

## Выявление и изучение некоторых биологических свойств возбудителя орнитоза кур вирусологическим, серологическим и люминесцентно-микроскопическим методами

---

---

Н. И. СМИРНОВА, У. Е. СТАРОДУБЦЕВА,  
В. М. ЖАВНЕНКО

Наряду со многими инфекционными заболеваниями птиц (пуллороз, паратиф, чума, оспа, инфекционный ларинготрахеит и др.) орнитоз регистрируется как за рубежом (США, Чехословакия, Австрия, Япония, Болгария), так и в нашей стране (Киргизская ССР, Татарская ССР, Западная Украина, Омская и Московская области).

В работах А. Я. Фоминной, В. Н. Сюриной, Г. И. Ивановой, Р. К. Hagemann (1937), С. С. Levaditi (1939), М. Н. Мейсель с сотрудниками (1958), Д. Б. Голубева с соавторами (1965), В. А. Цыро (1965), М. Б. Титова и А. С. Луцук (1966), И. И. Терских (1966), З. В. Николаева (1966), С. Г. Ерохина с соавторами (1967) указывается о возможности диагностирования вышеуказанных болезней птиц путем применения бактериологических, вирусологических, серологических и люминесцентно-микроскопических методов.

В целях выяснения вопроса о наличии инфекционных заболеваний у кур, забиваемых на санбойне Витебской птицефабрики, мы провели (1967—1968 гг.) частичное обследование, применив различные микробиологические и вирусологические методы.

Результаты бактериологического исследования были отрицательными.

Для вирусологического исследования отобрали 28 проб патологического материала (паренхиматозные органы, кишечник) от кур. Указанный материал обрабатывали по общепринятой методике, сохраняли в заморо-

женном состоянии не более 24—48 часов и использовали для заражения 5—7-дневных куриных эмбрионов (КЭ). КЭ (всего их было 336) заражали в желточный мешок в дозе 0,3—0,4 мл в трех последовательных пассажах. Гибель инфицированных эмбрионов была установлена в 4 случаях (14,3%) на 5—7-е сутки после введения исследуемого материала. Контрольные эмбрионы (112), которым аналогичным образом инъецировали раствор Хэнкса (в 1-м пассаже) и эмульсию, полученную путем растирания оболочки желточных мешков (2-й и 3-й пассажи), оставались жизнеспособными. Во время вскрытия погибших эмбрионов на их теле, голове и стенке желточного мешка наблюдались мелкие кровоизлияния. При бактериологическом исследовании КЭ получен отрицательный результат. Желточные мешки КЭ собирали, тщательно промывали физиологическим раствором, растирали в ступке стеклянным пестиком с небольшим количеством раствора Хэнкса, а затем центрифугировали. Из центрифугата готовили препараты-мазки для выявления элементарных телец по способу Маккиавелло. В ряде случаев использовали мазки-отпечатки, приготовленные из оболочек отмытых желточных мешков.

В результате микроскопии мазков, окрашенных по способу Маккиавелло, были обнаружены элементарные тельца, типичные для возбудителя орнитоза. Они представляли собой округлые частицы красного цвета (зрелые формы) или фиолетового цвета (молодые формы) размером от 0,2 до 2 мк, располагающиеся в виде скоплений или одиночно.

На основании полученных данных нами было сделано предварительное заключение о выделении 4 штаммов возбудителя орнитоза, которые соответственно нумерации проб исследуемого материала были обозначены 4а, 5в, 10, 21.

Окончательная идентификация возбудителя орнитоза проведена путем постановки прямой РСК и реакции подавления связывания комплемента (РПСК). В качестве антигена в этих реакциях использовали выделенные нами штаммы. Остальные диагностикумы получены с завода бактериальных препаратов Одесского института вирусологии и эпидемиологии им. И. И. Мечникова. РСК и РПСК ставили в соответствии с наставлением, присланным этим заводом и утвержденным Министерством

здравоохранения УССР. Параллельно проводили контрольную реакцию, в которой использовали специфический орнитозный антиген.

Положительная РСК (2 полюса) с испытуемыми антигенами № 4а, 5в, 21 наблюдалась при разведении иммунной сыворотки 1:8. В результате постановки РПСК в двух случаях (ангигены 4а, 21) при разведении сыворотки 1:8, 1:16 отмечали полный гемолиз эритроцитов и в одном (№ 5 в) задержку гемолиза на 2 плюса. Положительный исход этих реакций подтвердил наше заключение о выделении возбудителя орнитоза кур.

Серологическое исследование (РСК и РПСК) сывороток крови, полученных от 146 кур, позволило получить дополнительные результаты. В результате РСК орнитозные антитела в сыворотках крови кур были обнаружены (при разведении сывороток 1:8, 1:16 и задержке гемолиза на 2—3 креста) в 5 случаях из 41, т. е. в 12,1%. РПСК оказалась более чувствительной, антитела в титре 1:8, 1:16 обнаружены в 22 сыворотках из 105, или в 20,9% случаев.

Как известно (И. И. Терских), наличие специфических орнитозных антител в сыворотках крови (в разведении 1:8, 1:16) при отсутствии явных признаков болезни, а также обнаружение элементарных тел, характерных для возбудителя орнитоза, можно считать показателем латентной формы или вирусоносительства у кур.

Выделив возбудителя орнитоза, мы приступили к исследованию биологических свойств трех его штаммов (№ 4а, 5в, 21) в сравнительном аспекте. В процессе этой работы изучали морфологию частиц возбудителя и включений, образующихся в цитоплазме пораженных клеток, тип нуклеиновой кислоты, способность к размножению в различных культурах ткани и вирулентность для белых мышей.

Морфологию элементарных частиц, включений и тип нуклеиновой кислоты исследовали в препаратах, приготовленных из различного материала: желточных мешков КЭ, паренхиматозных органов, предварительно зараженных белых мышей, из культуры ткани клеток амниона человека, куриных фибробластов, применив люминесцентную и электронную микроскопию.

При люминесцентной микроскопии препаратов, фиксированных в метаноле (5 минут) и обработанных акри-

Дином оранжевым (1:30000, рН буфера 3,8) по методике В. Д. Неустроева с соавторами (1958), установили, что элементарные тельца и включения, образуемые тремя исследуемыми штаммами, имели округлую форму, размер их варьировал от 0,2 до 5 мк (рис. 1). Это, по-видимому, зависело от стадии их развития. Включения люминесцировали ярко-зеленым или оранжевым цветом. Характер люминесценции указывал на присутствие ДНК (зеленая флуоресценция) и РНК (оранжевое свечение) в частицах возбудителя орнитоза (И. А. Курбанов, О. М. Попов, 1966; А. В. Зеленин, 1968).

В целях приготовления препаратов для электронной микрокопии использовали фильтр, полученный в результате проведения вирусологического материала через мембранный фильтр № 4. Препараты готовили по методике А. П. Пехова (1962), напыляли хромом и исследовали в электронном микроскопе *Tesla-242a*. При увеличении в 4000 раз (на экране) фильтрующиеся частицы представляли собой овальные гомогенные образования.

Динамику развития и особенности ЦПД изучали путем заражения клеточного монослоя из первично трипсинизированных куриных фибробластов, перевиваемых штаммов клеток *HeLa*, С-18, амниотических клеток (в 3 пассажах). Клеточный монослой первично трипсинизированных и перевиваемых штаммов клеток получали на покровных стеклах, которые помещали в пробирки, перед разливом взвеси клеток в питательной среде (5—2,5%-ный гемогидролизат). Через 3, 6, 9, 12, 24, 48, 72, 96 часов с момента заражения монослоя стекла извлекали и

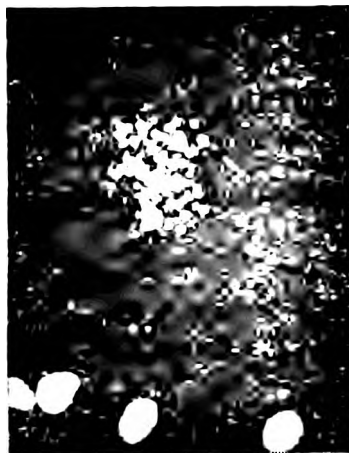


Рис. 1. Элементарные тельца возбудителя орнитоза в препарате-отпечатке из оболочки желточного мешка КЭ после флуорохромирования акридином оранжевым (МЛ-2, объектив 90×, окуляр 7×, фильтры СЭС-7, ФС-1 и БС-8).

определяли присутствие элементарных телец и включений в культуре ткани методом флюорохромирования и по способу Маккиавелло. В результате изучения 250 препаратов установлено, что цитопатогенное действие проявляется через 24—48 часов, причем только в монослое куриных фибробластов и амниотических клеток. При этом происходит вакуолизация протоплазмы, деформация ядра клеток. Постепенно клетки увеличиваются в размере, округляются и начинается процесс формирования небольших симпластов, содержащих 2—3 ядра. В цитоплазме клеток на всех стадиях ЦПД можно видеть включения округлой формы, окруженные светлым ободком.

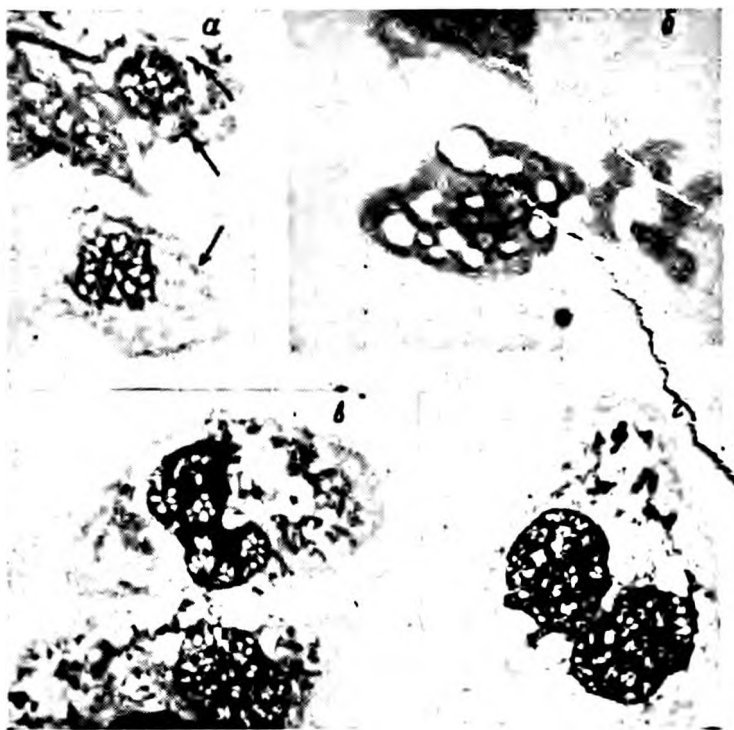


Рис. 2. Цитопатогенное действие возбудителя орнитоза в монослое амниотических клеток (окраска по Маккиавелло  $\times 450$ ):

- а) внутрицитоплазматические включения; б) вакуолизация протоплазмы; в) деформация ядра (ДЯ), цитоплазматические включения (ИВ); г) симпластообразование (двуядерная, увеличенная в размерах клетка).

Включения имели мелкие размеры, но в некоторых случаях достигали 2—5 мк (рис. 2, а, б, в, г).

В монослое клеток *HeLa* и С-18 аналогичных изменений не наблюдали.

В результате этого опыта была установлена возможность размножения выделенных штаммов в клетках куриных фибробластов и амниона человека.

Вирулентные свойства изучали путем заражения 18—20-дневных белых мышей (50) в 3 пассажах. Все штаммы оказались слабовирулентными для них. Белые мыши погибали в пределах 20—30% после внутрибрюшного заражения эмульсией, приготовленной из желточного мешков КЭ. При введении материала, содержащего штамм 4а, гибель белых мышей наступала на 4—5-е сутки, а при инфицировании их штаммами 5в и 21-м — через 17 суток. Следовательно, наиболее вирулентным из 3 штаммов был 4а. При вскрытии у павших мышей отмечали увеличение селезенки, скопление кровянистого экссудата в брюшной полости, на фоне поликровой печени выделялись наиболее бледные участки. Бактериологическое исследование патологического материала от мышей во всех случаях было отрицательным.

На основании проведенной работы мы сочли возможным сделать следующие выводы:

1. Вирусологическое исследование патологического материала от кур, проведенное путем заражения куриных эмбрионов в желточный мешок, позволило выделить возбудитель орнитоза в 14,3% случаев.

2. Идентификация вида возбудителя может быть проведена посредством постановки РПСК со специфической орнитозной сывороткой.

3. В процессе сравнительного изучения биологических свойств трех штаммов возбудителя орнитоза установлены некоторые характерные особенности: образование округлых элементарных телец и внутрицитоплазматических включений размером от 0,2 до 5 мк, наличие нуклеиновой кислоты двух типов (ДНК и РНК), способность к умеренному размножению в куриных эмбрионах, амниотических клетках и куриных фибробластах, слабая вирулентность для белых мышей.

4. При серологическом исследовании сывороток крови кур специфические орнитозные антитела выявлены в 18,4%, причем РПСК явилась более чувствительным ме-

тодом (20,9% положительных реакций) диагностики орнитоза, чем РСК (12,1% положительных реакций).

5. Наличие орнитозных антител в сыворотках крови кур (в разведении 1:8, 1:16), обнаружение элементарных телец и включений при отсутствии явных признаков болезни можно считать показателем вирусоносительства или латентной формы орнитоза среди обследованного поголовья кур.

## Материалы по изучению микрофлоры плесневелого мяса и мясных продуктов

---

---

Т. С. НЕСТЕРОВ

Плесневение мяса и мясных продуктов встречается весьма часто и причиняет большой экономический ущерб.

По данным А. М. Казакова (1952), из общего числа забракованного при транспортировках мяса 70% поражено плесенью.

Н. А. Наумов (1937) отмечает, что развитие плесневых грибов на мясе происходит в ассоциации с бактериями, которые принимают участие в загнивании мяса. Однако, какие виды плесневых грибов развиваются в ассоциации с бактериями, он не указывает.

А. К. Герке (1930), А. В. Катагощин (1934) считают, что развитие плесеней на мясе происходит без сопутствующей микрофлоры.

Ранее нами (1956) выяснено, что большинство плесневых грибов, прорастающих на мясе и мясных продуктах, являются сапрофитами и только некоторые виды их обладают токсическими свойствами и способны вызывать заболевания человека и животных.

Изучение видового состава микроорганизмов при плесневении мяса и особенно колбасных изделий, которые наиболее часто подвергаются плесневению, имеет