План

1. Немного истории

а) поиски микроба бешенства

б) бешенство – заразное заболевание

в) заразность бешенства

2. Бешенство

3. Техника биологической пробы

1. Немного истории

Бешенство как заболевание человека и теплокровных животных известно с глубокой древности. О нем упоминают еще древние греки, египтяне. Однако в те времена авторы описывали бешенство только у собак, так как считали, что люди этой болезнью не заболевают.

Впервые о бешенстве у людей упоминает Корнелий Цельс (I век до н. э. — I век н. э.). Можно назвать немало ученых, на протяжении многих веков безрезультатно искавших средства борьбы с этим смертельным заболеванием.

О беспомощности средств, предлагаемых против бешенства, говорят исследования проф. Г. М. Вайндраха, изучавшего историю этого заболевания. Он писал: «Европа жадно прислушивалась ко всякому, кто предлагал тот или иной способ предохранения. Страх — плохой советчик, и из желания спастись и спасти своих близких шли на все.

Римлянин Цельс предлагал выжигание укушенного места каленым железом; кузнец заменял врача. Плиний Старший (23—79 годы н. э.) давал есть печень бешеного животного, Гален (131—201 годы н.э.) — глаза улиток.

Во Франции рекомендовался омлет, приготовленный на одной из створок устричной раковины, к омлету прибавлялся порошок источенного червями дуба, корня боярышника; точно указывалось, сколько надо прибавить к этой яичнице вина и молока.

В течение тысячи лет в Бельгии и Франции направляли укушенных к могилам святого VIII века Юбера; ниточка его эпитрахили, хранящейся в храме, будто бы спасала от бешенства.

В XVII и XVIII веках во Франции широко рекомендовалось средство некоей Фукс — купание в Средиземном море или океане, причем этот вид лечения признавался действительным только в первые дни после укуса.

Во Франции со времени Средневековья до начала XIX века сохранялся страшный обычай: заболевших бешенством либо обескровливали перерезкой вен на всех четырех конечностях, либо удушали между двумя матрацами. И это происходило, как видно, настолько часто, что при Наполеоне был издан закон, запрещающий под страхом смерти применять описанный варварский обычай. Однако этот закон не помогал: в 1816 году во французских журналах еще сообщалось об удавлении укушенных.

Пробовали изгонять один яд другим: укушенного бешеной собакой подвергали укусам ядовитых змей. Ничто не помогало».

Средства лечения бешенства искали ученые, искал народ, даже служители церкви предлагали свои методы.

Так, архимандрит Гаенатского монастыря Серапион предлагал для лечения бешенства... садовых жучков.

Не менее дикий способ «лечения» практиковался в Туркестане. Шаман укладывал пострадавшего плашмя на землю и перешагивал через него три раза. Во время каждого перешагивания он слегка касался пяткой своей ноги спины больного. Перешагнув три раза, шаман останавливался и трижды ударял по спине лежащего нагайкой. На этом лечение заканчивалось. Понятно, что такое «лечение» не могло помочь и зараженные бешенством люди продолжали гибнуть.

Французское правительство примерно в середине XIX века обещало большую премию за открытие лекарства против этой болезни. Были получены тысячи предложений старых и новых способов лечения, но все они— увы! — были безрезультатны.

Медицинская наука, казалось, зашла в тупик.

а) поиски микроба бешенства

Так продолжалось очень долгое время, пока французский ученый Луи Пастер не взялся за разрешение этой задачи.

Правда, до него ученые нашли, что слюна бешеного животного содержит яд бешенства, и если такую слюну ввести собаке, то она заболеет бешенством. Но все хорошо понимали, что основное убежище яда бешенства где-то в другом месте. Но где?

В 1880 году Пастер начал поиски микроба бешенства. 10 декабря 1880 года Пастера пригласили в госпиталь города Труссо, где пятилетний мальчик, укушенный собакой в лицо, умирал от бешенства. Пастер увидел, как «мучимый одновременно и страшной жаждой и ужасной боязнью всякой жидкости, он (больной ребенок) приблизил к своим губам носик накрытого чайника и вдруг отпрянул назад со сдавленным судорогою горлом, в порыве такого бешенства, что он ударил сестру, ухаживающую за ним. Он страдал, кроме того, воздухобоязнью в удивительной степени: одна его пятка высунулась как-то из-под одеяла; один из врачей дунул на нее; ребенок не видел врача, который дунул очень легко, так сказать, почти неощутимо. Несчастный ребенок впал в припадок бешенства и получил страшный спазм гортани. На следующий день начался бред и бред ужасающий. Пена наполнила его горло, задушила его».

Вскоре после смерти ребенка Пастер взял его слюну, развел ее водой и эту разбавленную слюну ввел двум кроликам под кожу. Через 36 часов после прививки оба кролика погибли. Но "ранняя гибель животных показалась Пастеру подозрительной. Кроме того, было обнаружено, что слюна здорового человека также убивает кроликов в такие же самые сроки. Не выделив возбудителя бешенства, нельзя было, и думать о дальнейшей работе. Весь громадный опыт ученого говорил ему, что раз бешенство— заразная болезнь, то должна быть и причина, се вызывающая. Надо только найти яд бешенства, а тогда он его ослабит и сделает вакцину.

Снова бессонные ночи и снова поиски. Опыты ставились один за другим. Наконец, Пастер нашел, что яд бешенства прячется в головном и спинном мозгу бешеного животного. Здесь он обнаруживался всегда. Попытки выделить яд бешенства в чистом виде, как это делал Пастер с микробами сибирской язвы, куриной холеры и другими микроорганизмами, не дали никаких результатов. Яд бешенства вне организма животного, вне клеток головного и спинного мозга не размножался.

Но одна победа была достигнута — яд бешенства, правда, не в чистом виде, а находящийся в ткани мозга, был у ученого в руках. Кроме этого, было показано, что если растереть такой кусочек мозга с какой-либо безвредной для животного жидкостью и ввести в мозг здоровому животному, то через определенный срок зараженное животное заболеет бешенством. И так получалось всегда. Ни разу Пастер не ошибался в своих предсказаниях, что животные, получившие в мозг жидкость, содержащую яд бешенства, заболеют.

Проходили годы, а поиски микроба бешенства оставались безрезультатными.

Пастер и его ученики Ру и Шамберлан находили в слюне бешеных собак самых разнообразных микробов, но никак не могли найти таинственного микроба, являвшегося, по их мнению, виновником смертельной болезни. Почему?

Дело в том, что во времена Пастера ученым еще ничего не было известно о мельчайших микроорганизмах, невидимых в обычные микроскопы и проходящих через любые бактериологические фильтры, которые задерживают обычных микробов.

Только благодаря выдающимся исследованиям русского ученого Д. И. Ивановского, доказавшего существование более мелких возбудителей болезней, было положено начало учения о вирусах, названных впоследствии фильтрующимися вирусами.

Открытие Д. И. Ивановского помогло другим ученым найти возбудителей гриппа, кори, энцефалита и других

болезней, позволило установить, что бешенство и оспа также вызываются мелкими микроорганизмами — вирусами и ближе подойти к их изучению. Изобретенный в последние десятилетия электронный микроскоп, увеличивающий в десятки тысяч и даже в сотни тысяч раз, дал возможность увидеть целый ряд вирусов и изучить их строение.

Возбудитель бешенства оказался нейротропным (развивающимся в нервной ткани) фильтрующимся вирусом.

Работами самого Пастера и других ученых было показано, что яд бешенства может находиться в крупных нервах, в слюнных железах и слюне. Но отсюда он выделялся с меньшим постоянством, чем из мозга.

Оказалось, что вирус бешенства очень неустойчив к кипячению. Кипячение убивает его через 1—2 минуты. Однако он хорошо сохраняется в гниющем материале и прекрасно выдерживает низкие температуры. В трупе, находящемся в сухой черноземной или в глинистой почве на глубине одного метра, вирус бешенства сохраняется в течение 5 недель; в мозгу павшего от бешенства животного, лежащего на поверхности земли, вирус может сохраняться от двух недель до трех месяцев в зависимости от температуры окружающего воздуха. Чем ниже температура воздуха, тем дольше выживает вирус.

б) бешенство – заразное заболевание

Бешенство— заразное заболевание. Оно может передаваться только от больного животного к здоровому животному или человеку.

Как правило, бешенство передается путем укуса, когда в образовавшуюся рану вместе со слюной больного животного попадает и вирус бешенства. Это очень опасно! Однако наличие раны почти всегда заставляет пострадавшего обратиться за помощью к врачу, который и примет все меры для предупреждения развития болезни. Хуже бывает, когда заражение происходит от соприкосновения с каким-нибудь предметом, на котором имелась слюна бешеного животного, или когда животное, не нанеся ран, ослюнило открытые части тела. Не имея непосредственного соприкосновения с бешеным животным ИЛИ не получив видимых ранений, человек, как правило, не замечает момента заражения и поэтому не обращается за помощью. Люди часто не знают, что слюна больного бешенством животного содержит активный, живой вирус бешенства за 10—15 дней до появления у этого животного первых явных симптомов заболевания. Исход в таких случаях всегда смертельный.

Наибольшую опасность в распространении бешенства представляют собаки. Они являются главным носителем вируса бешенства. От 70 до 92% всех случаев заболевания бешенством человека связано с укусами собак. Передача бешенства травоядными животными происходит гораздо реже.

Из диких животных наиболее частым хранителем вируса бешенства являются волки, шакалы и лисы. Так как волки обычно наносят обширные многочисленные повреждения, то смертность от волчьих укусов, в тех случаях когда человеку не были проведены прививки, в 20—40 раз больше, чем от укусов других животных. Это объясняется еще и тем, что волк в момент нападения старается укусить в голову, где имеется большое количество нервных окончаний. Собака же кусает, как правило, за ноги, которые в той или иной мере защищены. Но если собака укусила в голову или за кисть руки, то ее укус настолько, же опасен, как и укус волка.

Дело в том, что всякое заболевание имеет скрытый, или инкубационный, период, т. е. время, протекающее с момента попадания вируса в организм до появления первых признаков заболевания. Этот период у человека может продолжаться от 10 дней до года. Но обычно он колеблется в пределах от 15 дней до 5 месяцев. Продолжительность скрытого периода заболевания зависит от места укуса и количества попавшего в рану вируса. Чем больше в месте укуса нервных окончаний и чем больше внесено в рану вируса, тем короче инкубационный период. Наиболее опасны раны кистей рук и лица, так как именно эти части тела имеют наиболее широко разветвленную сеть нервных окончаний.

Часто задают вопрос, не может ли способствовать распространению бешенства употребление в пищу молока и мяса заболевших бешенством животных. На этот вопрос отвечает Ветеринарное законодательство СССР, в котором сказано: «...Убой на мясо животных, подозреваемых в заражении бешенством, допускается с разрешения ветеринарного врача или техника не позднее 8 дней после появления подозрения в заражении при отсутствии признаков бешенства. Мясо используется без ограничений, кроме головы, которая подлежит уничтожению. Употребление в пищу молока от животных, больных и подозрительных в заболевании бешенством, а также приготовление из него молочных продуктов не допускаются. Молоко от подозреваемых в заражении бешенством животных, получивших прививки, допускается без ограничений».

в) заразность бешенства

Первая опасность бешенства заключается в том, что все заболевшие погибают.

Вторая опасность состоит в том, что зараженное животное задолго до клинического проявления заболевания, внешне кажущееся здоровым, уже опасно для окружающих. В этот период вирус бешенства находится в слюне больного животного, которое может передавать возбудитель другим животным и человеку путем ослюнения или укуса.

Третья опасность заключается в том, что заболевшее животное в период возбуждения становится чрезвычайно подвижным и агрессивным. Больное животное в это время способно пробегать большие расстояния. Собака, например, может за сутки пробежать до 60 километров. По пути своего движения такое животное наносит укусы животным и людям, способствуя этим распространению бешенства.

Четвертая опасность состоит в том, что вирус бешенства может легко проникать в крайне ничтожные, порой даже невидимые повреждения кожного покрова или слизистых, которые были раньше или нанесены животным в момент нападения. Человек, пострадавший от такого нападения, но не получивший видимых ранений, часто не обращается к врачу, что ведет к заболеванию и гибели.

П. Ремленже описывает заражение бешенством через слизистую оболочку губы. Бешеная собака порвала пальто на мальчике, не укусив его самого. Зашивая пальто, мать оборвала нитку зубами. На губе у нее была трещина, через которую и проник вирус бешенства в организм. Два месяца спустя женщина заболела бешенством, темный угол. В этот кратковременный период болезни кошка отказывается от корма, а иногда, наоборот, поедает все, даже несъедобные предметы. В дальнейшем возбуждение быстро нарастает. Больная кошка кусает и царапает людей, набрасывается и на других животных. Паралич - наступает внезапно и начинается с поражения нижней челюсти, глотательных и лицевых мышц, а также мышц задних конечностей.

Бешенство у собак наиболее характерно проявляется при наличии буйной формы заболевания, бывает и паралитическая, или так называемая тихая, форма болезни. При заболевании бешенством, проявляющимся в буйной форме, условно различают три периода: скрытый период, или период предвестников, период возбуждения и паралитическая стадия. В первом периоде заболевания бешенством собака становится вялой, отсутствует свойственное собакам внимание, животное нередко отказывается выполнять приказы хозяина. Любой посторонний шум и яркий свет беспокоят собаку. Животное старается уединиться в темных местах, избегает общения с людьми. Однако некоторые животные проявляют в этот период заболевания повышенную ласковость, особенно к детям. Собака старается лизать руки и лицо.

Обращают на себя внимание глаза собаки, выражение которых в этот период болезни становится тупым, безразличным, иногда тоскливым или печальным. Некоторое время такая собака ест обычную, привычную для нее пищу. Однако вскоре можно заметить, что собака проглатывает самые разнообразные несъедобные предметы: щепки, камни, бумагу, землю, различный мусор. В скором времени, через день — два, у животного появляется рвота. Наступают более выраженные признаки помутнения сознания. Характерным признаком заболевания является хриплый, отрывистый, глухой лай. На месте укуса у больной собаки, по-видимому, появляются очень неприятные болевые ощущения, так как она все время покусывает, лижет и расчесывает рану.

С каждым последующим часом признаки возбуждения нарастают. Животное становится крайне опасным. Собака стремится укусить первого попавшегося. Она может укусить даже собственных щенков и своего хозяина. Цепная собака стремится сорваться с привязи, старается перегрызть ее и убежать. В таком состоянии больное животное набрасывается на целые своры собак и вступает в ними с неравную борьбу.

В этой стадии заболевания отмечаются судороги, наступает паралич мышц нижней челюсти, вследствие чего челюсть отвисает. Глаза у животного скошены, зрачки расширены, хвост опущен.

Вскоре наступает паралич глотки, и собака уже не может ни есть, ни пить. Развивается водобоязнь, очень характерная для бешенства. При одном только виде или при звуках льющейся воды наступает спазм мышц глотки. Больное животное не может сделать ни одного глотка, даже проглатывать выделяющуюся в избытке слюну. В этот период заболевания, который продолжается 3—4 дня, собака является наиболее опасной.

Последняя, паралитическая стадия заболевания характеризуется дальнейшим развитием параличей, которые распространяются на мышцы задних конечностей, прямой кишки и мочевого пузыря. Собака передвигается при помощи передних лап и очень напоминает животное, у которого перебиты позвоночник или тазовые кости. Очень быстро, в течение одного — двух дней, параличи захватывают все другие мышцы, и животное погибает на 6—8-й, иногда на 9—10-й день болезни.

Однако не всегда все признаки бешенства бывают хорошо выражены. Часто отсутствует водобоязнь. Она наступает у животного только с момента наступления паралича глотки, когда собака, потеряв возможность глотать, начинает испытывать жажду, и в этой стадии болезни один вид жидкости вызывает у нее ярость.

Во избежание грубой ошибки, которая может привести к заражению бешенством, нужно помнить, что у собак, кроме буйной формы бешенства, нередко встречается и другая форма этого заболевания — паралитическая, или тихая. В этом случае животное минует период возбуждения. У такого животного очень быстро наступают параличи всего тела, и собака погибает через 2—3 дня. При этой форме заболевания у собаки иногда бывают признаки как бы удушья, как будто в горле у нее что-то застряло. Ни в коем случае не следует такой собаке осматривать полость рта и глотки, этим самым можно подвергнуть себя смертельной опасности заражения.

2. Бешенство

Бешенство является заболеванием нервной системы почти всех млекопитающих, которое известно с древнейших времен. Оно распространено по всему миру, кроме мест, где применяются строгие карантинные и другие меры.

Этиология

• Вызывается рабдовирусом (греч. Rhabdos — палочка); пулеобраз-ный вирус с РНК и спиральным рибонуклеакапсидом покрыт ли-пидной оболочкой с выступами.

• Вирус бешенства принадлежит к роду Lyssavirus (греч. Lyssa — бешенство) семейства Rhabdoviridae.

• Долгие годы вирус бешенства считался единственным в своем роде. Обычные серологические анализы не могут сразу разделить штаммы, а антигенные вариации не так важны для иммунитета.

• По моноклональным антителам можно различать штаммы вируса по их происхождению и географической локализации.

• В Африке выделены несколько вирусов, родственных с вирусом бешенства.

• Штаммы могут различаться патогенностью в зависимости от их происхождения. Каждый вид животных обладает своей восприимчивостью к бешенству.

• Вирус чувствителен к жирорастворителям и эмульгаторам, и быстро инактивируется под воздействием большинства дезинфектан-тов, включая формалин, мыло и раствор аммония. Легко разрушается при высокой температуре и на свету, но стабилен при низкой температуре. В обычных условиях он не может долго сохранять свою заразительность, находясь вне организма хозяина.

Передача инфекции

• У инфицированных животных вирус бешенства выделяется со слюной, поэтому почти всегда передача инфекции происходит путем укусов; иногда передача происходит при ослюнении слизистой оболочки или открытых ран.

• В США зафиксированы случаи воздушно-капельного заражения летучими мышами людей, койотов и лис (но не собак и кошек).

• Экспериментально произведено оральное заражение многих видов животных — лис, скунсов и кошек, зафиксированы также случаи заражения собак, поедавших трупы инфицированных лисиц.

Патогенез

Восприимчивость животных к вирусу бешенства варьирует в очень большой степени и зависит от следующих факторов:

Вида животного

Генетики

Возраста

Штамма вируса (биотипа)

Заразительной дозы вируса

Способа заражения

Например, глубокая загрязненная рана на голове молодого животного скорее приведет к заболеванию с коротким инкубационным периодом, чем поверхностная рана на конечности у взрослого животного.

Инкубационный период

Он может быть самым различным и зависит от факторов, указанных выше. В лабораторных условиях у собак он продолжался 9-125 дней (в среднем 24 дня), а у кошек — 9-51 день (в среднем 18 дней).

Инфицированная кусанная рана

Локальное размножение вируса в миоцитах в течение недель или месяцев

Вирус распространяется от периферических нервов к ЦНС

Размножение в ЦНС — энцефалит

Вирус выходит через периферические и черпно-мозговые нервы

(Слюнные железы поверхности, Кожа, Слизистые, Кишечник, Большинство других органов)

Слюна инфицируется за несколько дней/более ---------► Смерть

В естественных условиях он составляет 1-2 месяца, но при некоторых обстоятельствах может продолжаться до полугода. У собак отмечались инкубационные периоды и большей продолжительности.

Симптомы

Клиническое течение болезни классически подразделяется на три фазы:

1. Продромальный период.

2. Возбуждение, или стадия "бешенства".

3. Паралич, или "немая"фаза.

Однако не все животные проходят все три стадии и их проявление также может быть различным.

Продромальный период

• Может продолжаться 2-3 дня у собак и 1-2 дня у кошек и характеризуется явными изменениями в поведении.

• Животные становятся беспокойными, тревожными и раздражительными, могут проявлять повышенную чувствительность к шуму и свету.

• Замкнутые животные могут стать более подвижными и дружелюбными, в то время как общительные животные становятся агрессивными и бросаются без предупреждения или впадают в депрессию и забиваются в темные места.

• У кошек чаще наблюдается агрессия.

• В начальный период может присутствовать незначительное повышение температуры и расширение зрачков с ослаблением роговичного рефлекса.

• Животные могут выгрызать место укуса.

Стадия возбуждения

• Постепенно начинает доминировать возбуждение.

• Животные становятся крайне нервозными, раздражительными и злобными, могут бросаться и кусать. Дезориентация: отсутствующее выражение глаз.

• Мышечный тремор, вялость и нарушение координации.

• Как и у людей, спазмы и отдельные параличи мышц приводят к трудностям в глотании и слюнотечению.

• Собаки могут проявлять извращенный аппетит, т.е. поедать несъедобные предметы, например, палки, у собак может начаться характерный визгливый лай из-за паралича голосовых связок.

• Фаза возбуждения может продолжаться около недели, но некоторые животные от продромальной фазы сразу приходят к параличу.

Фаза паралича

• Мышечная дискоординация и конвульсии приводят к генерализованному параличу, коме и смерти.

Атипичное бешенство/стадия носителя

Хотя обычно больные бешенством животные проходят через все клинические симптомы к смерти, есть редкие сообщения о выздоровлении. Стадия носительства отмечена у собак в Эфиопии, также есть несколько сообщений о кошках — носителях бешенства.

ПАТОЛОГИЯ

Макроскопические признаки

Минимальные патологические признаки. Тела истощенные, есть свидетельства самотравмирования, у собак в пищеварительном тракте находят инородные тела, проглоченные в период возбуждения.

Гистопатологические признаки

• Диффузный энцефалит с периваскулярными манжетами из мононуклеарных клеток и очаговый глиоз, т.е. воспалительная реакция типичная для всех негнойных инфекций головного мозга.

• Дегенерация нейронов при бешенстве относительно сильнее, чем при других вирусных инфекциях ЦНС, особенно у плотоядных животных.

• Тельца Негри. Нейроны могут содержать патогномонические, ин-трацитоплазматические включения: тельца Негри. Они могут наблюдаться в клетках нескольких областей головного мозга, но особенно заметны в гиппокампе. У здоровых кошек могут наблюдаться подобные включения в нервных клетках. Тельца Негри используются при диагностике бешенства, но в настоящее время в некоторых странах используют более современные и быстрые методы.

• Другие изменения минимальны, но могут наблюдаться ганглионеврит в паравертебральных ганглиях и дегенеративные изменения слюнных желез.

Диагностика. Предварительный диагноз можно поставить по четко выраженным отдельным симптомам болезни или по результатам наблюдения за больными животными. В этом случае подозреваемых в заболевании собак необходимо изолировать и вести клиническое наблюдение в течение 10... 14 сут. Кроме того, следует учитывать эпизоотологическую ситуацию в данной местности. Наиболее характерными клиническими признаками болезни при бешенстве собак является обильное слюнотечение, агрессивность и параличи, которые развиваются в определенной последовательности. Для подтверждения клинического диагноза необходимо провести лабораторные исследования, объективность которых зависит во многом от сроков, правильности взятия и отправки патологического материала. В лабораторию направляют свежий труп мелкого животного или голову. При постановке биопробы разрешается использование материала, законсервированного в 30...50%-м растворе глицерина. Отбор Проб проводят в соответствии с утвержденными правилами; категорически не допускается диссеминация вируса в окружающей среде. Собранный патологический материал упаковывают во влагонепроницаемую тару и помещают в металлический контейнер, с нарочным доставляют в лабораторию на исследование вместе с сопроводительным документом. В нем указывают наименование материала и адрес отправителя, вид животного и краткое описание анамнестических и клинико-эпизоотолсгических данных. В настоящее время разработаны и применяются различные диагностические методы.

Гистологический метод. Основан на обнаружении в клетках нервной ткани специфических цитоплазматических телец-включений Бабеша—Негри. Этот метод служит вспомогательным, так как не у всех животных он позволяет обнаружить тельца. Но оценке различных исследователей, тельца Бабеша—Негри не удается обнаружить в 10...50 % случаев заболевания по ряду объективных причин: длительность течения болезни, свойства возбудителя, своевременное взятие материала для исследования, правильность его хранения и доставка в лабораторию.

Из патологического материала (амоновы рога, кора больших полушарий, мозжечок, продолговатый мозг) готовят мазки-отпечатки. При изготовлении мазков не следует брать слишком большие кусочки мозговой ткани, так как при надавливании и разма-нлвании получаются толстые слои. Для окрашивания мазков используют различные методы: по Селлерсу, Морозову, Манну и др. Окрашенные препараты просматривают под световым микроскопом. Положительным результатом считают, когда обнаруживают четко очерченные овальные или продолговатые гранулярные образования диаметром 2...10мкм (тельца Бабеша—Негри) розово-красного или другого, в зависимости от красителя, цвета, расположенные в нейронах. При просмотре нередко находят сформированные тельца вне клеток; их также надо учитывать при постановке диагноза. Для дифференцирования телец Бабеша— Негри от других внутриклеточных включений, встречающихся при чуме плотоядных и инфекционном гепатите, применяют обычную окраску препаратов гематоксилин-эозином.

Реакция диффузной преципитации (РДП). Эту реакцию достаточно широко применяют для выявления антигена вируса бешенства. Сущность метода заключается в свойстве анти-, тел-преципитинов и гомологичных им антигенов диффундировать в агаровом геле и при соединении образовывать линии преципитальных комплексов антиген—антитело. Эти линии видны в проходящем свете при просвечивании осветителем снизу вверх. Вирус бешенства образует с антирабической сывороткой одну или две линии преципитации. Для постановки положительного диагноза на бешенство достаточно образование линии преципитации с материалом в одном из отделов мозга (мозжечок, кора полушарий мозга, амоновы рога, продолговатый мозг). При получении отрицательных результатов с материалом, не подвергшемся разложению, ставят биопробу на белых мышах или кроликах.

В настоящее время в целях диагностики РДП применяют как дополнительный тест из-за ограниченной его чувствительности (65...70 %). Причиной этого является низкий титр вируса в исследуемом материале; титр должен быть не ниже 4,5 lg ЛД50. В нашей стране выпускается набор компонентов для диагностики бешенства животных в реакции диффузионной преципитации (производитель ВНИИТиБП).

Метод флуоресцирующих антител (МФА). Ш всех серологических методов МФА получил широкое распространение. Основные его достоинства заключаются в высокой чувствительности (90...99%), специфичности, простоте постановки и возможности получения результатов в течение нескольких часов. По точности он сопоставим с биопробой, но превосходит ее за счет выявления антигена вируса с низким титром и вирулентностью в исследуемом материале. Сущность метода заключается в соединении меченых антител со специфическим антигеном и наблюдении светящихся комплексов антиген—антитело под люминесцентным микроскопом. Наиболее широкое распространение получил прямой метод, когда меченные ФИТЦ антирабические антитела наносят непосредственно на мазки-отпечатки, срезы мозга, монослой клеток. Непригодны для исследования пробы мозга, консервированные спиртом, формалином и другими средствами вызывающими денатурацию и разрушение антигена вируса.

Фиксируют препарат ацетоном. При исследовании под люминесцентным микроскопом антиген вируса бешенства имеет вид ярких желто-зеленых или зеленых гранул различной формы и величины, сравнимых с тельцами Бабеша—Негри, на темном серо-зеленоватом фоне.

Диагноз считают установленным, если в нескольких полях зрения обнаруживают не менее 10 типичных гранул с интенсивностью свечения не менее чем на два креста (++). Окончательный диагноз может быть поставлен на 4...8-е сутки после инфицирования мышей исследуемым материалом.

В тех случаях, когда на исследование мозг поступает загнившим, из него готовят материал и вводят по 0,05 см3 в губу белым мышам массой тела до 8 г: от павших мышей берут мозг, готовят материал и исследуют в МФА.

В нашей стране выпускается и зарегистрирован Глобулин флуоресцирующий для диагностики бешенства животных (производство ВНИИТиБП, ВНИВИ, г. Казань).

Твердофазный иммуноферментный анализ (ТФ ИФА). При диагностике бешенства диких животных во многих странах мира применяют ТФ ИФА. Многочисленными исследователями установлено, что результаты ИФА коррелируются с МФА. ИФА по чувствительности несколько уступает МФА, но его неоспоримое преимущество — меньшие затраты времени при постановке большого количества проб исследуемого материала. Твердофазный вариант ИФА проводят с осветленной центрифугированием надосадочной жидкостью суспензий гомогенатов головного мозга и слюнных желез. Материал наносят на нитроглицериновую мембрану. Положительной реакцией считают наличие на мембране пятен коричневого цвета. Этот метод позволяет обнаружить как инфекционный, так и инактивированный вирус в нативпом материале, а также хранившемся в глицерине или формалине. 11о чувствительности он уступает биологической пробе при исследовании свежего материала.

Гистохимический вариант твердофазного иммуноферментного анализа (ТФ ИФА). Иммуноферментный анализ основан на тех же принципах, что и МФА, с той лишь разницей, что в качестве маркера используют конъюгат нирусоспецифических антител или антивидовых иммуноглобулинов с ферментом (пероксидазой, уреазой, щелочной фосфатазой и др.), а не с флурогеном. Гистохимический вариант ИФА применяют в полевых условиях, позволяющий идентифицировать специфический антиген в разложившемся и консервированном матери-пле, а для учета результатов достаточно светового микроскопа.

В настоящее время широко используют иммуногистохимичес-кое окрашивание парафиновых срезов мозга с помощью монокло-пальных антител и стрептовидин-биотиновой системы для обнаружения рибонуклеопротеида вируса бешенства. С помощью этого метода можно обнаружить антиген вируса бешенства не только в нейронах, но и в ганглиях. Для обнаружения антигена вируса бешенства в срезах мозга плотоядных животных кроме авидинбиотинового комплекса используют систему пероксидаза-антипероксидаза. Окрашивание срезов мозга позволяет в цитоплазме нейронов обнаружить четкие включения коричневого цвета.

Биологическая проба. Метод биологической пробы на мышах для выделения вируса является одним из основных при постановке диагноза. О чувствительности мышей к вирусу бешенства известно с 1935 г. Высокую чувствительность к возбудителю проявляют мыши в возрасте 2...3 сут. Сущность метода заключается в выделении вируса от больных, убитых или павших животных путем введения патологического материала белым мышам и последующей его идентификацией. Результат положительной биопробы должен быть подтвержден с помощью МФА. Несмотря на то что этот метод применяют широко и он является высокочувствительным, он не лишен некоторых недостатков. Кроме необходимости использования большого числа мышей требуется продолжительное время для получения результатов: инкубационный период при заражении уличным вирусом бешенства колеблется от 1 до 25 сут, а для некоторых изолятов до 2 мес. Это, в свою очередь влияет на время получения ответа о наличии или отсутствии заболевания. Однако несмотря на эти недостатки, метод биопробы остается самым обязательным и чувствительным при исследовании патматериала при постановке диагноза.

Выделение и идентификация вируса в культуре клеток. Выделение вируса проводят в различны? культурах клеток: почки хомяка (ВНК-21), мышиной нейробластомы (С-1300) клон NNA и фибросаркомы собаки (А-72). Исследования показали высокую чувствительность ВНК-21, которая позволяет в течение 24...48 ч выделить и провести титрование уличных штаммов вируса бешенства. Известно, что клетки мышиной нейробластомы (С-1300) наиболее чувствительны к заражению и не нуждаются в адаптации уличного вируса по сравнению с другими клетками. Клетки невриномы гасерова узла крысы также позволяют получить положительный ответ через 48 ч.

Обнаружение антигена вируса бешенства проводят в МФА. Выделение вируса в культуре клеток значительно сокращает время для обнаружения возбудителя и постановки диагноза от 21...25 до 2 сут и исключают опыты на экспериментальных животных. Однако этот метод, к сожалению, не может применяться в каждой лаборатории из-за отсутствия в них культуры клеток и навыков работы с ними. Поэтому внутри мозговое заражение мышей остается надежным и достоверным методом лабораторной диагностики [3, 16].

Обнаружение генома вируса. При диагностике бешенства используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР). Она

является наиболее чувствительным методом при исследовании материала с низким титром вируса, и это дает преимущество в диагностике на ранней стадии болезни. С помощью ПЦР можно дифференцировать штаммы вируса бешенства.

Сущность этого метода заключается в обнаружении РНК вируса; диагноз может быть поставлен в течение 5...24 ч. Для ПЦР обычно используют праймеры, специфически амплифицирующие гены нуклеопротеина и другие G-гены вируса. Для исследования берут слюну, слюнную железу, спинномозговую жидкость, головной мозг.

Диагностика бешенства успешно проводится с помощью тест-системы «Рабиес» в ЦМД ФГУ ВГНКИ ветпрепаратов.

Серологическая диагностика. При серологической диагностике наибольшее распространение получила реакция нейтрализации (РН) на мышах, которая не требует дорогостоящего оборудования и материалов. Сущность этой реакции при обнаружении антирабических антител заключается в нейтрализации in vitro вируса бешенства, взятого в стандартной дозе, серийными разведениями исследуемой сыворотки. Смеси сывороток с вирусом инкубируют при 37 °С в течение 90 мин, охлаждают и вводят иптрацеребрально каждой смеси по 0,03 см3. Титр антител в сыворотке определяют по величине ее разведения, предотвращающего гибель 50 % мышей.

Профилактика. Основу профилактики бешенства составляет шачительное ограничение численности резервуаров инфекции с помощью проведения иммунизации восприимчивых к бешенству животных, включая и диких плотоядных. Ежегодно на планете пакцинируют против бешенства 50 млн собак и 50 млн других животных. Профилактика — это самый надежный и эффективный способ борьбы с бешенством.

Впервые антирабическая вакцина создана Луи Пастером в IS85 г. С момента ее создания прошло 120 лет, и за этот промежуток времени было разработано большое количество вакцин, некоторые из которых использовались в медицинской и ветеринарной практике. Так, тканевые вакцины, изготовленные из мозга кролика, овцы, козы и других экспериментально зараженных животных фиксированными штаммами вируса бешенства и hi активированные хлороформом, фенолом и солями ртути и пр., обладали выраженными недостатками. В них содержались остаточный живой вирус и большое количество балластного белка мозговой ткани, что приводило к поствакцинальным осложнениям у животных. В нашей стране длительное время применяли су-Kvio антирабическую фенолвакцину для сельскохозяйственных животных. При ее изготовлении использовали фиксированный штамм вируса бешенства «О» (овечий ВГНКИ), который вводят внутрь мозга овцам, а материалом для изготовления препарата тужил головной и спинной мозг. Приготовленный материал инактивировали фенолом, затем добавляли стабилизирующую среду и высушивали в ампулах. В 1973 г. эта вакцина по рекомендации ВОЗ была снята с производства. Следующим этапом в профилактике бешенства были живые авианизированные аттенуированные вакцины.

За период с 1948 по 1955 г. для профилактики бешенства применяли живые авианизированные аттенуированные вакцины, полученные после адаптации штаммов Флюри вируса бешенства на эмбрионах кур, а затем на эмбрионах уток. Вирус культивировали на эмбрионах кур, после чего его очищали от балластных веществ, концентрировали и использовали для приготовления инактивированной вакцины.

Инактивированные вакцины из авианизированного вируса бешенства были достаточно эффективными и ареактогенными. Эти вакцины просуществовали сравнительно недолго. Их заменили культуральные живые и инактивированные, изготовленные из различных штаммов вируса бешенства, адаптированных к различным культурам клеток. Культивирование вируса в клеточных системах позволяет получить достаточно большое количество возбудителя с высокими титрами и свести до минимума содержание балластных белков в вируссодержащей жидкости путем очистки, концентрирования вируса. При изготовлении антирабических вакцин были использованы различные культуры: клетки сирийского хомяка, эмбрионов японского перепела, почки поросенка, собаки и др.

Применение перевиваемых линий стало возможным при крупномасштабном культивировании вируса. Наиболее перспективным в производстве вакцин против бешенства оказались клетки Vero, ВНК-21. Для профилактики заболевания в большинстве стран мира разработаны и применяются живые и инактивированные вакцины, однако чаще всего инактивированные жидкие или лиофилизированные.

При изготовлении живых вакцин за рубежом используют аттенуированные штаммы вируса бешенства ERA, SAD, CVS, а для их размножения чаще всего применяют перевиваемую линию клеток ВНК-21, которая позволяет получить вирус с более высокой инфекционной активностью. Живые вакцины вызывают более прочный иммунитет по сравнению с инактивированными.

Следует отметить, что особое место среди вакцинных штаммов занимает штамм SAD, который аттенуирован 130 пассажами; через мозг белых мышей, а затем чередующим пассированием вновь через мозг белых мышей и культуру клеток почки сирийского хомяка [3, 16].

В настоящее время в нашей стране для профилактики бешенства сельскохозяйственных животных и собак рекомендованы к применению и зарегистрированы в Государственном реестре следующие отечественные и зарубежные биопрепараты:

1. вакцина антирабическая, инактивированная, сухая, культуральная из штамма Щелково-51 для собак и кошек (Рабикан). Профилактическую вакцинацию собак и кошек проводят с 2-месячного возраста однократно, с последующей ревакцинацией через каждые 2 года;

вакцина антирабическая, инактивированная, культуральная, сухая (ВНИИЗЖ). Профилактическую иммунизацию собак и кошек проводят с 2-месячного возраста, с последующей ревакцинацией через 1 год, а затем через 2 года;

2. вакцина антирабическая, инактивированная, жидкая (ВНИИЗЖ) из штамма Щелково-51. Профилактическую иммунизацию собак и кошек осуществляют однократно с последующей ревакцинацией через 1 год. Препарат вводят подкожно в области шеи;

вакцина антирабическая, культуральная, концентрированная, очищенная, инактивированная, сухая для иммунизации собак и кошек. Препарат готовят из авирулентного штамма вируса бешенства Внуково-32. Применяют для профилактической иммунизации собак и кошек. Первая вакцинация — не ранее 4-месячного возраста, вторая — через год после первичной вакцинации. Далее ежегодно. Вакцину выпускает экспериментально-производственное предприятие бактерийных и вирусных препаратов Института полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М. П. Чумакова отечественная поливакцина Мультикан-8 против чумы плотоядных, аденовирусных инфекций, парвовирусного и коронавирусного энтеритов, лептоспироза и бешенства собак. Вакцина представлена двумя компонентами: 1) лиофилизированный: аттенуированные штаммы вируса чумы плотоядных, аденовируса собак щи 2, парвовируса и коронавируса собак; 2) жидкий: инактивированные штаммы лептоспир серогрупп Каникула (штамм ИГНКИ-3), Иктерогеморрагия (штамм ВГНКИ-2) и штамм вируса бешенства (штамм ERA). Жидкий компонент служит растворителем лиофилизированного. Каждый компонент вакцины представляет самостоятельный препарат. Вакцину применяют в соответствии с инструкцией. Выпускает НПО «Нарвак»;

вакцина Дефенсор-3 производства фирмы «Пфайзер» (США). ('одержит инактивированный бета-пропилактон вируса бешенства, выращенный в культуре клеток ВНК-21. Вирус адсорбирован щ гидрооксиде алюминия. Представляет собой прозрачную или слегка опалесцирующую жидкость розового цвета. Предназначена для профилактики бешенства собак и кошек. Применяют в соответствии с инструкцией;

3. вакцина Рабизин производства фирмы «Мериал» (Франция). )ю инактивированная антирабическая вакцина из пастеровского фиксированного вируса бешенства. Вводят подкожно или внутримышечно. Входит в состав шестивалентной комбинированной вакцины для профилактики вирусных болезней собак (Гексадог);

4. вакцина Нобивак фирмы «Интервет» (Нидерланды). Представляет собой инактивированную культуру вируса бешенства бета-пропилактоном. Жидкая вакцина во флаконах по 1 см3. Активный иммунитет развивается через 10 сут после введения.

Применение живых оральных и энтеральных антирабических вакцин в нашей стране и за рубежом показало их эффективность и перспективность. Живая вакцина Синраб, производимая ФГУ ВНИИЗЖ, оказалась безвредной для собак, кошек и лисиц. Через 7 сут после ее применения у 75 % собак и 71 % лисиц отмечали выраженную сероконверсию. В различных регионах России приманки, содержащие живой вирус, используют ряд лет. В нашей стране раскладывают около 20 приманок на 1 км2, за рубежом эта плотность гораздо выше. После ее применения в ряде регионов распространение бешенства приостановлено, в других — результат получился неоднозначный. Однако многолетний опыт Швейцарии и других стран показывает, что иммунизация популяций лисиц в районах возможного распространения создает стабильное благополучие от бешенства. Очень важно при этом учитывать привлекательность и поедаемость приманок в зависимости от' вида диких плотоядных животных, напрашивается необходимость не только раскладывания приманок в ноябре и марте каждого года, но и летом, когда появляется приплод. В целом поедаемость таких приманок енотовидными собаками составляет до 80 %, у лисиц — несколько ниже.

Система контроля качества готовых отечественных и импортных препаратов идентична; стандартизированная минимальная антигенная доза равна 1 ME.

Успешная борьба с бешенством в нашей стране возможна при достаточном финансировании и реализации комплекса организационно-хозяйственных мероприятий и должном научном обеспечении.

Важнейшие организационно-хозяйственные профилактические мероприятия включают следующие положения:

налаживание четкой системы учета численности собак и кошек;

организация выгулов для собак;

отлов и уничтожение (либо стерилизация) бродячих собак и кошек;

налаживание системы утилизации трупов собак и кошек;

значительное увеличение количества вакцинированных собак и кошек, особенно в регионах, относящихся к стойким природным очагам инфекции;

разработка новых правил содержания собак и кошек в городах и других населенных пунктах России;

учет и регуляция численности диких хищников, представляющих резервуар и источник распространения бешенства;

регуляция численности диких грызунов, являющихся кормом для диких хищников;

изучение и выявление природных резервуаров вируса бешенства;

вакцинация людей, подверженных повышенному риску заражения бешенством;

вакцинация диких хищников против бешенства;

расширение санитарно-просветительской работы среди населения;

составление кадастра бешенства в России.

Важнейшие задачи по научному обеспечению проблемы борьбы с бешенством следующие:

организация комплексного мониторинга бешенства, включая компьютерный учет привитых собак, кошек и диких плотоядных животных;

создание новых генно-инженерных рекомбинантных вакцин парентерального применения;

усовершенствование и разработка антирабических вакцин для оральной иммунизации диких плотоядных животных, широкое дарение их в практику;

разработка и осуществление эпизоотологической эффективности применения вакцинных препаратов;

разработка, освоение производства и внедрение в практику отечественного антирабического иммуноглобулина для профилактики бешенства у людей;

организация центров по повышению квалификации ветеринарных специалистов в области рабиологии.

"Обнаружение телец Негри с помощью люминесцентного микроскопа (Levaditi и др., 1948)

Этот метод основан па флюоресценции телец Негри при импрегнации их флюорохромом под действием лучей с длиной волны 4000 А.

1. Ткань мозга фиксируют и заливают в парафин, как обычно. Готовят тонкие срезы, укрепляют их на стекле и проводят последовательно через ксилол, абсолютный спирт и воду для удаления парафина.

2. Затем окрашивают препарат путем погружения на 30 минут в водный 0,4% раствор тиофлавина S. Не отмывая, помещают препарат на несколько секунд в абсолютный спирт, а затем в толуол. Заключают в бальзам между предметным и покровным стеклами, накладывая как можно более тонкий слой бальзама. Необходимо сначала убедиться, что бальзам не содержит примесей, дающих флюоресценцию в ультрафиолетовых лучах.

3. Исследуют препарат в люминесцентном микроскопе с применением фильтра, отсеивающего все лучи, длина волны которых превышает 5150 А. Найдя аммонов рог под малым увеличением, исследуют его под большим увеличением, пользуясь в качестве иммерсионной среды глицерином или жидким парафином.

Тельца Негри сразу же обращают на себя внимание благодаря интенсивной флюоресценции (рис. 26 и 27) и яркой голубой окраске. Фон препарата — бледно-желтый, цитоплазма клетки — ярко-желтая, а ядрышки и эритроциты — бледно-голубые.

Следует подчеркнуть, что этот метод, основанный па особом сродстве флюоресцирующих красителей к тельцам Негри, принципиально отличен от методов иммунофлюоресценции, при котором происходит специфическая фиксация красителя на инфицированных клетках благодаря тому, что краситель предварительно конъюгирует с антителами.

3. Техника биологической пробы

Выбор мышей

Линия

Обычно для пробы можно брать белых мышей любой инбредной линии. Предпочтительно использовать белых мышей линии Swiss, так как они отличаются высокой восприимчивостью в отношении вируса бешенства и эту линию мышей легко поддерживать в лабораторных условиях. Если же достать мышей этой линии невозможно, то можно пользоваться любой разводкой мышей (за исключением серых диких мышей), так как до сих пор не было найдено линии мышей, генетически иммунных к вирусу бешенства. Работать с серыми мышами невозможно не потому, что они невосприимчивы к данному вирусу, а в связи с трудностями их содержания в клетках на протяжении периода наблюдения.

Возраст

Восприимчивость к вирусу бешенства при интрацеребральном заражении обнаруживают мыши любого возраста. Однако легче всего ставить опыт на мышах в возрасте 21—35 дней (весом 8—12 г) к моменту заражения. Имеются указания на то, что мыши-сосунки более восприимчивы к вирусу бешенства, чем взрослые мыши.

Пол

Самки и самцы в одинаковой степени восприимчивы к вирусу бешенства. Не рекомендуется содержать в одной клетке взрослых мышей одного пола, так как они убивают друг друга в драке до окончания периода наблюдения. Это особенно относится к самцам.

Общее состояние животного

Очень важно, чтобы животное, отобранные для заражения, были м хорошем состоянии. Необходимо знать историю применяемой разводки; непосредственно пород заражением рекомендуется тщательно осматривать всех животных.

При обнаружении эктопаразитов или признаков диареи брать ЖИВОТНЫХ в опыт нельзя. Если мыши присланы в лабораторию издалека, то рекомендуется отсрочить опыт хотя бы на 3 дня, чтобы животные отдохнули и привыкли к новым условиям. В подобных случаях очень важно оставить некоторое количество животных незараженными, для того чтобы получить представление о смертности среди «нормальных» (контрольных) животных и сравнить ее со смертностью среди зараженных мышей.

Приготовление материала для инокуляции

Набор ткани

Для инокуляции можно применять ткань мозга и слюнных желез животного, предположительно больного бешенством. Вирус легче обнаружить в ткани мозга, чем в ткани слюнных желез, однако с Эпидемиологической и эпизоотологической точек зрения очень важно исследовать слюнные железы на наличие вируса.

Хотя практически не имеет значения, какой участок мозговой ткани взять для приготовления суспензии, тем не менее предпочтительно использовать ткани, взятые из аммонова рога, мозжечка и коры. В опытах с тканью слюнных желез следует брать для инокуляции ткань подчелюстной железы. При работе с тканью слюнной железы желательно измельчить ее перед растиранием.

Гомогенизатор

Выбор гомогенизатора в значительной мере зависит от количества ткани, взятой для исследования. Если приходится работать с 3—4 г материала, то лучше всего воспользоваться для приготовления суспензии небольшим размельчителем Waring. Если же количество ткани, взятой для исследования, не превышает 3 г (как это обычно и бывает) или если в лаборатории нет этого приспособления, можно пользоваться одним из следующих гомогенизатор.

а) Гомогенизатор ТепВгоеск. Этот гомогенизатор удобен и прост в работе, легко моется и стерилизуется; однако им можно пользоваться только для приготовления суспензии из ткани мозга, так как ткань слюнной железы слишком плотна и не поддается гомогенизации при помощи этого прибора. Недостатком гомогенизатора является его хрупкость; при неосторожном обращении его легко разбить во время работы, мытья или стерилизации. Что касается безопасности для персонала, то и размельчитель Waring, и гомогенизатор TenBroeck обладают рядом преимуществ перед другими приспособлениями для гомогенизации ткани.

б) Ступка и пестик. Применение ступки и пестика « издавна зарекомендовавший себя метод измельчения ткани, главным преимуществом которого является то, что используя абразив (например, стерильный песок), с их помощью можно тщательно из мельчить самую плотную ткань. Работа с пестиком и ступкой не обеспечивает такой стерильности, как применение размельчителя Waring или гомогенизатора TenBroeck, однако пестик и ступка легко моются, стерилизуются и могут служить долгие годы.

Суспензионная среда

Выбор среды для приготовления суспензии может быть самым широким; предпочтительно пользоваться изотопическим соленым раствором. Следует отметить, что при применении стерильной дистиллированной воды интрацеребральное заражение иногда не удается. Приведем перечень сред для приготовления суспензии в порядке их доступности.

а) Физиологический солевой раствор с добавлением различных количеств животной сыворотки (10—50%). Это наиболее часто применяемая среда. Необходимо, однако, точно выяснить, не было ли Животное, у которого взята сыворотка, когда-либо вакцинировано прогни бешенства. Исходя из этих соображений, не следует брать сыворотку собак, кошек и рогатого скота. Нормальная баранья сыворотка обладает некоторыми «антивирусными» свойствами, отсутствующими у кроличьей сыворотки. Таким образом, лучше всего пользоваться кроличьей сывороткой, подвергнув ее предварительной инактивации в точение 30 минут (56°). Среду, содержащую сыворотку, можно стерилизовать только путем фильтрования через обычные бактериальные фильтры.

б) Другие среды:

1) снятое молоко;

2) альбумин бычьей сыворотки в буферном растворе;

3) физиологический раствор в дистиллированной воде.

Не рекомендуется широко пользоваться последней средой, хотя вирус бешенства не обладает столь высокой чувствительностью к инактивирующему действию солевого раствора, как вирусы восточного или западного энцефаломиелита лошадей.

Примечание. Если суспензия подлежит замораживанию и хранению, то в качестве суспензионной среды лучше всего пользоваться 50% раствором сыворотки в воде.

Стерильность

Если взятие ткани мозга во время аутопсии производилось с соблюдением всех правил асептики и если кусочки были присланы в лабораторию в стерильном сосуде, то нет необходимости добавлять к суспензии антибиотики. Для сохранения материала рекомендуется пользоваться 50% раствором глицерина, так как глицерин действует не только как консервант, но и как бактериостатический агент. Если же имеется какое-нибудь сомнение в том, что были соблюдены все требования антисептики, лучше добавить к суспензии некоторое количество стрептомицина и пенициллина так, чтобы получить конечную концентрацию антибиотиков 2 мг/мл и 500 ЕД/мл соответственно. После добавления антибиотиков к суспензии следует выждать 30 минут, прежде чем производить инокуляцию.

При приготовлении суспензии из ткани слюнных желез антибиотики рекомендуется добавлять во всех случаях. Независимо от того, добавляются ли антибиотики, суспензию ткани слюнных желез надо инкубировать для выявления бактериального загрязнения; в качестве среды для этой цели можно применять обычный бульон, тиогликолатпую среду и кровяной агар. При обнаружении бактериального роста надо попытаться идентифицировать микроорганизмы. Если результаты биологической пробы окажутся сомнительными, рекомендуется проверить вирулентность выделенного микроорганизма при интрацеребралыюм заражении мышей. Концентрация инфицированной ткани в суспензии

Эта концентрация может быть произвольной. Если суспензию предполагается хранить, то рекомендуется готовить ее в 20% концентрации (по весу). Умножив величину, соответствующую весу ткани в граммах, на 4, получим число миллилитров суспензионной среды. Если же хранить суспензию не предполагается и она предназначается непосредственно для иитрацеребрального заражения, то следует отдать предпочтение 10% суспензии, которую готовят либо из 20% суспензии путем добавления равного объема суспензионной среды, либо по следующему расчету: число, соответствующее весу ткани в граммах, умножают на 9 и получают необходимое количество среды в миллилитрах.

В отдельных редких случаях при попытках выделить некоторые штаммы уличного вируса бешенства приходится сталкиваться с явлением «самостерилизующейся нейроинфекции». В подобных случаях рекомендуется развести суспензию так, чтобы концентрация ее была менее 10%.

Центрифугирование и фильтрование

При наличии соответствующего оборудования рекомендуется

подвергнуть суспензию центрифугированию В течение 5 минут при 1000 об/мин для осаждения крупных частиц. Однако, если в лаборатории нет центрифуги, можно обойтись и без этой процедуры. Суспензию ткани слюнной железы (если ее не подвергали центрифугированию) необходимо профильтровать через один или два слоя стерильной марли, чтобы предупредить возможную гибель животного от травмы.

Заражение мышей

Выбор шприца

Рекомендуется пользоваться шприцем, позволяющим точно отмерить 0,03 мл (однократная мышиная доза). Наиболее пригодны для этого туберкулиновые шприцы на 0,25, 1,2 и 1 мл. Для интрацоребралыюй инокуляции необходимы иглы № 27 или 26 (0,40—0,45 мм) длиной 1 —1,5 см. Иглы большего диаметра могут привести к повреждению ткани мозга.

Наркоз

Настоятельно рекомендуется наркотизировать мышей перед инокуляцией. Лучше всего производить инокуляцию под эфирным наркозом. Для этой цели можно пользоваться сосудом с проволочным дном (рис. 35). Если такого приспособления в лаборатории нет, можно вызвать наркоз инъекцией пентабарбитала натрия. Рабочий стол, на котором производят инокуляцию, надо отодвинуть от стены так, чтобы помощник, наркотизирующий мышей, находился напротив сотрудника, производящего инокуляцию.

Методика инокуляции

Для инокуляции можно пользоваться различными методами. Автор данной главы предпочитает следующий (наиболее удобный для всех, работающих правой рукой).

Наркотизированную мышь укладывают на левый бок, задними конечностями в сторону лица, производящего инокуляцию. Большой палец левой руки поддерживает нижнюю челюсть животного, а указательный лежит позади черепа. Не следует сильно надавливать пальцами, чтобы не вызвать асфиксию и гибель животного. Взяв в правую руку шприц, придают ему горизонтальное положение, параллельно поверхности стола и перпендикулярно голове мыши, направляя иглу к себе. Быстрым движением прокалывают иглой череп животного в точке, находящейся в вершине воображаемого угла, образованного линиями, идущими от правого уха и правого глаза животного. Игла легко проникает через кость и погружается далее на 0,1—0,2 см в ткань мозга. При пользовании иглой длиной 1,5 см следует соблюдать осторожность, чтобы не провести ее слишком далеко и не попасть в область основания черепа. Продвинув пор-ПНЧ11, до 0,03, осторожно извлекают иглу. После заражения мышь надо отодвигать влево, чтобы случайно не задеть иглой палец.

Зараженную мышь следует тотчас поместить в предварительно заготовленную коробку с этикеткой, на которой указывается номер группы или делаются другие необходимые пометки. Если заражают большую группу животных, необходимо точно проконтролировать число ЖИВЫХ мышей по окончании эксперимента. При обнаружении погибших животных надо снова инокулировать и добавить в группу недостающее число мышей.

Ни в коем случае нельзя пользоваться одним и тем же шприцем при введении разных суспензий. Если в лаборатории нет необходимого числа стерильных шприцев, то между инокуляциями шприц следует кипятить; при этом надо помнить о необходимости остудить шприц перед наполнением.

Вырабатывая навык данной работы, необходимо всегда соблюдать ряд предосторожностей. Например, не рекомендуется быстро опорожнить шприц и сосуд с водой, так как при этом образуется аэрозоль, способный вызнать инфекцию через дыхательные пути кап у лица, производящего инокуляцию, так и у животных, о которыми он работает. Вирус может попасть на руки, и если их тщательно, но вымыть, то может произойти заражение последующих препаратов при их гомогенизации и приготовлении суспензии. Мышь, оставленная па столе после наркотизации, может попасть обратно в сосуд с эфиром, что приведет к его инфицированию. При дальнейшем пользовании этим же сосудом вирус может попасть на шерсть здоровых животных и в процессе последующей инокуляции «го можно занести в мозг этих животных. Рабочий стол необходимо тщательно мыть водой с мылом и дезинфицировать разведенной сулемой. Для большинства мышиных вирусов, в частности для вируса мышиного энцефаломиелита и некоторых других вирусов, такие широко применяемые антисептики, как крезол и фенол, не имеют никаких преимуществ перед обычной водой; фенол не обладает вироцидным действием в отношении вируса бешенства.

После того как инокуляция закончена, шприц и иглы необходимо промыть водой, соблюдая при этом определенные предосторожности: не следует делать слишком резких движений поршнем, а иглу нужно держать глубоко под водой. Шприц и иглы стерилизуют кипячением в течение 5 минут.

Наблюдение за мышами после заражения

Хотя вирус бешенства лишь в очень редких случаях вызывает у мышей клинические признаки раньше 5-го дня после интрацере-бральной инокуляции, тем не менее рекомендуется осматривать мышей ежедневно, начиная со следующего дня после заражения. Число нормальных, больных и погибших животных регистрируют на специальной карте, которая служит постоянным протоколом опыта.

Период наблюдения составляет не менее 21 дня после заражения. Лишь в редких случаях вирус бешенства можно обнаружить впервые позднее чем через 21 день после инокуляции. Необходимо обращать внимание на следующие симптомы: а) взъерошенная шерсть; б) тремор при поднятии животного на воздух за кончик хвоста; в) нарушение координации движений задних конечностей; г) паралич; д) прострация (терминальный симптом). Различные симптомы регистрируют на карте ежедневно с помощью буквенных символов.

Гибель животного в течение первых 24—48 часов после интрацеребрального заражения обычно обусловлена различными другими причинами (травма, бактериальное заражение, заражение другими вирусами). Для целей диагностики ежедневно, начиная с 5-ГО дня после заражения, забивают 1—2 животных и производят исследование на предмет обнаружения телец Негри или рабического антигена. С помощью метода иммунофлюоресценции. Часто, таким образом, удается поставить ранний диагноз, особенно в тех случаях, когда приходится иметь дело с некоторыми штаммами уличного вируса, которые убивают животное через 1—3 недели.

Примечание. Появление клинических симптомов у зараженной мыши нельзя считать характерным для бешенства. Хотя симптомы паралича на 5-й день (или позже) после введения суспензии могут служить основанием для подозрения на наличие заболевания бешенством, эти же симптомы наблюдаются и при многих других вирусных, бактериальных и протозойных инфекциях, поражающих центральную нервную систему. Бесспорное доказательство идентичности вируса получают при помощи реакции нейтрализации с антира-бической сывороткой.

Дальнейшие пассажи инфицированного материала

При необходимости можно приготовить суспензию из ткани мозга мыши, погибшей от инфекции после заражения первоначальным вирусом; эту суспензию можно хранить или использовать в реакции нейтрализации, или, наконец, ввести другой группе мышей.

Вскрытие трупов исследуемых мышей.

Труп мыши фиксируют на дощечке спиной кверху. Для этого необходимо всего две булавки — одной прикалывают основание хвоста, другой — кончик морды. Можно пользоваться и тремя булавками, чтобы фиксировать передние лапы и хвост.

После дезинфекции спиртом кожу головы и шеи отпрепаронывают с помощью ножниц и пинцета и откидывают кпереди; изогнутыми ножницами отделяют крышу черепа, обнажая мозг. С помощью тех же изогнутых ножниц извлекают мозг и переносят его па стерильную чашку Петри. Готовят тонкий срез мозга из области, находящейся кпереди от мозжечка, и переносят его на деревянный шпатель или на бумажную салфетку. Чистое предметное стекло слегка прижимают к поверхности разреза; при этом надавливать следует достаточно сильно, чтобы получить на стекле легкий отпечаток от поверхности среза. Один и тот же отпечаток можно использовать и для окрашивания на тельца Негри и для исследования с помощью флюоресцирующих антител.

Возможные осложнения при проведении биологической пробы

Бактериальное загрязнение инокулируемого материала

Если, несмотря на добавление антибиотиков, мыши погибают от инфекции, вызванной посторонними бактериями, и если первоначальная суспензия подлежит хранению, можно попытаться применить следующие методы, чтобы избежать заражения МЫШ6Й посторонними бактериями.

а) Фильтрование через бактериальные фильтры. Для этой цели следует использовать надосадочную жидкость, полученную после центрифугирования суспензии в течение 15 минут при 1500 об/мин. Поскольку вирус бешенства является довольно крупным, а его концентрация в препаратах, взятых в полевых условиях, не очень велика, при фильтровании неизбежна некоторая потеря вируса.

б) Метод разведения. Иногда суспензию можно разбавить, уменьшив концентрацию в ней бактерий настолько, что заражение ими окажется невозможным, причем вирус сохраняет свою активность. Это, однако, удается редко.

в) Длительное хранение. В некоторых случаях легче бороться с бактериальным загрязнением, если предварительно оставить суспензию на хранение при температуре замораживания или выдержать ее в глицерине.

г) Парентеральная инокуляция. Для парентеральной инокуляции следует брать сирийских хомячков — животных, наиболее восприимчивых к парентеральной инфекции. Мыши сравнительно резистентны к парентеральному заражению вирусом бешенства.

Присутствие двух вирусов

Присутствие какого-либо другого вируса особенно нежелательно, если этот посторонний вирус обладает свойствами, близкими к свойствам вируса бешенства. В этом случае можно попытаться взять для заражения (интрацеребрального и парентерального) животных какого-либо другого вида; это возможно, учитывая широкий спектр инфекционного действия вируса бешенства.

«Самостерилизующиеся нейроинфекции», или феномен интерференции

В ряде случаев приходится разводить инокулум в 10, а иногда и в 100 раз либо из-за особых свойств данного конкретного штамма вируса бешенства, либо из-за наличия большого количества неактивных вирусных частиц, вступающих в интерференционные отношения с живым вирусом. Трудно дать точное определение случаев, когда следует прибегать к такому разбавлению. Мысль о возможности интерференции должна возникнуть в тех случаях, когда при работе с одним и тем же видом животных в определенном географическом районе попытки выделить вирус бешенства не удаются; при возникновении такого подозрения суспензию ткани надо разводить до концентрации менее 10%.