые основания

3.1. Принцип систематики

3.1.1. Кто разработал современную международную систематику вирусов?
Академик К. Львов
Международный комитет по таксономии вирусов*
Конгресс вирусологов
Д. Ивановский
3.1.2. Назовите основные таксономические уровни в систематике вирусов?
Вид, род, семейство*
Тип, класс, отряд
Штамм, вид, класс
Вид, группа, отряд
3.1.3. Какой признак является основным фундаментальным в систематике вирусов?
Антигенные свойства
Спектр патогенности
Тип нуклеиновой кислоты и стратегия вирусного генома*
Наличие суперкапсидной оболочки
3.1.4. Какое окончание согласно современной номенклатуре должно иметь семейство вирусов?
Virales
Viridae*
Virinae
Virus

3.2. Краткая характеристика основных семейств

3.2.1. Какие семейства вирусов имеют геном в виде двуспиральной ДНК?
Коронавирусы
Парвовирусы
Пикорнавирусы
Герпесвирусы*
3.2.2. Какие семейства вирусов имеют геном в виде односпиральной ДНК?
Аденовирусы
Поксвирусы
Калицивирусы
Парвовирусы*
3.2.3. Какие семейства вирусов имеют геном в виде двуспиральной РНК?
Реовирусы*
Рабдовирусы
Ортомиксовирусы
Парамиксовирусы
3.2.4. Какие семейства вирусов имеют фрагментированный геном?
Поксвирусы
Аденовирусы
Тогавирусы
Ортомиксовирусы*

4.1. Адсорбция и проникновение вирусов

4.1.1. Как называется способность вирусов размножаться в клетках определенного вида?
Агглютинация
Цитопатическое действие
Тропизм*
Виропексис
4.1.2. С чего начинается размножение вируса в клетке?
Проникновение
Адсорбция*
Депротеинизация
Репликация
4.1.3. Каким способом вирусы проникают в клетку?
Эндоцитоза*
Почкования
Разрыва оболочки
Депротеинизации
4.1.4. Что необходимо иметь вирусной частице для адсорбции вируса?
Оболочку
Жгутики
Реснички
Рецепторы (прикрепительные белки)*

4.2. Транскрипция, трансляция, репликация

4.2.1. Что образуется в результате трансляции?
Вирусные нуклеиновые кислоты
иРНК
Белки*
Полирибосомы
4.2.2. Какая стадия отсутствует при репродукции плюс-РНК-содержащих вирусов?
Депротеинизация
Транскрипция*
Трансляция
Репликация
4.2.3. Какие семейства вирусов не содержат в вирионах транскриптазу?
Поксвирусы
Иридовирусы
Аденовирусы*
Пикорнавирусы
4.2.4. Что означает термин «транскрипция»?
Проникновение вируса
Накопление нуклеиновой кислоты вируса
Переписывание информации*
Накопление вирусных белков

4.3. Формирование вирионов и выход их из клеток

4.3.1. Каким способом вирусы выходят из клетки?
Диффузией
Путем «взрыва»*
Виропексисом
Элюцией
4.3.2. Что содержит вирион?
Ядро
Рибосомы
Нуклеиновую кислоту*
Аппарат Гольджи
4.3.3. Что находится на поверхности вириона?
Остатки фосфорной кислоты
Капсомеры*
Азотистые основания
Нуклеиновые кислоты

5. Культивирование вирусов

5.1. Место размножения вируса
Вне клетки
Внутри клетки*
На питательных средах
В среде Сабуро
5.2. На чем культивируют вирусы?
На живых системах*
На питательных средах
На МПА
На МПБ
5.3. Какие живые системы имеют наибольшее преимущество для культивирования вирусов?
Естественно-восприимчивые животные
Культуры клеток*

Лабораторные животные
Куриные эмбрионы
5.4. Признаки размножения вируса в культуре клеток?
Образование оспин
Округление клеток*
Агглютинация эритроцитов
Задержка гемолиза

6.1. Мутации и их механизмы
6.1.1. Какие бывают мутации?
Спонтанные*
Простые
Сложные
Рекомбинированные
6.1.2. Что такое делеция?
Вставка нуклеотида
Выпадение нуклеотида*
Обмен нуклеотидами
Комплементация нуклеотидов
6.1.3. Что такое реверсия?
Прямая мутация
Обратная мутация*
Спонтанная мутация
Точечная мутация
6.1.4. Что получает экспериментатор в результате возникновения мутаций при пассировании вируса на живых системах?
Живые вакцинные штаммы*
Субъединичные вакцины
Генно-инженерные вакцины
Иммуномодуляторы

6.2. Рекомбинации и их механизмы
6.2.1. Что такое рекомбинация?
Изменение последовательности нуклеотидов
Изменение самих генов
Обмен генетическим материалом*
Реверсия нуклеотидов
6.2.2. Что такое межгенная рекомбинация?
Обмен участками одного и того же гена
Обмен полными генами*
Возникает при заражении клетки несколькими вирионами с поврежденными генами
Пересортировка генов
6.2.3. Что такое негенетические взаимодействия вирусов?
Множественная реактивация
Пересортировка генов
Взаимодействие на уровне продуктов генов*
Гетерозиготность
6.2.4. Какие методы селекции вы знаете?
Адаптация
Реверсия
Аттенуация
Выделение клонов из бляшек на культуре клеток*

7.1. Факторы неспецифического иммунитета
7.1.1. Что относится к неспецифическим факторам иммунитета?
Антитела
Интерферон*
Т-лимфоциты
Иммуноглобулины
7.1.2. Каков химический состав интерферона?
Аминокислота
Нуклеиновая кислота
Липиды
Белки*
7.1.3. Где локализуется ген интерферона?
В геноме клетки*
В геноме вируса
В геноме бактерии
В геноме риккетсии
7.1.4. Какие факторы неспецифического противовирусного иммунитета появляются при заражении организма?
Фагоциты
Е-киллеры
Интерферон*
Неспецифические ингибиторы

7.2. Факторы специфического иммунитета
7.2.1. Какие клетки иммунной системы синтезируют антитела?
Т-лимфоциты
В-лимфоциты*
Макрофаги
Нейтрофилы
7.2.2. Что относится к факторам специфического противовирусного иммунитета?
Е-киллеры
Интерферон
Антитела*
Лизоцим
7.2.3. Какая из указанных характеристик лучше всего определяет свойства гаптенов?
Не реагируют с АТ и неиммуногенны
Иммуногенны, но не реагируют с АТ
Реагируют с АТ, но неиммуногенны*
Иммуногенны и реагируют с АТ

* Правильный ответ.

7.2.4. Какие факторы обеспечивают формирование специфического иммунитета?
Фагоцитоз
Лизоцим
Система комплемента
Макрофаги, В-, Т-лимфоциты*
7.2.5. Какие основные клетки формируют вторичный ответ на антиген?
Лейкоциты
Е-киллеры
Макрофаги
В-, Т-клетки памяти*
7.2.6. Какие основные классы иммуноглобулинов синтезируются при вторичном ответе на антиген?
IgM
IgG*
IgA
IgD
7.2.7. Какие основные классы иммуноглобулинов участвуют в формировании местного иммунитета?
IgM
IgD
IgA*
IgG
7.2.8. Где развиваются Т-клетки?
В тимусе*
В крови
В лимфе
В легких

8.1. Патогенез на уровне организма
8.1.1. Как происходит передача вируса инфекционного гастроэнтерита свиней?
Аэрогенно
Алиментарно*
Трансовариально
Через укус
8.1.2. Какой из перечисленных вирусов передается перелетными птицами?
Вирус оспы
Вирус диареи
Вирус ринотрахеита
Вирусы гриппа*
8.1.3. Какими путями может происходить диссеминация вирусов?
По коже
По лимфе*
По слизистым оболочкам
С мочой
8.1.4. Что такое аутоиммунные вирусные инфекции?
Смешанные болезни
Секундарные инфекции
Собственные антигены принимаются за чужие*
Персистирование вируса

9.1. Специфическая профилактика
9.1.1. Что такое аттенуация вируса?
Рекомбинация
Ослабление вирулентных свойств*
Селекция
Лиофилизация
9.1.2. Какие биопрепараты создают активный иммунитет?
Гипериммунные сыворотки
Специфические γ-глобулины
Вакцины*
Молозиво
9.1.3. Каким способом получают аттенуированный штамм вируса?
Подавляют сывороткой
Концентрируют
Многократно пассируют в живой системе*
Обрабатывают детергентами
9.1.4. Какие вещества используют в качестве адъювантов:
— NaOH — NaCl
— NaCl — $Al(OH)_3$*

9.2. Неспецифическая профилактика
9.2.1. Способ неспецифической профилактики вирусных болезней?
Вакцинация
Введение иммуноглобулинов
Введение сплит-вакцин
Карантин*
9.2.2. Какие мероприятия относятся к неспецифической профилактике?
Введение гипериммунных сывороток
Дезинфекция*
Введение адъюванта
Вакцинация
9.2.3. Что такое дезинфекция?
Обеззараживание объектов*
Уничтожение непатогенных возбудителей
Уничтожение патогенных возбудителей
Предупреждение заноса возбудителей
9.2.4. Что такое карантин?
Уничтожение вирусов
Система мероприятий, позволяющих предупреждать распространение инфекционных болезней*
Проведение асептических мероприятий
Уничтожение животных в очаге особо опасных инфекций

10. Серологические реакции в вирусологии
10.1. В какой серологической реакции можно обнаружить и определить титр антител?

Прямая РИФ
Прямой ИФА
РТГА*
РНГА с использованием эритроцитарного антительного диагностикума
10.2. Что является обязательным компонентом серологической реакции?
Сыворотка*
Иммуномодулятор
Ингибиторы
Кофактор
10.3. Какие реакции не являются экспресс-методами?
РДП
РН*
РСК
РИФ
10.4. Что в серологической реакции утрачивает вирус в результате образования комплекса антиген + антитело?
Инфекционность*
Нуклеиновую кислоту
Белок
Капсид

11.1. Индикация вирусов

11.1.1. Как проводят обнаружение вируса в патологическом материале?
Обнаружением антител
Титрованием антител
Обнаружением вирусных антигенов*
Визуально
11.1.2. Что такое индикация вируса?
Определение типа вируса
Обнаружение вируса*
Титрование вируса
Серодиагностика
11.1.3. В каких реакциях проводят индикацию вируса?
РИФ*
РН
РТГА
РТГАд
11.1.4. В какой РНГА можно обнаружить вирус?
С эритроцитарным антигенным диагностикумом
С эритроцитарным антительным диагностикумом*
С эритроцитами барана
С эритроцитами морской свинки

11.2. Выделение вируса

11.2.1. Какие методы используют для выделения вирусов из патологического материала?

* Правильный ответ.

Посев на жидкие питательные среды
Посев на твердые питательные среды
Биопроба на чувствительных живых системах*
Посев на полужидкие питательные среды
11.2.2. Как проводят выделение вируса?
Микроскопией
Заражением животных*
РТГА
РИФ
11.2.3. Из чего выделяют вирус?
Мясо-пептонного агара
Мясо-пептонного бульона
Патологического материала*
Агара Сабуро
11.2.4. Как подготавливают патологический материал к лабораторным исследованиям?
Готовят 10%-ную вируссодержащую суспензию*
Обрабатывают формалином
Обрабатывают хлоридом натрия
Обрабатывают щелочью

11.3. Идентификация вирусов

11.3.1. Что означает термин «идентификация» вирусов?
Выделение вируса
Установление титра вируса
Установление вида вируса*
Обнаружение вируса
11.3.2. Каким способом идентифицируют выделенный вирус?
РГА
Посевом на питательную среду
РН*
Просмотром под микроскопом
11.3.3. Как идентифицировать вирус яшура?
РГАд
РТГА
РСК*
РГА
11.3.4. Как идентифицировать вирус бешенства?
РГАд
РНГА
РИФ*
РГА

11.4. Ретроспективная серодиагностика

11.4.1. Какой биологический материал необходим для постановки ретроспективного диагноза?
Смывы со слизистых оболочек
Кусочки паренхиматозных органов
Парные сыворотки крови*
Кусочки регионарных лимфатических узлов
11.4.2. Какие методы используют для обнаружения антител?
ДНК-зонды
Полимеразная цепная реакция
Серологические реакции*
Заражение культур клеток
11.4.3. Какой патологический материал исследуют в лаборатории с целью обнаружения антител?
Печень
Селезенку
Парные сыворотки*
Кровь
11.4.4. В какой из перечисленных реакций можно обнаружить антитела?
В РНГА с использованием эритроцитарного антительного диагностикума
В прямой РИФ
В прямой ИФА
В РДП*

12.1. Правила работы с вирусами и техника безопасности

12.1.1. Как готовят патологический материал к исследованию?
Прижигают
Кладут в питательную среду
Готовят суспензию*
Обрабатывают формалином
12.1.2. При какой температуре лучше сохраняется вирус?
При 37 °С
При 4 °С
При минус 25 °С
При минус 70 °С*
12.1.3. В каких условиях лучше сохраняется вирус?
В 50%-ном глицерине
При температуре 4 °С
При температуре минус 25 °С
Лиофильно высушенный*
12.1.4. Какой метод стерилизации самый эффективный?
Фламбирование
Дезинфицирующие растворы
Автоклавирование*
Пастеризация

12.2. Получение и транспортировка патологического материала

12.2.1. Какой патологический материал лучше брать от больных при подозрении на вирусную болезнь?
Экскреты
Смывы с пораженных слизистых оболочек*
Лимфоузлы
Сосуды
12.2.2. Как транспортируют патологический материал?
В 0,85%-ном растворе натрия хлорида
В 10%-ном растворе формалина
В 50%-ном растворе глицерина*
В физиологическом растворе
12.2.3. В чем пересылают патологический материал?
В термосе со льдом*
В контейнере
В колбах
В пробирках
12.2.4. Какие растворы используют для консервирования вируссодержащего материала (органов и тканей)?
10%-ный раствор формалина
50%-ный раствор глицерина*
Раствор Хенкса
Раствор Эрла

12.3. Этапы лабораторной диагностики вирусных болезней

12.3.1. С чего начинается вирусологическое исследование?
С идентификации вируса
С ретроспективной диагностики
С индикации вируса*
С выделения вируса
12.3.2. Какие методы из указанных относятся к экспресс-методам?
РН
РЗГАд
Биопроба
РИФ*
12.3.3. В какой реакции проводят индикацию вируса?
РТГА
РИФ*
РН
РТГАд
12.3.4. Что является одним из этапов лабораторной диагностики?
Репродукция вируса
Выделение вируса постановкой биопробы*
Хранение вируса
Транскрипция

13. Заражение и вскрытие лабораторных животных

13.1. От чего зависит выбор метода заражения лабораторных животных?
Породы животного
Возраста животного
Используемого патологического материала
Тропизма вируса*

13.2. Каким способом заражают животных при чуме плотоядных?
Подкожно
Скарификацией
Внутривенно*
Интраназально
13.3. Как заражают вирусом животных при диагностике бешенства?
Интраназально
Внутрибрюшинно
Интрацеребрально*
Внутривенно
13.4. Каковы цели использования лабораторных животных?
В качестве тест-объекта при постановке РН*
Для титрования антител в РНГА
Для ретроспективной серодиагностики
Для реакции иммунофлуоресценции

14.1. Заражение куриных эмбрионов
14.1.1. Что такое куриный эмбрион?
Оплодотворенное яйцо*
Неоплодотворенное яйцо
Зародыш
Желток и белок
14.1.2. Каким вирусом заражают куриные эмбрионы в желточный мешок?
Ньюкаслской болезни
Инфекционного ларинготрахеита птиц
Инфекционного бронхита кур
Болезни Марека*
14.1.3. Как определяют жизнеспособность куриного эмбриона?
Осмотром на свету
Вскрытием
Овоскопированием*
Визуально
14.1.4. Каким методом заражают куриный эмбрион вирусом оспы птиц?
В аллантоисную полость
На ХАО*
В желточный мешок
В амниотическую полость

14.2. Индикация вируса в куриных эмбрионах
14.2.1. Что нужно сделать, чтобы обнаружить вирус ньюкаслской болезни в курином эмбрионе?
Рассмотреть желточный мешок
Поставить РГА*
Рассмотреть ХАО
Вскрыть зародыш
14.2.2. Какие изменения в курином эмбрионе вызывает вирус инфекционного ларинготрахеита птиц?

* Правильный ответ.

Оспины на ХАО*
Помутнение аллантоисной жидкости
Карликовость зародыша
Кровоизлияния на теле зародыша
14.2.3. Что вызывает вирус инфекционного бронхита кур в курином эмбрионе?
Оспины на ХАО
Кровоизлияния на головке зародыша
Мумификацию зародыша*
Отечность ХАО

15.1. Культуры клеток и их получение
15.1.1. Когда заражают вирусом монослой культуры клеток?
На 1-й день образования монослоя*
На 5-й день образования монослоя
На 7-й день образования монослоя
На 20-й день образования монослоя
15.1.2. Какие растворы чаще используют для дезаггрегации кусочков ткани при получении первичных культур клеток?
Раствор Хенкса
Раствор хлорида натрия
Раствор трипсина*
Раствор Эрла
15.1.3. На чем готовят питательные среды для культуры клеток?
На растворе версена
На дистиллированной воде
На растворе Хенкса*
На растворе трипсина
15.1.4. Как готовят первичные культуры клеток?
Растиранием кусочков органов в ступке
Обработкой кусочков органов раствором трипсина*
Кипячением кусочков органа
Обработка кусочков органа версеном

15.2. Индикация вирусов в культуре клеток
15.2.1. Что такое гемадсорбция?
Адсорбция вируса на клетке
Адсорбция эритроцитов на зараженных вирусом клетках*
Адсорбция белков вируса на клетке
Адсорбция вирионов на поверхности эритроцитов
15.2.2. Какие признаки размножения вируса могут быть в культуре клеток?
Гемагглютинация
Цитопатическое действие*
Элюция
Флуоресценция
15.2.3. Что такое бляшка?
Группа мертвых клеток в монослое, зараженном вирусом*
Вирусные частицы в культуре клеток
Скопление вирионов в клетке
Изменение структуры клетки
15.2.4. Какие бывают виды гемадсорбции?
Округление
Фрагментация
Очаговая*
Симпластообразование

16. Титрование вирусов по инфекционному действию
16.1. Что необходимо сделать для определения инфекционного титра вируса?
Титрование в лунках
Заражение животных*
Проведение гемагглютинации
РДП
16.2. Какие методы используются для определения инфекционного титра вируса?
рН
РТГА
Биопроба на чувствительных живых системах*
РДП
16.3. По какому методу можно рассчитать инфекционный титр вируса?
Морозова
Рида и Менча*
Туревича
Муромцева
16.4. Какие разведения вируса обычно делают для определения его инфекционного титра?
Двукратные
Пятикратные
Двадцатикратные
Десятикратные*

17. Титрование вирусов по гемагглютинирующему действию
17.1. В какой реакции можно определить гемагглютинирующий титр вируса?
В РТГА
В РНГА
В ПЦР
В РГА*
17.2. Какие вирусы обладают гемагглютинирующей и гемадсорбирующей активностью?
Вирус ящура
Вирус ПГ-3 крупного рогатого скота*
Вирус респираторно-синцитиальной инфекции
Вирус ИЛТ
17.3. Как определяют гемагглютинирующий титр вируса?
РТГА
РСК
РГА*
Провести заражение животных
17.4. Что необходимо для определения гемагглютинирующего титра вируса?
Культура клеток
Эритроциты*
Куриные эмбрионы
Лабораторные животные

18.1. Электронная микроскопия вирионов вирусов
18.1.1. Каким методом исследования изучают строение вирионов?
Электронная микроскопия*
Световая микроскопия
Люминесцентная микроскопия
Визуальное исследование
18.1.2. Какие структуры имеют вирионы вирусов?
Рибосомы
Аппарат Гольджи
Цитоплазму
Капсид*
18.1.3. Какие методы окраски препарата для электронной микроскопии чаще применяют?
Морозова
Муромцева
Романовского—Гимзы
Негативное контрастирование*
18.1.4. Какую форму имеет вирион аденовируса?
Палочки
Грушевидную
Икосаэдра*
Овальную

18.2. Тельца-включения
18.2.1. Что такое тельца-включения?
Вирионы
Колонии вирионов*
Внеклеточные формы вирусов
Комплекс антиген—антитело
18.2.2. Где расположены тельца-включения?
В вирусе
Вне клетки
В ядре клетки*
В оболочке клетки
18.2.3. Какой метод окраски телец-включений общепринятый?
Фуксином
Метиленовой синью
Гематоксилин-эозином*
Кристалл-виолетом
18.2.4. Как называются вирусные тельца-включения при бешенстве?

Кербера
Морозова
Бабеша—Негри*
Муромцева

19. Реакция нейтрализации

19.1. На чем ставят РН?
В лунках
На живых объектах*
На неживых объектах
На стекле
19.2. Для какого этапа лабораторной диагностики не применяют РН?
Идентификации вируса
Титрования антител
Обнаружения антител
Индикации вируса*
19.3. По какому методу подсчитывают титр антител в РН?
Кербера*
Морозова
Бабеша—Негри
Муромцева
19.4. Какой процент защиты сыворотки живых систем принимается за титр антител?
100
50*
30
10

20. Реакция торможения гемагглютинации

20.1. Какие диагностические задачи можно решить в РТГА?
Индикация вируса
Обнаружение телец включений
Идентификация вируса*
Обнаружение вирусного генома
20.2. Эритроциты какого вида животного используют в диагностической практике для постановки РТГА с целью определения титра антител к вирусу ПГ-3 крупного рогатого скота?
Петуха
Морской свинки*
Кролика
Барана
20.3. Что происходит с эритроцитами в РТГА при образовании комплекса антиген—антитело?
Гемагглютинация
Склеивание
Оседают в виде «пуговки»*
«Зонтик»
20.4. Если не образовался комплекс антиген—антитело в РТГА, что происходит с эритроцитами?
Образуют осадок в виде «пуговки»
Гемолизируются
Образуют осадок в виде «зонтика»*
Изменяется цвет

21. Реакция диффузионной преципитации

21.1. Что является показателем образования комплекса антиген—антитело в РДП?
Отсутствие гемагглютинации
Полоса преципитации*
Свечение
Наличие гемагглютинации
21.2. В чем ставят РДП?
В агаровом геле*
В растворе версена
На живых системах
В растворе трипсина
21.3. РДП используют для всех этапов лабораторной диагностики?
Только для обнаружения вируса
Для всех этапов*
Только для обнаружения и титрования антител
Только для идентификации вируса
21.4. При отсутствии гомологичности антиген—антитело что мы видим в РДП?
Полосу преципитации
Белую полосу
Задержку гемолиза
Ничего*

22. Реакция непрямой гемагглютинации

22.1. Что является индикатором в РНГА?
Комплемент
Эритроциты барана*
Фермент
Флуорохром
22.2. Чем обрабатывают эритроциты барана для приготовления эритроцитарного диагностикума?
Акролеином*
Спиртом
Уксусной кислотой
Щелочью
22.3. Что можно установить в РНГА при использовании эритроцитарного антительного диагностикума?
Обнаружить антитела
Определить титр антител
Провести идентификацию вируса*
Определить титр вируса

* Правильный ответ.

22.4. Как проявляется положительный результат в РНГА?
Гемолиз эритроцитов
Эритроциты оседают на дно
Появляется «зонтик»*
Появляется «пуговка»

23. Реакция иммунофлуоресценции

23.1. Какие вещества используют для мечения антител в РИФ?
Фермент
Субстрат
Бензидин
ФИТЦ*
23.2. Как учитывают результат РИФ?
Визуально
Под световым микроскопом
Под люминесцентным микроскопом*
В спектрофотометре
23.3. Как обнаруживают комплекс антиген — антитело в РИФ?
Окрашиванием
Свечением*
Оседанием эритроцитов
Гемолизом эритроцитов
23.4. Что метят флуорохромом в непрямой РИФ?
Антигены
Антитела
Антивидовые антитела*
Эритроциты

24. Иммуноферментный анализ

24.1. Какое вещество используют для метки антител в ИФА?
Пероксидазу хрена*
Бензидин
Флуорохром
Родамин
24.2. Что метят в непрямом ИФА?
Специфическую сыворотку
Антивидовую сыворотку*
Антиген
Белки кролика
24.3. Как учитывают результаты ИФА?
Визуально*
Под люминесцентным микроскопом
С помощью pH-метра
Под электронным микроскопом
24.4. Какие диагностические задачи можно решать методом прямого варианта ИФА?
Определение инфекционного титра вируса
Определение титра антител
Обнаружение антител
Идентификацию выделенного вируса*

25. Полимеразная цепная реакция

25.1. Для чего используют ПЦР?
Титрования вируса
Обнаружения антител
Индикации вируса*
Титрования антител
25.2. Какие методы используют для индикации и идентификации вирусных нуклеиновых кислот?
РТГА
ПЦР*
РНГА
ИФА
25.3. Как обнаружить вирусную нуклеиновую кислоту?
В РДП
В РСК
В ПЦР*
В РТГА
25.4. Что является основным компонентом ПЦР?
Нуклеиновая кислота вируса*
Белки вируса
Агарозный гель
Бромистый этидий

26. Вирусы, вызывающие пневмоэнтериты телят

26.1. Какой из перечисленных вирусов вызывает пневмоэнтериты у телят?
Вирус болезни Ауески
Вирус ПГ-3*
Вирус ящура
Вирус болезни Тешена
26.2. Какой патологический материал берут при пневмоэнтерите телят?
Кусочек головного мозга
Мочу
Везикулярную жидкость
Кусочек легкого*
26.3. Эритроциты какого вида животного используют для РГАд при диагностике ПГ-3 крупного рогатого скота?
Барана
Кролика
Морской свинки*
Мыши
26.4. Какой экспресс-метод используют при индикации вирусов, вызывающих пневмоэнтериты телят?
РТГАg
РИФ*
РДП
РН

27.1. Вирусы гриппа

27.1.1. Какие вирусы обладают гемагглютинирующей активностью в отношении эритроцитов кур?
Ящура
Респираторно-синцитиальной инфекции
Инфекционного ринотрахеита крупного рогатог скота
Гриппа*

27.1.2. К какому семейству относятся вирусы гриппа?
Picornaviridae
Orthomyxoviridae*
Coronaviridae
Poxviridae

27.1.3. Какой из белков вириона вируса гриппа вызывает агглютинацию эритроцитов?
Матриксный (М)
Гемагглютинин*
Внутренний протеин (PB1)
Нуклеопротеин (NP)

27.1.4. Какую нуклеиновую кислоту содержат вирусы гриппа?
Двуспиральную ДНК
Односпиральную ДНК
Двуспиральную РНК
Односпиральную фрагментированную РНК*

27.2. Болезнь Ауески

27.2.1. Какой клинический признак отсутствует при болезни Ауески у свиней по сравнению с другими животными?
Кашель
Понос
Зуд*
Паралич

27.2.2. При диагностике какого заболевания применяют аллергическую пробу?
Грипп
Болезнь Ауески*
Оспа
ИРТ крупного рогатого скота

27.2.3. Животных какого вида используют для постановки биопробы на болезнь Ауески?
Мышей
Морских свинок
Хомяков
Кроликов*

27.2.4. Какие симптомы вызывает вирус болезни Ауески у крупного рогатого скота?
Истечения из носа и глаз
Зуд*
Пневмонию
Понос

28.1. Вирусные болезни крупного рогатого скота

28.1.1. Какие живые системы используют в диагностических лабораториях для выделения аденовирусов?
Лабораторных животных
Естественно-восприимчивых животных
Культуры клеток*
Куриные эмбрионы

28.1.2. Какие живые системы используют в лабораторной диагностике для выделения вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота?
Культуру клеток*
Естественно-восприимчивых животных
Куриные эмбрионы
Лабораторных животных

28.1.3. Что используют для постановки биопробы на вирусную диарею?
Жидкие питательные среды
Культуру клеток*
Лабораторных животных
Твердые питательные среды

28.1.4. Какой вирус, вызывающий пневмоэнтериты у крупного рогатого скота, обладает гемагглютинирующей активностью?
Диареи
РС-вирус
Риновирус
ПГ-3*

28.2. Вирусные болезни мелкого рогатого скота

28.2.1. Какой вирус, поражающий мелкий рогатый скот, вызывает образование афт?
Реовирус
Вирус аденоматоза овец
Вирус ящура*
Аденовирус

28.2.2. Где чаще всего расположены афты при ящуре у овец и коз?
На спине
В области венчика*
На коже в области груди
На голове

28.2.3. Какой патологический материал берут для постановки диагноза на оспу овец?
Мочу
Содержимое везикул*
Фекалии
Смывы с конъюнктивы

28.2.4. Каким образом выявляют вирионы вируса оспы у овец?
В мазках, окрашенных по Морозову*
В мазках, окрашенных по Муромцеву
В неокрашенных мазках под люминесцентным микроскопом визуально

* Правильный ответ.

29. Вирусы, вызывающие болезни у птиц

29.1. Какой из вирусов, вызывающих болезнь птиц, обладает гемагглютинирующей активностью?
Вирус гриппа*
Вирус болезни Марека
Вирус ИЛТ
Вирус герпеса индеек

29.2. К какому роду относится вирус гриппа кур?
К роду А*
К роду В
К роду С
К роду Тогото

29.3. К какому семейству относится вирус ИБК?
Poramyxoviridae
Reoviridae
Coronaviridae*
Orthomyxoviridae

29.4. К какому семейству относится вирус болезни Марека?
Herpesviridae*
Parvoviridae
Retroviridae
Flaviviridae

30. Вирусы, вызывающие болезни у свиней

30.1. Какие вирусные болезни свиней вы знаете?
Ньюкаслская болезнь
Парвовирусный энтерит*
Болезнь Марека
Контагиозная эктима

30.2. При каком из перечисленных заболеваний свиней образуются «бутоны» в кишечнике?
При АЧС
При болезни Ауески
При КЧС*
При ИГС

30.3. На каком животном ставят биопробу для дифференциации болезни Ауески и болезни Тешена?
На крысе
На кролике*
На свинье
На морской свинке

30.4. Что поражается при болезни Ауески?
Головной и спинной мозг*
Кишечник
Печень
Почки

31.1. Вирусные болезни собак

31.1.1. Какие из перечисленных инфекций диагностируют у собак?
Везикулярная болезнь
Коронавирусный энтерит*
Болезнь Марека
Болезнь Тешена

31.1.2. Как проявляется аденовироз у собак?
Поносами
Параличами
Образованием пустул
Кашлем

31.1.3. Какой исследователь обнаружил вирус чумы плотоядных?
Карре*
Рубарт
Ленц
Марек

31.1.4. При каком заболевании у собак на губах образуются выросты (бородавки)?
При чуме
При парагриппе
При аденовирозе
При папилломатозе*

31.2. Вирусные болезни кошек

31.2.1. Какие вирусные болезни кошек вы знаете?
Вирусный перитонит*
Лихорадка долины Рифт
Вирусный гепатит
Контагиозная эктима

31.2.2. Какое заболевание у кошек протекает преимущественно с поражением респираторного тракта?
Лейкоз
Иммунодефицит
Ринотрахеит*
Панлейкопения

31.2.3. Какие вирусные заболевания у кошек протекают с поражением кожи?
Ринотрахеит
Оспа*
Перитонит
Кальцивирусная инфекция

31.2.4. К какому семейству относится вирус лейкемии кошек?
Picornaviridae
Flaviviridae

Retroviridae*
Poxviridae

31.3. Вирусные болезни кроликов
31.3.1. Каким из перечисленных заболеваний болеют кролики?
Геморрагической болезнью*
Гриппом
Ринопневмонией
Инфекционным ларинготрахеитом
31.3.2. Болеют ли геморрагической болезнью животные другие видов, кроме кроликов?
Да
Нет*
Редко
Определенной породы
31.3.3. Каков инкубационный период при геморрагической болезни кроликов?
Пять суток
Девять суток
Двое суток*
Четверо суток
31.3.4. При какой болезни кроликов основным клиническим признаком является студенистый отек в области головы?
При геморрагической болезни
При папилломатозе
При фиброматозе
При миксоматозе*

32. Вирусы, вызывающие болезнь лошадей
32.1. Какие вирусные болезни встречаются у лошадей?
Классическая чума
Вирусный артериит*
Ньюкаслская болезнь
Болезнь Марека
32.2. Какое вирусное заболевание лошадей сопровождается анемией?
Оспа
Ринопневмония лошадей
ИНАН*
Вирусный артериит
32.3. При каком вирусном заболевании лошадей наблюдают пожизненное вирусоносительство?
Ринопневмония
ИНАН*
Вирусный артериит
Грипп
32.4. Вирионы какого возбудителя вирусного заболевания лошадей имеют двухслойный капсид?
Ринопневмонии
Оспы
Вирусного артериита
ИНАН*

33. Решение диагностических задач на вирусные болезни телят
33.1. Какой из перечисленных вирусов вызывает пневмоэнтериты телят?
Респираторно-синцитиальный вирус*
Вирус ящура
Вируса Тешена
Вирус болезни Ауески
33.2. На чем лучше выделять вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота?
На кроликах
На куриных эмбрионах
На культуре клеток*
На белых мышах
33.3. В какой реакции проводят индикацию вирусов, вызывающих пневмоэнтериты телят?
РТГАд
РИФ*
РТГА
РН
33.4. Какой возбудитель пневмоэнтеритов телят обнаруживают с помощью РГА?
РС-вирус
Аденовирусы
Вирус ПГ-3*
Вирус ВД

34. Решение диагностических задач на вирусные болезни птиц
34.1. Какую клинику вызывает вирус болезни Марека у цыплят?
Поносы
Пневмонию
Опухоли*
Везикулы
34.2. На каких живых системах выделяют вирус оспы кур в диагностических лабораториях?
На культуре клеток крупного рогатого скота
На куриных эмбрионах*
На белых мышах
На кроликах
34.3. Какой вирус птиц вызывает образование на коже везикул?
Ньюкаслской болезни
ИЛТ
ИБК
Оспы*

* Правильный ответ.

34.4. С каким вирусом птиц можно поставить РГА?
ИЛТ
Инфекционного бурсита кур
Гриппа*
Болезни Марека

35. Лабораторная диагностика оспы
35.1. Каким реактивом окрашивают препараты для обнаружения вирионов вируса оспы?
Аммиачным серебром*
Хлоридом натрия
Уксусной кислотой
Перекисью водорода
35.2. На чем выделяют вирус оспы кур?
На белых мышах
На морских свинках
На культуре клеток почек теленка
На куриных эмбрионах*
35.3. Как заражают куриные эмбрионы при диагностике оспы?
В аллантоисную полость
На ХАО*
В желточный мешок
В амнион
35.4. Какие признаки размножения вируса оспы в курином эмбрионе?
Кровоизлияния на теле зародыша
Очаги некроза на ХАО*
Положительная РГА с аллантоисной жидкостью
Кровянистый цвет аллантоисной и амниотической жидкостей

36. Лабораторная диагностика ящура
36.1. Какую клинику вызывает вирус ящура у свиней?
Пневмонию
Зуд
Афты*
Параличи
36.2. Как определяют тип вируса ящура?
РТГА
РГА
РТГАд
РСК*
36.3. Какие виды животных болеют ящуром?
Лошади
Кошки
Свиньи*
Кролики
36.4. Сколько серотипов имеет вирус ящура?
Семь*
Два
Один
Девять

37. Лабораторная диагностика бешенства
37.1. Какие из нижеперечисленных вирусов вызывают заболевания у человека и животных?
Болезни Марека
Ньюкаслской болезни
Бешенства*
Инфекционного ринотрахеита
37.2. К какому из указанных семейств принадлежит вирус бешенства?
Пикорнавирусы
Поксвирусы
Рабдовирусы*
Тогавирусы
37.3. Какие тесты наиболее эффективны при диагностике бешенства?
РСК
РИФ*
РН
Обнаружение телец Ленца
37.4. Какой основной путь заражения бешенством?
Через поврежденную кожу (укус)*
Алиментарный
Воздушно-капельный
Вертикальный

38. Решение диагностических задач на вирусные болезни свиней
38.1. Какую клинику вызывает вирус болезни Тешена у свиней?
Понос
Пневмонию
Пустулы
Параличи*
38.2. Как можно дифференцировать вирус болезни Тешена и вирус болезни Ауески?
Заражением кролика*
В РТГА
В РГАд
В РГА
38.3. Каким из перечисленных заболеваний болеют свиньи?
Ньюкаслская болезнь
Болезнь Гамбора
ИГС*
Болезнь Марека
38.4. Какой процент гибели при АЧС?
До 50
До 90
До 30
До 60

39. Решение диагностических задач на вирусные болезни собак

39.1. Какой патологический материал обычно берут от больных собак при подозрении на чуму?
Мочу
Лимфоузлы
Смывы со слизистых оболочек носа*
Кусочки головного мозга

39.2. Можно выделить аденовирус собак на культуре клеток?
Можно*
Нельзя
Только на животных
Только на щенках

39.3. Какой из перечисленных вирусов собак не обладает гемагглютинирующей активностью?
Вирус бешенства
Вирус папилломатоза*
Вирус парагриппа
Вирус парвовирусного энтерита собак

39.4. Какое еще название имеет инфекционный гепатит собак?
Парвовирусная инфекция
Аденовирусная инфекция*
Коронавирусная инфекция
Реовирусная инфекция

---

* Правильный ответ.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В УЧЕБНИКЕ

А — приставка (перед гласными буквами АН); в словах древнегреческого происхождения, применяемая в значении «не» или «без», например ареактивность — неспособность участвовать в реакции, анорексия — отказ от корма.

Аборт — преждевременные роды, выкидыш плода у самок; наблюдается при ряде инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. С. 237, 364.

Авидность — мера прочности связывания антител с антигеном, определяемая как аффинностью взаимодействия между эпитопами и активными центрами антител, так и валентностью антител и антигена. С. 140.

Адаптация — приспособление, например, некоторых вирусов к размножению в слабочувствительных или нечувствительных клетках. С. 58, 347.

Адъювант — вещества и их комплексы, неспецифически усиливающие реакцию на антигены. Усиление иммунного ответа при использовании адъювантов связано с депонированием антигена и дополнительной стимуляцией клеток иммунитета. С. 117.

Аденин (А) — пуриновое основание, комплементарное тимину и урацилу. Одно из азотистых оснований, входящих в состав ДНК или РНК. С. 35, 39, 56.

Алиментарный (лат. alimentarius — пищевой), например, алиментарный путь заражения животных через пищеварительный тракт наблюдается при многих инфекционных болезнях. С. 22, 90.

аминоацил-тРНК — молекула тРНК, к 3′-концу которой присоединена специфическая аминокислота. С. 39.

Аминоацильный сайт (А-центр) — участок рибосомы, связывающий аминоацил-тРНК в процессе трансляции. С. 39.

Аминокислота — мономерная единица («строительный белок») белковых молекул. С. 13, 28, 38.

Анемия — малокровие. Подразделяется на алиментарную (незаразную) и инфекционную, например, при инфекционной анемии лошадей. С. 248.

Антикодон — триплет нуклеотидов в молекуле тРНК, комлементарный нуклеотидам специфического кодона в молекуле иРНК. С. 38.

Антипараллельная ориентация — противоположная направленность (5′→3′ и 3′→5′) — цепей в двухцепочечных (двуспиральных) молекулах нуклеиновых кислот. С. 43.

Антисмысловая РНК — РНК-последовательность, комплементарная какому-то участку или всей молекуле специфической иРНК. С. 127.

Антитело — белок (иммуноглобулин), синтезируемый В-лимфоцитами в ответ на попадание в организм различных антигенов и специфически с ними взаимодействующий. С. 102, 106, 139.

Антителопродуцирующие клетки (плазматические клетки) — клетки, секретирующие антитела. Образуются в результате дифференцировки В-лимфоцитов. С. 102.

Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (АЗКЦ) — цитотоксическая реакция, основанная на распознавании клеток-мишеней киллерными клетками, несущими Fc-рецептор, при участии специфических антител. С. 101, 106, 107.

Антиген — генетически чужеродное макромолекулярное вещество (белки, полисахариды и др.), способное индуцировать иммунный ответ. С. 96, 102, 137.

Антигенный дрейф — частичное изменение (замещение) только штаммспецифических антигенных детерминант вирусных белков, приводящее к появлению новых сероваринтов внутри одного и того же серотипа. С. 298.

Антигенный шифт — полное изменение (замещение) типо- и штаммспецифических антигенных детерминант вирусных белков, приводящее к появлению новых серотипов. Так, в результате антигенного шифта у вирусов гриппа А имеется 15 серотипов по гемагглютинину (НА) и 9 серотипов по нейроминидазе (N). С. 139.

Апатогенность (непатогенный) — отсутствие способности агента вызывать заболевание. С. 113.

Апоптоз — особый тип гибели клеток, процесс генетически запрограммированного саморазрушения, принципиально отличный от некроза. С. 100.

Аттенуация — ослабление вирулентных свойств вирусов или бактерий с целью получения вакцинных штаммов, например, вакцинный вирус чумы крупного рогатого скота. С. 112, 113.

Афты — везикулярные поражения в ротовой полости, на коже вымени и др., например при ящуре животных. С. 252.

Афинность — степень прочности связи антигенной детерминанты (эпитопа) со связывающим участком (активным центром) антитела. С. 140.

Бактериофаг — вирус, индуцирующий бактерии. С. 4.

Блоттинг — перенос разделенных молекул из одной среды, например геля, на твердый носитель (бумагу, нироцеллюлозный фильтр). С. 158.

Бляшка — неокрашенные участки в культуре клеток, которые образуются при репродукции в ней вируса и представляют скопления мертвых клеток, продуктов их лизиса и самого вируса. С. 224.

Вакцины — биологические препараты, содержащие антигены, способные при введении в организм индуцировать образования протективного иммунитета против соответствующего заболевания. С. 109.

Вакцинация — искусственная иммунизация путем введения вакцин для повышения устойчивости животных к инфекционным заболеваниям. С. 109.

Везикула (лат. vesicula — пузырек) — полушаровидной формы пузырек, возвышающийся над уровнем кожи (слизистой оболочки) и заполненный прозрачным или слега опалесцирующим содержимым. С. 266.

Вектор — самореплицирующая молекула ДНК, например бактериальная плазмида, используемая в генной инженерии для переноса генов от организма-донора в организм-реципиента, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей. С. 79, 121.

Вирион — вирусная частица. С. 6.

Вироиды — патогенные агенты, состоящие только из одних очень коротких и спирализированных молекул РНК; они не имеют капсида. Вироиды являются патогенами растений, легко передаются с помощью механической инокуляции. С. 7, 23.

Вирулентность — степень патогенности микроорганизма, вируса. С. 93.

Вирус-помощник — вирулентный штамм вируса, в присутствии которого дефектный вирус может размножаться в клетке хозяина. С. 23, 29, 72.

Внеклеточная форма вируса — вирусные частицы (корпускулы) сферической, кубической или нитевидной формы, которые иногда называют элементарными тельцами, а чаще вирионами. Покоящаяся форма вируса. С. 222.

Внутриклеточная форма вируса — вирус, находящийся в клетке хозяина на любой стадии репродукции и тесно связанный с генетическим аппаратом клетки. Репродуцирующая форма вируса. С. 222.

Гаптен — небольшая химическая группа (часть антигена), которая при связывании с белком-носителем обусловливает специфичность образующих антител. Без связи с носителем гаптен не способен индуцировать иммунный ответ. С. 137.

Генная инженерия — совокупность экспериментарных процедур, позволяющих осуществлять перенос ДНК из одной клетки в другую в еще функциональной молекуле. С. 74.

Ген — транскрибируемый участок хромосомы (вирусного генома), кодирующей функциональный белок. С. 37, 121.

Геном — совокупность всех генов одного организма. С. 47.

Генетический код — истема записи генетической информации в виде последовательности нуклеотидов, в которой каждые три нуклеотида, составляющие кодон, кодируют одну аминокислоту. Состоит из 64 кодонов, кодирующих все 20 аминокислот и три терминирующих кодона. С. 35.

Генная иммунизация — индукция у организма иммунного ответа без введения антигена — путем включения в клетки гена, кодирующего белок — антиген. С. 123.

Генная терапия с использованием «антисмысловых» последовательностей — лечение in vivo генетического заболевания путем блокирования синтеза белка включением в геном нуклеотидной последовательности, комплементарной специфической иРНК. С. 127.

Гибридизация — отжиг двух полинуклеотидных цепей, часто из разных источников, с образованием ДНК/РНК- или ДНК/ДНК-гибридов, стабилизируемых водородными связями. С. 167, 169.

Гибридный ген — ген, состоящий из частей двух или нескольких генов и экспрессирующийся как единое целое с образованием гибридного (химерного) белка. С. 122.

Гибридома — гибридная клеточная линия, полученная при слиянии нормальных антителобразующих клеток (лимфоцитов) и миеломных клеток. Обладает способностью к неограниченному росту и синтезу моноклональных антител.

Гиперемия — чрезмерное переполнение кровью сосудов. С. 269.

Главный комплекс гистосовместимости (ГКГС I и II) (major histocompatibility complex, MHC) — имеющийся у всех млекопитающих комплекс генов, продукты которых в первую очередь ответственны за отторжение аллогенных трансплантатов и взаимодействие лимфоцитов с антигенпрезентирующими клетками. С. 100, 125, 126.

Гранзимы — сериновые пептидгидролазы, выделяемые Т-киллерами и NK-клетками. Проникают в клетку-мишень через перфорированные поры и индуцируют процесс апоптоза клетки. С. 100.

Гуанин (Г) — пуриновое основание, комплементарное цитозину. Одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК и РНК. С. 35, 39, 56.

Гуморальный иммунитет — иммунные реакции, обусловленные преимущественно антителами и другими гуморальными факторами. С. 101.

Гуморальный иммунный ответ — синтез антител В-клетками иммунной системы в ответ на присутствие в организме чужеродного антигена. С. 101.

Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК) — полимер, состоящий из дезоксирибонуклетотидов, видоспецифичный носитель генетической информации. С. 6.

Денатурация (1) — расхождение цепей двухцепочечной (двуспиральной) молекулы ДНК или РНК; 2) нарушение нативной конформации биологических макромолекул в результате разрушения нековалентных (водородных) связей. С. 169.

Дерепрессия — индукция транскрипции гена в результате подавления функций репрессора — блокирования его связывания с промотором. С. 98.

ДНК-зонд — фрагмент ДНК, меченный тем или иным образом и использующийся для гибридизации со специфическим участком в молекуле ДНК. Позволяет идентифицировать комлементарные ему нуклеотидные последовательности. С. 167.

ДНК-лигаза — фермент, катализирующий образования фосфодиэфирной связи между 3′-гидроксильной группой и 5′-фосфатом соседних нуклеотидов в месте одноцепочечного разрыва молекулы ДНК. С. 78, 121.

ДНК-полимераза — фермент, катализирующий синтез полинуклеотидной цепи из отдельных нуклеотидов с использованием другой цепи в качестве матрицы и ДНК-затравки со свободной 3′-ОН-группой. ДНК-полимераза I выполняет биологическую функцию при репарации ДНК. С. 29.

ДНК-полимераза Taq — термостабильная ДНК-полимераза (сохраняет активность при 95 °С) бактерии Thermus aquaticus. Часто применяется в методе ПЦР. С. 170.

Естественные киллеры (NK-клетки, ЕК-клетки) — лимфоциты, обладающие природным свойством распознавать и разрушать чужеродные агенты. Лишены маркеров Т- и В-клеток и свойственных им антигенраспознающих рецепторов. Осуществляют быстрый контактный киллинг чужеродных пролиферирующих клеток. Важные факторы противоопухолевой и противовирусной защиты, особенно на ранних этапах иммунных процессов. С. 91, 100.

Иммунитет (невосприимчивость) — способность организма защищать себя от веществ как инфекционной, так и неинфекционной природы, носящих для него

чужую генетическую информацию, с целью сохранения необходимого для существования гомеостаза. С. 94.

Идиотип— антигенная характеристика вариабельной области (v-области) антител, определяемая набором идиотопов. С. 121.

Идиотоп — отдельная антигенная детермината, расположенная в V-области молекулы иммуноглобулина. С. 121.

Иммунологическая память — способность организма обеспечивать ускоренный и более эффективный ответ при повторном поступлении антигена в организм. Основой иммунологической памяти являются Т- и В-клетки памяти, формирующиеся при первичном иммунном ответе, но не принимающие в нем участия. При повторном поступлении антигена в организм клетки памяти быстро превращаются в эффекторные клетки. С. 97, 102.

Иммунные комплексы — комплексы антигена и антитела, образующиеся при взаимодействии антигенов и специфических к ним антител. В состав комплекса может входить несколько молекул обоих типов, а также могут содержаться компоненты системы комплемента. С. 235.

Иммуносупрессия — потеря способности иммунной системы организма к иммунному ответу на тот или иной антиген. С. 88.

Инаппарантный — не заметный, ни чем себя не проявляющий. С. 93.

Индуктор — небольшая молекула, связывающая с регуляторным белком-репрессором, что приводит к депрессии соответствующих генов. С. 98.

Индукция — дерепрессия гена или группы генов под действием индуктора. С. 98.

Инициация — начало синтеза биополимера. С. 38.

Инициирующий кодон — кодон АУГ в составе иРНК, кодирующий метионин (N-формилметионин у прокариот) с которого начинается (инициируется) синтез полипептидных цепей. Другое название — сигнал инициации трансляции. С. 38.

Инициирующий комплекс — структура, необходимая для инициации синтеза полипептидной цепи рибосомами. Состоит из малой (30S) субчастицы рибосомы, инициирующих факторов, формолметиониновой тРНК, ГТР и транслируемой иРНК. С. 38.

Интеграция — встраивание чужеродной ДНК в хромосому хозяйской клетки. С. 30.

Интегрирующий вектор — вектор, специально сконструированный для того, чтобы с его помощью можно было встраивать (интегрировать) клонированную ДНК в геном клетки-хозяина. С. 123.

Интерферон — продукт клеток, возникший при заражении вирусом, задерживающий развитие инфекции другими вирусами. Интерферон — гликопротеид, не обладающий вирулицидными свойствами, служит важнейшим фактором при формировании неспецифической резистентности организма при вирусных инфекциях. С. 98.

Интрон — транскрибируемый участок гена, не содержащий кодонов и вырезаемый из первичного транскрипта в ходе процессинга с образованием функциональной РНК. С. 47, 385.

Капсид — белковая оболочка вирусной частицы (вириона). С. 6, 14.

Капсомеры — структурные белки вириона, формирующие капсид и имеющие название морфологические единицы. С. 14.

Кахексия — общее истощение (исхудание) организма. С. 248.

К-клетки — популяция лимфоцитов, способных лизировать клетки-мишени в реакции антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности. Обладают Fc-рецепторами. С. 101.

Клон — популяция клеток или молекул, идентичных одной родоначальной клетке или молекуле. С. 62, 123.

Клонирование — совокупность процедур, использующихся для получения клонов. С. 62, 113, 123.

Кодон — три соседних нуклеотида, кодирующих определенную аминокислоту. Всего существует 64 сочетания нуклеотидов в кодонах, 61 из них кодируют 20 аминокислот, три являются нонсенс-кодонами. С. 38.

Компетентные клетки — клетки, способные поглощать чужеродную ДНК из окружающей среды. С. 81.

Компетенция — способность бактериальных клеток воспринимать трансформирующую ДНК (обычно плазмиду). С. 123.

Комплемент — белковый комплекс сыворотки крови. Один из составляющих врожденного иммунитета, участвует в регуляции воспалительных процессов, активации фагоцитоза и литическом действии на клеточные мембраны. Активизируется взаимодействием с иммунным комплексом. С. 93.

Комплементарная ДНК, кДНК — молекула ДНК, синтезированная на РНК-матрице с участием РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы). С. 37, 44.

Культура клеток — клетки многоклеточного организма, живущие и размножающиеся вне организма — в искусственных условиях (in vitro). С. 163.

Культуры клеток первично-трипсинизированные — культуры клеток, полученные непосредственно из тканей организма и растущие in vitro. С. 163.

Культуры клеток перевиваемые — клетки, полученные из первично трипсинизированных клеток, способные к размножению вне организма неопределенно длительное время (практически неограниченно). В лабораториях их поддерживают путем периодических пересевов. С. 163.

Культуры клеток диплоидные — морфологически однородная популяция клеток, стабилизированная в процессе культивирования in vitro, имеющая ограниченный срок жизни (50 ± 10 пассажей), характеризующаяся тремя фазами роста, сохраняющая в процессе пассирования кариотип, свойственный исходной ткани, свободная от контаминантов и не обладающая туморогеннной активностью при трансплантации хомячкам. С. 163.

«Кэп» (шапочка, от англ. cap) — метилированный гуанозин на 5′-конце многих иРНК эукариот. С. 12, 38.

Лигаза — фермент, катализирующий образование фосфодиэфирных связей между соседними нуклеотидами в цепи ДНК. С. 66, 73, 78.

Лигирование — соединение двух молекул ДНК с помощью фосфодиэфирных связей; in vitro катализируется ферментом ДНК-лигазой (например, фага Т4). С. 121, 124.

Лизоцим — белковое вещество с ферментативными, бактерицидными и вирулицидными свойствами. Лизоцим содержится в слюне, слезном секрете, яйцах птиц. С. 91.

Лимфопения — уменьшение числа лимфоцитов в крови. С. 248.

Лимфокины (интерлейкины) — цитокины, вырабатываемые активированными лимфоцитами. С. 105.

Липкие концы — взаимно комплементарные одноцепочечные (односпиральные) участки ДНК, выступающие по концам двухцепочечной (двуспиральной) молекулы. Образуются в результате ступенчатых разрезов двухцепочечных ДНК. С. 68, 77, 80.

Литический цикл — размножение вируса в клетке-хозяине, оканчивающееся лизисом клетки. С. 46.

Макрофаг — крупный лейкоцит, обладающий способностью к фагоцитозу. С. 96, 101.

Матричная РНК, мРНК (информационная РНК, иРНК) — молекула РНК, в которой заключена информация об аминокислотной последовательности определенной белковой молекулы. С. 10, 35.

Матричная цепь — цепь ДНК или другой полинуклеотид, использующийся ДНК-полимеразой в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи. С. 29.

Минус-нитевая РНК — молекулы вирусных РНК, на которых синтезируется комплементарная молекула, обладающая функцией информационной РНК. С. 36.

Мишень — объект атаки. С. 11, 12, 100.

Морфогенез — комплекс последовательных биосинтетических и формообразовательных процессов, которые начинаются сразу после «раздевания» вируса и заканчиваются выходом вириона во внеклеточное пространство. С. 20.

Мутагенез — искусственное введение мутации с помощью физических или химических агентов. С. 57, 113.

Мутация — спонтанное или индуцированное изменение структуры гена. С. 49, 112.

Некроз — омертвление какой-либо части организма. С. 187.

Нуклеозид — пуриновое или пиримидиновое азотистое основание, ковалентно связанное с пятиуглеродным сахаром (пентозой). Если сахаром является рибоза, то это — рибонуклеозид, а если дезоксирибоза — дезоксирибонуклеозид С. 11.

Нуклеотид — нуклеозид, к которому присоединена одна фосфатная группа или более. Присоединение происходит по 5′-углеродному атому сахарного кольца. Нуклеозиды, связанные с рибозой, называются рибонуклеозидмонофосфатами (rNMP), рибонуклеозиддифосфатами (rNDP) или рибонуклеозидтрифосфатами (rNTP). Для нуклеозидов, связанных с дезоксирибозой, соответствующие названия таковы: дезоксирибонуклеозидмоно-, ди- и трифосфаты (dNMP, dNDP, dNTP). С. 11, 28, 77.

Обратная транскриптаза (ревертаза) — РНК-зависимая ДНК-полимераза, использующая молекулу РНК в качестве матрицы для синтеза комплементарной цепи ДНК. С. 14, 37.

Олигонуклеотид, олигомер — короткий (6—10 нуклеотидов сегмент) одноцепочесной (односпиральной) ДНК. Обычно получают химическим путем. С. 171.

Отжиг — процесс образования двухцепочечных (двуспиральных) молекул (ДНК-ДНК или ДНК-РНК) из одноцепочечных (односпиральных) полинуклеотидных комплементарных цепей. С. 169.

Пантропный — действующий на все органы и ткани, например инфекционный процесс, протекающий в организме в форме септицемии. С. 203.

Пептид — короткая цепочка аминокислот, соединенных пептидными связями. С. 98.

Первичная культура — культура клеток или тканей, полученная непосредственно от организма. С. 163.

Первичный транскрипт — молекула РНК, транскрибированная с эукариотического структурного гена и не подвергшаяся процессингу, т. е. содержащая все экзоны и интроны.

Перфорин — белок гранул цитотоксических клеток (Т-киллеров и NK-клеток), гомологичный С9-компоненту комплемента. Образует в мембране клеток-мишений поры; клетка насыщается водой, набухает и лизируется. Через поры в клетку попадают гранзимы, индуцирующие ее апоптоз. С. 100.

Пепломеры — структурные белки вириона, формирующие наряду с липидами и углеводами клетки суперкапсидную оболочку сложных вирусов. С. 14.

Персистенция — длительное сохранения возбудителя в организме хозяина. С. 374.

Пиримидины — один из двух типов азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот. К перимидинам относятся тимин, цитозин, урацил. Второй тип оснований — пурины; к ним относятся аденин и гуанин. С. 53, 55.

Плазмида — внехромосомный генетический элемент, способный к длительному автономному существованию и репликации. Обычно это двухцепочечная (двуспиральная) кольцевая ДНК длиной от 1—200 т.п.н. С. 74, 121.

Плюс-нитевая РНК — молекула вирусных РНК, обладающая функцией информационных РНК. С. 12, 36.

Полинуклеотид — линейный полимер, состоящий из 20 и более нуклеотидов, соединенных друг с другом фосфодиэфирными связями. Полинуклеотидами являются, например, молекулы ДНК и РНК. С. 78.

Полипептид — линейный полимер, состоящий из аминокислот, соединенных друг с другом пептидными связями, например белковая молекула. С. 14, 39.

Полисома (полирибосома) — комплекс, образующийся между молекулой иРНК и рибосомами, число которых зависит от размера молекулы иРНК. Полисомы активно участвуют в синтезе полипептидов. С. 39.

Посттрансляционная модификация — изменение структуры белковых молекул после завершения их синтеза рибосомами. К таким модификациям относятся: фосфорилирование, гликозилирование, окисление цистеина, отщепление сигнальных последовательностей и т.д. С. 40, 41.

Праймер — короткий олигонуклеотид, который гибридизируется с матрицей и служит затравкой при ее копировании. С. 169.

Презентация (представление) антигена — процесс, состоящий в предварительном расщеплении антигена внутри антигенпрезентирующей клетки, связывания образующихся пептидов (эпитопов) со специальными участками молекул белков главного комплекса гистосовместимости и экспрессии образующегося комплекса на поверхности клетки. С. 104.

Провирус — состояние вируса, при котором он интегрирован с хромосомой клетки хозяина и в таком виде передается от одного поколения клеток другому. С. 6, 30.

Прокариоты — организмы, у которых нет ограниченных мембранами ядра и органелл. К прокариотам относятся бактерии. С. 38.

Промотор — участок молекулы ДНК, с которым связывается РНК-полимераза, что сопровождается инициацией транскрипции соответствующих генов. С. 35, 47, 123.

Протеиназы — ферменты, расщепляющие пептидные связи в белковых молекулах. С. 40.

Протективная активность антигена — способность антигена обеспечить развитие устойчивости иммунизированного организма к последующему инфицированию данным вирусом. С. 184.

Процессинг — совокупность процессов образования зрелых молекул РНК и белков в клетке. Включает ряд последовательных расщеплений молекулы-предшественника эндонуклеазой или протеиназами. С. 97.

Пурины — один из двух типов азотистых оснований, входящих в состав нуклеиновых кислот. К одному из них относятся аденин и гуанин, к другому — тимин, урацил, цитозин. С. 53, 54.

Рамка считывания — один из трех возможных способов считывания нуклеотидной последовательности в виде триплетов. Открытая рамка считывания не содержит терминирующих кодов и может транслироваться в белок. С. 82, 83.

Реактивность — способность сопротивляться, противодействовать, давать реакции. С. 93, 223.

Реассортация — обмен генами между близкородственными вирусами, например, при инфицировании ими одного хозяина. С. 69, 298.

Реверсия — возвращение свойств вакцинного штамма вируса к исходным (чаще вирулентным) свойствам. С. 114, 115, 346.

Регуляторный белок — белок, «включающий» или «выключающий» транскрипцию. С. 37

Рекомбинантная ДНК — молекула ДНК, полученная объединением in vitro разнородных вместе нигде в природе не существующих фрагментов ДНК. С. 121.

Рекомбинантная плазмида — плазмида, измененная методами генной инженерии. Состоит из участков разных плазмид либо содержит сегменты ДНК других организмов. С. 121.

Рекомбинантный белок — белок, кодируемый клонированной рекомбинантной ДНК. С. 122.

Репликативные формы нуклеиновых кислот (РФ) — структура молекулы нуклеиновой кислоты во время ее репликации. Термин наиболее часто употребляют для обозначения двухцепочечных (двуспиральных) промежуточных продуктов, образующихся при репликации вирусных одноцепочечных (односпиральныых) молекул ДНК и РНК. С. 42, 222, 233.

Репликация — процесс самовоспроизведения (синтеза) ДНК. Для вирусов — это синтез молекул нуклеиновой кислоты, гомологичных вирусному геному. С. 30, 42.

Репрессия — механизм регуляции генов. Состоит в подавлении транскрипции или трансляции путем связывания белка-регулятора с оператором. С. 98.

Репрессор — белок, связывающийся с оператором или промотором данного гена и блокирующий связывание с этими элементами РНК-полимеразы.

Рестриктаза — фермент, расщепляющий двухцепочечную (двуспиральную) молекулу ДНК в специфических сайтах. С. 121.

Рибозим — молекула РНК, обладающая ферментативной активностью. С. 128.

Рибонуклеиновая кислота — нуклеиновая кислота, состоящая из рибонуклеотидов, у которых сахаром является рибоза, а один из пиримидинов — урацил (вместо тимина). С. 6.

Рибосома — клеточная органелла, рибонулеопротеидная частица, при участии которой осуществляется синтез белка (трансляция). Состоит из двух субчастиц: большой и малой. С. 6.

РНК-полимераза — фермент, осуществляющий синтез РНК из рибонуклеозидтрифосфатов. Матрицей может служить ДНК или РНК. Соответствующие РНК-полимеразы называют ДНК- или РНК-зависимыми. С. 12, 29.

Сайт встраивания — специфический участок векторной молекулы, в который встраивают фрагмент чужеродной ДНК. Очень часто это уникальный сайт рестрикции. С. 123.

Сайт узнавания (рестрикции) — полиндромные последовательности, которые узнаются рестрицирующими эндонуклеазами. С. 78.

Синцитиообразование — свойства некоторых вирусов вызывать «расплавление» мембран клеток, приводящее к их слиянию и образованию многоядерных клеток-синцитиев. С. 373, 376.

Скрининг — метод или комплекс методов идентификации единичного объекта (особи в популяции, клетки с искомыми свойствами, участка нуклеотидной последовательности и т. д.) путем перебора большого числа объектов. С. 82, 132.

Сплайсинг — вырезание из предшественника иРНК интронов и ковалентное соединение экзонов с образованием зрелых молекул иРНК. С. 47.

Структурный ген — ген, кодирующий какой-либо белок. С. 48.

Субъединица белковая — идентичные полипептидные молекулы, из которых состоят капсомеры и которые обладают способностью к самосборке. С. 14.

Субъединичная вакцина — вакцина, содержащая лишь отдельные компоненты патогенного агента. С. 119.

Супрессорные Т-клетки (Тс) — функционально особые популяции Т-клеток, подавляющие иммунный ответ других Т- или В-клеток или же направляющие ответ по другому пути (переключение типа ответа). С. 104.

Субкультура — однослойная культура клеток, полученная в результате пересева первично-трипсинизированной культуры. Для этой цели культуру снимают с помощью версена или трипсина, ресуспендируют (помещают) в новой питательной среде и разливают в соответствующую посуду. С. 373, 376.

Субстрат — вещество, превращение которого катализируется специфическим ферментом. С. 154.

Суперкапсид — наружная оболочка сложных вирусов. С. 14.

ТАТА-бокс — участок, располагающийся в промоторной области генов эукариот за 25 нуклеотидов до сайта инициации транскиприции, с которым связывается РНК-полимераза. Другое название — **бокс Хогнесса.** Аналогом у прокариот служит **бокс Прибнова.** С. 35.

Терминация — остановка синтеза макромолекулы. С. 39.

Терминирующий кодон — кодон, определяющий окончание (терминацию) синтеза полипептидной цепи. Обычно это кодоны УАА, УАГ и УГА. С. 39.

Тимин (Т) — пиримидиновое основание; одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК. С.35, 57.

Т-клетки — лимфоциты, играющие ключевую роль в иммунном ответе. С. 101.

Толерантность — состояние специфической иммунологической ареактивности. С. 140, 341.

Трансгенный организм — организм, геном которого содержит чужеродный генетический материал, включенный методами генной инженерии. С. 76.

Трансгеноз — введение чужеродного гена в растительную или животную клетку и его передача в ряду поколений. С. 76.

Транскрипция — процесс синтеза РНК-катализируемой РНК-полимеразой, в котором в качестве матрицы используется одна из цепей ДНК или РНК. С. 12, 30, 35, 47, 99.

Транслокация — перемещение молекулы иРНК во время трансляции на один кодон. С. 39.

Трансляция — синтез полипептидной цепи рибосомой с использованием в качестве матрицы иРНК. С. 30, 99.

Транспортная РНК (тРНК) — молекула РНК, выступающая в роли адаптора при специфическом переносе аминокислот к растущей полипептидной цепи в процессе трансляции. С. 10, 38.

Трасформация клеток вирусами — изменение свойств животных клеток при заражении их онкогенными вирусами, в результате чего они превращаются в опухолевые клетки, делящиеся бесконтрольно. С. 30, 81, 91.

Тупой конец — конец двухцепочечной (двуспиральной) молекулы ДНК, у которого не выступает ни одна из цепей. С. 77, 80.

Урацил (У) — пиримидиновое основание; одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав РНК. С. 12, 35, 56.

Фагоцитоз — поглощение и переваривание фагоцитирующими клетками (макро- и микрофагами) корпускулярных частиц, в том числе бактерий, вирусов и других агентов. Различают завершенный и незавершенный фагоцитоз, когда некоторые микроорганизмы могут размножаться внутри фагоцитирующих клеток. Фагоцитоз — это и представление (презентация) чужого антигена для запуска цепи иммунных реакций, приводящих к формированию иммунитета. С. 96.

Фенотипичное смешивание — образование вирусных частиц в результате упаковки генетического материала одного штамма вируса в белковый капсид другого при смешанной инфекции. С. 71.

Флуоресцеин — флуоресцирующий краситель, часто использующийся в качестве метки антител. С. 151.

Флуорофор — химическая группа, ответственная за флуоресценцию данного соединения. С. 150.

Fc-рецепторы — молекулы поверхности разнообразных клеток, связывающиеся с Fc-фрагментом иммуноглобулинов. Специфичны к определенному классу антител, избирательны по изотипу. С. 105.

Fab-фрагмент — часть молекулы антитела, содержащая антигенсвязывающий центр. Состоит из одной легкой цепи и сегмента тяжелой цепи. Может быть получен путем ферментативного расщепления молекулы антитела. С. 105.

Fc-фрагмент — часть молекулы антитела, ответственная за связь с рецептором антител на клетках и с компонентом Cq1 комплемента. С. 105.

Хелперные Т-клетки (Тх) — Т-клетки которые оказывают «помощь» при развитии цитотоксических Т-лимфоцитов и продукции антител В-клетками. Распознают антиген, ассоциированный с молекулами, — MHC класса II. С. 104.

Химерный белок — рекомбинантный белок, состоящий из целевого белка и какого-либо стабильного белка (носителя). С. 83.

Хромогенный субстрат — вещество, приобретающее определенную окраску после расщепления специфическим ферментом. С. 154.

Цистрон — генетическая единица, эквивалентная гену, кодирующая отдельный белок. С. 40.

Цитокины — белковые продукты преимущественно активированных клеток иммунной системы. К цитокинам относятся интерлейкины, интерферон, хемокины, факторы некроза опухоли, колониестимулирующие факторы. С. 105.

Цитотоксические Т-клетки (Тц) — Т-лимфоциты, способные лизировать инфицированные вирусом клетки-мишени, экспрессирующие антигенные пептиды в комплексе с молекулами MHC класса I. С. 104.

Цитозин (Ц) — одно из четырех азотистых оснований, входящих в состав ДНК и РНК. С. 35.

Штамм — изолированный и охарактеризованный вирус, который отнесен к определенному виду. С. 23.

Экзон — участок гена, входящий в состав первичного транскрипта, который остается в нем после процессинга (вырезание интронов). Вместе с другими экзонами образует зрелую иРНК. С. 47, 385.

Экзонуклеаза III — экзонуклеаза E.coli, отщепляющая нуклеотиды с 3′-концов двухцепочечной ДНК. С. 73.

Экзоцитоз — процесс выделения содержимого гранул во внеклеточное пространство. С. 46.

Экспрессия (выражение) — реализация информации, заключенной в гене. Транскрипция и трансляция гена. С. 30.

Электропорация — образование пор в клеточных мембранах под действием электрического тока. Через эти поры в клетку проникает чужеродная ДНК. С. 81.

Элонгация. Последовательное присоединение мономеров к полимерной цепи. С. 35, 39, 169.

Эндонуклеаза — фермент, гидролизирующий внутренние фосфодиэфирные связи и расщепляющие молекулы ДНК и РНК. Эндонуклеаза участвует в рекомбинации, репарации и рестрикции, в последнем случае нее азывают рестриктазой (рестрицирующая эндонуклеаза). С. 11, 66, 77.

Эндоцитоз — включение мишени (вируса) или растворимых молекул из внеклеточной среды в состав клетки. С. 33.

Эпитоп, антигенная детерминанта — часть молекулы антигена, взаимодействующая с антигенсвязывающим центром (активным центром) антител или Т-клеточного рецептора. С. 84, 138.

Эукариоты — организмы, у которых: 1) имеется ядро, где содержатся хромосомы; 2) в цитоплазме присутствуют различные органеллы — митохондрии, хлоропласты и т. д. К эукариотам относятся животные, растения, грибы, некоторые водоросли. С. 40.

Эффекторные клетки — клетки иммунной системы, разрушающие антигены. С. 101.

ВЕЛИЧИНЫ И ЕДИНИЦЫ

1. Основные единицы СИ

Величина	Единица СИ	Сокращение	Примечание
Время	секунда	с	
Длина	метр	м	1Å = 10^{-10} м = 0,1 нм
Количество вещества	моль	моль	
Масса	килограмм	кг	
Сила тока	ампер	А	
Сила света	кандела	кд	
Температура	кельвин	K	1 °C = 273,2K

2. Производные величины

Величина	Единица	Сокращение	Размерность	Примечание
Давление	паскаль	Па	$Н/м^2$	1 бар = 10^5 Па
Концентрация	молярность	М	моль/л	
Коэффициент седиментации	сведберг	S	10^{-13} с	
Молекулярная масса	дальтон	Д	$1{,}6605 \cdot 10^{-24}$ г	
Молярная масса	грамм	г	—	
Мощность	ватт	Вт	Дж/с	
Напряжение	вольт	В	Вт/А	
Объем	литр	л	10^{-3} $м^3$	
Радиоактивность	беккерель	Бк	распад/с	1 кюри (ки) = $= 3{,}7 \cdot 10^{10}$ Бк
Размер генома	база	b	число азотистых оснований	bp = число пар азотистых оснований
Сила	ньютон	Н	$кг \cdot м \cdot с^{-2}$	
Частота	герц	Гц	$с^{-1}$	
Энергия, кол-во тепла	джоуль	Дж	Н·м	

3. Приставки и множители

Приставка	Множитель	Сокращение	Пример
Гига	10^9	Г	ГГц = 10^9 Гц
Мега	10^6	М	МПа = 10^6 Па
Кило	10^3	к	кг = 10^3 г
			кД = 10^3 Д
			kb = 10^3 b
			kbp = 10^3 bp
			кГц = 10^3 Гц

Приставка	Множитель	Сокращение	Пример
Милли	10^{-3}	м	мл = 10^{-3} л мм = 10^{-3} м мг = 10^{-3} г
Микро	10^{-6}	мк	мкл = 10^{-6} л мкм = 10^{-6} м мкг = 10^{-6} г
Нано	10^{-9}	н	нм = 10^{-9} м нг = 10^{-9} г
Пико	10^{-12}	п	пм = 10^{-12} м пг = 10^{-12} г

ОГЛАВЛЕНИЕ

История науки о вирусах. *Р. В. Белоусова* 4

Контрольные вопросы 9

Глава 1. ОБЩАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ 10

1.1. Химический состав и физическая структура вирионов *И. В. Третьякова* 10

Контрольные вопросы 22

1.2. Устойчивость вирусов к физико-химическим воздействиям *И. В. Третьякова* 22

Контрольные вопросы 23

1.3. Классификация и номенклатура вирусов. *И. В. Третьякова* 23

Контрольные вопросы 28

1.4. Репродукция вирусов. *Р. В. Белоусова* 28

Контрольные вопросы 46

1.5. Генетика вирусов. *Е. И. Аксенова* 47

1.5.1. Структурная организация генома вирусов 47

1.5.2. Наследственность и изменчивость вирусов 49

1.5.3. Генетические и негенетические взаимодействия вирусов 63

1.5.4. Механизмы репарации вирусов 73

Контрольные вопросы 74

1.6. Генная инженерия. *Н. Е. Шарапова* 74

Контрольные вопросы 89

1.7. Патогенез вирусных болезней. *Э. А. Преображенская* 90

Контрольные вопросы 93

1.8. Противовирусный иммунитет. *Р. В. Белоусова* 94

Контрольные вопросы 108

1.9. Профилактика вирусных болезней животных. *Р. В. Белоусова* 108

Контрольные вопросы 130

1.10. Химиотерапия вирусных инфекций. *Р. В. Белоусова* 131

Контрольные вопросы 136

1.11. Серологические реакции в вирусологии. *Р. В. Белоусова* 136

Контрольные вопросы 159

1.12. Принципы диагностики вирусных болезней. *Р. В. Белоусова* 159

Контрольные вопросы 175

Глава 2. ЧАСТНАЯ ВЕТЕРИНАРНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ 176
2.1. Семейство аденовирусов. *Р. В. Белоусова* 176
2.1.1. Аденовирусы крупного рогатого скота. *Р. В. Белоусова* 178
2.1.2. Аденовироз собак (CAV-2). *Э. А. Преображенская* 183
2.1.3. Вирус инфекционного гепатита собак. *Э. А. Преображенская* 185
2.1.4. Вирус синдрома снижения яйценоскости-76. *Э. А. Преображенская* 188
2.2. Семейство герпесвирусов. *Э. А. Преображенская* 191
2.2.1. Вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. *Р. В. Белоусова* 193
2.2.2. Вирус болезни Ауески. *Э. А. Преображенская* 199
2.2.3. Вирус риноптевмонии лошадей. *Э. А. Преображенская* 205
2.2.4. Вирус инфекционного ларинготрахеита птиц. *Э. А. Преображенская* 209
2.2.5. Вирус болезни Марека. *Э. А. Преображенская* 213
2.2.6. Вирус ринотрахеита кошек. *Э. А. Преображенская* 218
2.3. Семейство поксвирусов. *И. В. Третьякова* 222
2.3.1. Вирусы оспы птиц. *И. В. Третьякова* 225
2.3.2. Вирус миксоматоза кроликов. *И. В. Третьякова* 229
2.4. Семейство парвовирусов. *И. В. Третьякова* 232
2.4.1. Вирус алеутской болезни норок. *И. В. Третьякова* 234
2.4.2. Парвовирус свиней. *Э. А. Преображенская* 237
2.4.3. Парвовирус собак. *Э. А. Преображенская* 241
2.4.4. Вирус панлейкопении кошек. *Э. А. Преображенская* 246
2.5. Семейство пикорнавирусов. *Р. В. Белоусова* 249
2.5.1. Вирус ящура. *Р. В. Белоусова* 251
2.5.2. Вирус болезни Тешена. *Э. А. Преображенская* 261
2.5.3. Вирус везикулярной болезни свиней. *И. В. Третьякова* 264
2.5.4. Вирус гепатита утят. *Э. А. Преображенская* 268
2.6. Семейство калицивирусов. *Э. А. Преображенская* 271
2.6.1. Калицивирус кошек. *Э. А. Преображенская* 272
2.6.2. Вирус геморрагической болезни кроликов. *И. В. Третьякова* 274
2.7. Семейство тогавирусов. *Р. В. Белоусова* 277
2.8. Семейство коронавирусов. *Э. А. Преображенская* 278
2.8.1. Коронавирусы новорожденных телят. *Р. В. Белоусова* 280
2.8.2. Вирус инфекционного гастроэнтерита свиней. *Э. А. Преображенская* 283
2.8.3. Вирус инфекционного бронхита птиц. *Э. А. Преображенская* 290
2.8.4. Вирус инфекционного перитонита кошек. *Э. А. Преображенская* 293
2.9. Семейство ортомиксовирусов. *И. В. Третьякова* 297
2.9.1. Вирус гриппа. *И. В. Третьякова* 299
2.10. Семейство парамиксовирусов. *Р. В. Белоусова* 305
2.10.1. Вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота. *Р. В. Белоусова* 307
2.10.2. Вирус респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота. *Р. В. Белоусова* 312
2.10.3. Вирус чумы крупного рогатого скота. *Р. В. Белоусова* 315
2.10.4. Вирус ньюкаслской болезни. *Э. А. Преображенская* 320
2.10.5. Вирус чумы плотоядных. *Э. А. Преображенская* 325
2.11. Семейство рабдовирусов. *Р. В. Белоусова* 330
2.11.1. Вирус бешенства. *Р. В. Белоусова* 332

2.12. Семейство флавивирусов. *Э. А. Преображенская* 338
2.12.1. Вирус диареи крупного рогатого скота. *Р. В. Белоусова* 340
2.12.2. Вирус классической чумы свиней. *Э. А. Преображенская* 346
2.13. Семейство реовирусов. *Р. В. Белоусова* 354
2.13.1. Ротавирус диареи новорожденных телят. *Р. В. Белоусова* 356
2.14. Семейство артеривирусов. *Э. А. Преображенская* 362
2.14.1. Вирус артериита лошадей. *Э. А. Преображенская* 363
2.15. Семейство бирнавирусов. *Э. А. Преображенская* 366
2.15.1. Вирус инфекционной бурсальной болезни. *Э. А. Преображенская* 367
2.16. Семейство ретровирусов. *Э. А. Преображенская* 371
2.16.1. Вирус лейкоза крупного рогатого скота. *И. В. Третьякова* 372
2.16.2. Вирус инфекционной анемии лошадей. *Э. А. Преображенская* 377

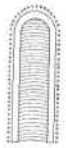
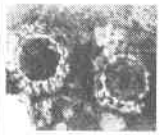
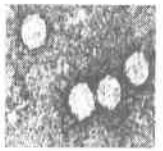
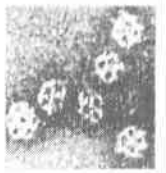
Глава 3. ПРИОННЫЕ БОЛЕЗНИ. *Р. В. Белоусова* 383

Контрольные вопросы 390

Приложения. Итоговые контрольные задания. *Р. В. Белоусова* 391

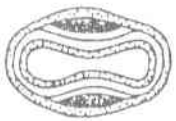
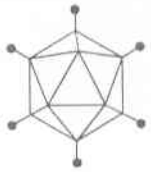
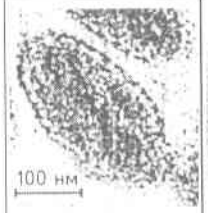
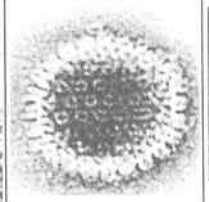
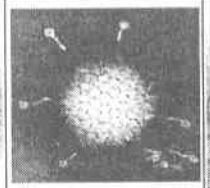
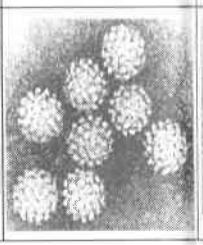
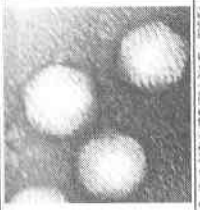
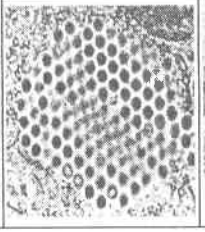
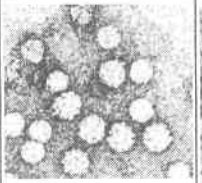
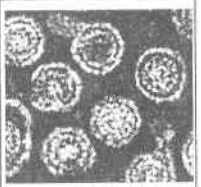
Словарь терминов, используемых в учебнике. *И. В. Третьякова* 409
Величины и единицы *И. В. Третьякова* 419

РНК-СОДЕРЖАЩИЕ ВИРУСЫ ЖИВОТНЫХ

Семейства	Reoviridae	Arteriviridae	Flaviviridae	Coronaviridae	Orthomyxo-viridae	Paramyxo-viridae	Rhabdoviridae	Retroviridae	Picornaviridae	Caliciviridae
Основные роды	Orthoreovirus Orbivirus Rotavirus	Arterivirus	Flavivirus Pestivirus Hepacivirus	Coronavirus Torovirus	Influenzavirus A Influenzavirus B Influenzavirus C	Respirovirus Rubulavirus Morbillivirus Pneumovirus Metapneumo-virus	Lyssavirus Vesiculovirus Ephemerovirus	Alpharetrovirus Betaretrovirus Gammaretro-virus Deltaretrovirus Lentivirus Spumavirus	Enterovirus Aphthovirus Rhinovirus Cardiovirus Hepatovirus	Lagovirus Vesivirus
Критерии классификации **Тип нуклеиновой кислоты, структура**	РНК двуспиральная фрагментированная	РНК односпиральная линейная	РНК односпиральная линейная	РНК односпиральная линейная	РНК односпиральная фрагментированная	РНК односпиральная линейная	РНК односпиральная линейная	РНК-димер односпиральная линейная	РНК односпиральная линейная	РНК односпиральная линейная
Полярность		Позитивная	Позитивная	Позитивная	Негативная	Негативная	Негативная	Позитивная	Позитивная	Позитивная
Тип симметрии	Кубический	Кубический	Кубический	Кубический	Спиральный	Спиральный	Спиральный	Кубический	Кубический	Кубический
Наличие оболочки	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—
Размер вириона (нм)	60—80	45—60	40—60	120—160	80—120	150 и более	100—430	80—100	22—30	27—40
Число капсомеров	122								60	
Схема вириона										
Электронная фотография										

Примечание. Семейства РНК-вирусов, не указанные в таблице: а) Bunyaviridae, Togaviridae, Astroviridae, Nodaviridae, Arenaviridae. Инфекции, вызываемые вирусами указанных семейств, регестрируются главным образом в странах Азии, Африки, Америки и важного эпизоотического значения на территории РФ не имеют, за исключением бирнавируса, вызывающего инфекционную бурсальноую болезнь птиц; б) Bornaviridae, Filoviridae, Birnaviridae и свободные роды Deltavirus, «Hepatitis E-like viruses». Вирусы указанных семейств в основном циркулируют среди людей.

ДНК-СОДЕРЖАЩИЕ ВИРУСЫ ЖИВОТНЫХ

Семейства	Poxviridae	Herpesviridae	Adenoviridae	Papillomaviridae	Polyomaviridae	Asfaviridae	Circoviridae	Parvoviridae	Hepadnaviridae
Основные роды	Orthopoxvirus Parapoxvirus Avipoxvirus Capripoxvirus Leporipoxvirus Suipoxvirus	Simplexvirus Varicellovirus «Marek's disease-like viruses» «Infections laryngotracheitis-like viruses»	Mastadenovirus Aviadenovirus	Papillomavirus	Polyomavirus	Asfavirus	Circovirus	Parvovirus Dependovirus	Orthohepadna-virus Avihepadnavirus
Критерии классификации Тип нуклеиновой кислоты, структура	ДНК двуспиральная линейная, ковалентно замкнутая	ДНК двуспиральная линейная	ДНК двуспиральная линейная	ДНК двуспиральная циркулярная	ДНК двуспиральная циркулярная	ДНК двуспиральная линейная ковалентно замкнутая	ДНК односпиральная циркулярная	ДНК односпиральная линейная	ДНК частично односпиральная циркулярная
Полярность							Негативная	Негативная или негативная и позитивная	
Тип симметрии	Сложный	Кубический	Кубический	Кубический	Кубический	Кубический	Кубический	Кубический	Кубический
Наличие оболочки	+	+	—	—	—	+	—	—	+
Размер вириона (нм)	220—450	120—200	70—90	55	40	175—215	19—26	18—26,5	40—48
Число капсомеров		162	252	72	72		32	60	
Схема вириона									
Электронная фотография									

Примечание. Семейство ДНК-вирусов, не указанное в таблице, Iridoviridae включает вирусы, выделенные от пойкилотермных животных.