

Министерство сельского хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь

Витебская ордена «Знак Почета» государственная
академия ветеринарной медицины

Кафедра эпизоотологии и инфекционных болезней

ИНФЕКЦИОННЫЙ РИНОТРАХЕИТ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Учебно-методическое пособие для студентов
факультета ветеринарной медицины по специальности
1-74 03 02 «Ветеринарная медицина» и слушателей ФПК и ПК
по ветеринарным специальностям

Витебск
ВГАВМ
2020

УДК 619:616.98:578.825.15

ББК 48.731.311

И74

Рекомендовано к изданию методической комиссией
факультета ветеринарной медицины УО «Витебская ордена
«Знак Почета» государственная академия ветеринарной
медицины» от 23 апреля 2019 г. (протокол № 11)

Авторы:

доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор *П. А. Красочко*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Н. В. Синица*; кандидат ветеринарных наук, доцент *Я. П. Яромчик*; кандидат ветеринарных наук, доктор биологических наук, доцент *П. П. Красочко*; доктор ветеринарных наук, профессор *И. А. Красочко*; доктор ветеринарных наук, профессор *В. В. Максимович*; кандидат ветеринарных наук, доцент *В. А. Машеро*; кандидат ветеринарных наук, доцент *А. В. Притыченко*; магистр ветеринарных наук *М. А. Понаськов*

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, профессор *А. П. Медведев*;
кандидат ветеринарных наук, доцент *Д. С. Борисовец*

И74 Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота : учеб. - метод. пособие для студентов факультета ветеринарной медицины по специальности 1-74 03 02 «Ветеринарная медицина» и слушателей ФПК и ПК по ветеринарным специальностям / П. А. Красочко [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2020. – 60 с.

В пособии освещены вопросы этиологии возбудителя инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, свойств вируса, представлена информация об эпизоотологических особенностях болезни, о клиническом течении, патологоанатомических признаках, диагностике и профилактике инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота. Учебно-методическое пособие предназначено для студентов факультетов ветеринарной медицины, слушателей факультетов повышения квалификации, практических ветеринарных специалистов, специалистов государственных ветеринарных служб, предприятий комбикормовой промышленности.

УДК 619: 614.48

ББК 48.173

© УО «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной
медицины», 2020

проведения лабораторно-практического занятия по эпизоотологии и инфекционным болезням со студентами

Тема: Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота - методы диагностики и мероприятия по профилактике и ликвидации.

Время: 1 час.

Место занятия: практикум кафедры.

Цель занятия: изучить методы диагностики и мероприятия при инфекционном ринотрахеите крупного рогатого скота.

Материальная обеспеченность занятия:

- рисунки, фотографии, слайды, презентации;
- мультимедийное устройство, персональный компьютер;
- биопрепараты: вакцины инактивированные и живые против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синтициальной инфекции, рота- и коронавирусной инфекции телят, гипериммунные сыворотки и др.;
- таблицы: этиология, схема мероприятий по ликвидации, эпизоотологические данные;
- крупный рогатый скот;
- стерильные пробирки, ватно-марлевые тампоны или вата, физиологический раствор, одноразовые шприцы.

Изучаемые вопросы при проведении лабораторно-практического занятия:

а) эпизоотологический метод диагностики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (возрастная восприимчивость скота, источники возбудителя инфекции, пути распространения, сезонность, течение эпизоотии, заболеваемость, летальность);

б) клинический метод диагностики;

в) патологоанатомический метод диагностики;

г) вирусологический метод диагностики. Подчеркивается, что правильный отбор патматериала, его транспортировка, качество подготовки и техника его исследования имеет большое значение для точности установления диагноза;

д) серологический метод диагностики (реакция диффузной преципитации в агаровом геле, реакция нейтрализации, ИФА и ПЦР);

- лечение больных животных;
- дифференциальная диагностика инфекционного ринотрахеита;
- специфическая профилактика;
- мероприятия по профилактике и ликвидации инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота;
- крови для серологического исследования;
- техника отбора проб смывов из носовой полости и влагалища, с конъюнктивы глаз, проб фекалий от телят для вирусологического исследования.

Для углубленного изучения студентами данной темы и освещения за-

планируемых вопросов при проведении лабораторно-практического занятия ниже приводятся краткие теоретические и практические сведения и основные положения нормативных документов Международного Эпизоотического Бюро и Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь.

Инфекционный ринотрахеит (инфекционный вульвовагинит) крупного рогатого скота

1. Определение болезни

Инфекционный ринотрахеит (инфекционный вульвовагинит) крупного рогатого скота (*Infectiousbovinerhinotracheitis; Rhinotracheitisinfectiosabovum*; ИРТ, «красный нос», инфекционный ринит, инфекционный пустулезный вульвовагинит, инфекционный вульвовагинит, пузырьковая сыпь, инфекционный некротический ринотрахеит, инфекционный катар верхних дыхательных путей, контагиозная бронхопневмония) – остро протекающая контагиозная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся лихорадкой, катарально-некротическим воспалением верхних дыхательных путей, поражением глаз, центральной нервной системы, а также поражением органов репродуктивной системы: пустулезным вульвовагинитом и абортами у коров, баланопоститами у быков.

Статус инфекционной болезни по МЭБ, Департамента ветнадзора и САНПиН РБ

В соответствии с Кодексом здоровья о наземных животных Международного эпизоотического бюро (МЭБ) 2016 года (WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH, 2010 12, rue de Prony, 75017 Paris, FRANCE Telephone: 33-(0)1 44 15 18 88 Fax: 33-(0)1 42 67 09 87 Electronic mail: oie@oie.int WWW: <http://www.oie.int>) в список МЭБ на основании решения Всемирной Ассамблеи Делегатов в категорию 2 «Болезни крупного рогатого скота» включен инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота.

2. Историческая справка

Первое сообщение о болезни, вызываемой вирусом герпеса крупного рогатого скота типа-1 (BHV-1), зарегистрировано в Германии в 1841 году, где получило название «коитальная везикулярная экзантема» (coitalvesicularexanthema (CVE)). Регистрировались следующие симптомы: высокая температура тела (39,0-42,2°C), снижение надоев, которые во многих случаях прекращались полностью в течение 24-48 часов. Отмечалось чрезмерное пенистое слюноотделение, слизистая оболочка носовой полости гиперемирована с кровоизлияниями, первоначально отмечались серозные выделения из носовых полостей, а позже – слизистые или слизисто-гнойные. Отмечался короткий сухой надрывистый, болезненный кашель. Заболеваемость в этих стадах составила 7,6%, уровень смертности среди инфицированных животных – 3%. При вскрытии трупов животных отмечался геморрагический трахеит и бронхит, острый катаральный энтерит тонкого отдела кишечника. Это было первое предположение об инфици-

онном происхождении данной болезни у крупного рогатого скота.

В 1954 году инфекционный ринотрахеит в виде поражения верхних дыхательных путей был зарегистрирован в США, Лос-Анджелес, штат Калифорния.

Однако в штате Колорадо вспышкаподобного заболевания наблюдалась в 1950-1954 гг. (R.J.Schroden, 1954).

До 1955 года респираторные болезни имели разные названия. Только в 1955 году, по предложению многих ученых, они стали именоваться инфекционным ринотрахеитом.

На территории Советского Союза заболевание, подобное инфекционному ринотрахеиту, было зарегистрировано Ф. М. Пономаренко (1938 год) и на основании клинических признаков и гистологических исследований описано как инфекционный катар верхних дыхательных путей. Болезнь регистрировалась среди племенного крупного рогатого скота по клиническим признакам, патологоанатомическим изменениям и результатам серологического исследования.

Возбудителя инфекционного ринотрахеита выделили Н.Н. Крюков (1970), З.Ф. Зудилина с соавт. (1971) и другие исследователи при заболевании телят в ряде откормочных хозяйств, в Республике Беларусь – Н.А. Ковалев с соавт. (1988).

3. Экономический ущерб. В неблагополучных хозяйствах инфекционный ринотрахеит причиняет большой ущерб, складывающийся за счет падежа, вынужденного убоя, задержки роста и развития молодняка крупного рогатого скота, преждевременной выбраковки переболевших. У маточного поголовья – из потерь от снижения удоя в период болезни до 50 – 60%, значительного процента яловости при генитальной форме болезни и расходов на мероприятия по профилактике и ликвидации болезни.

4. Этиология

4.1. Возбудитель – классификация, родовые и видовые названия, серовары и т.д.

Возбудитель – *Herpesvirusbovis I* – ДНК-геномный вирус, принадлежащий к семейству *Herpetoviridae*, роду *Herpesvirus I*, диаметр вирионов 120–140 нм.

Морфология. Вирион вируса ИРТ состоит из ядра, капсида и тегумента. Ядро состоит из единичной двухцепочечной молекулы ДНК, окруженной белковым капсидом. ДНК обернута вокруг волокнистого катушкообразного ядра, которое имеет форму тора, и выглядит подвешенной на фибриллах, которые прикреплены к внутренней части окружающего капсида и проходят сквозь отверстия в торе. Окружает капсид слой глобулярного материала, известный как тегумент. Он представляет собой липопротеиновую оболочку с многочисленными мелкими шипами гликопротеинов. В связи с различной толщиной тегумента размер вирусной частицы может находиться в пределах 100-250 нм (см. рис. 1,2).

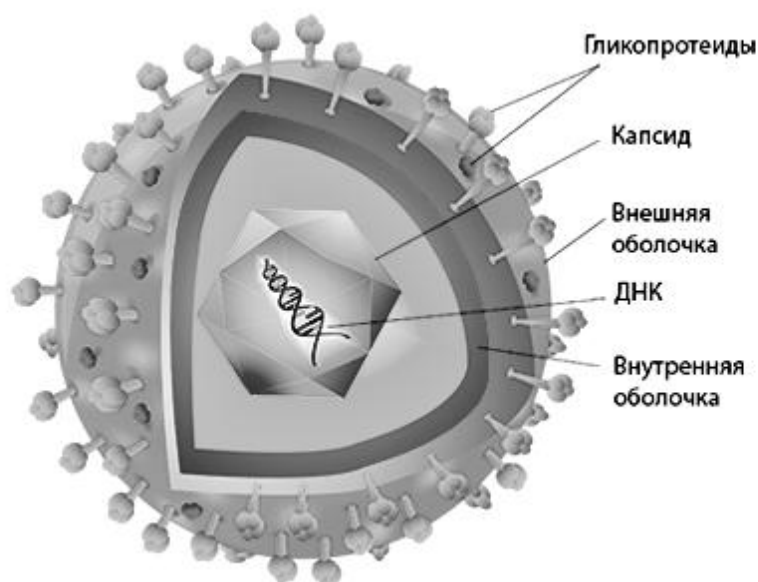


Рисунок 1 – Схема структуры вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота

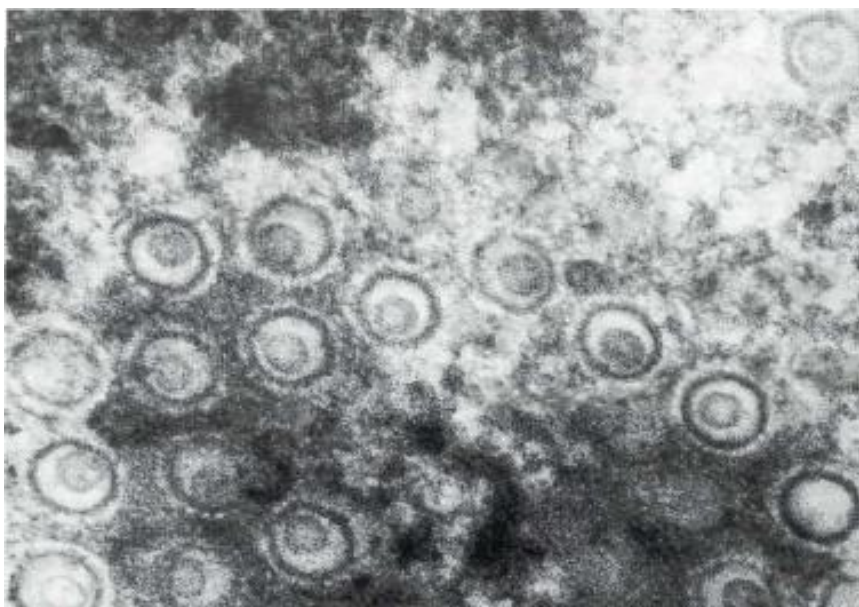


Рисунок 2 – Вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, ультратонкий срез, x300000

4.2. Антигены возбудителя

Принята классификация BHV-1 на подтипы: BHV-1.1, BHV-1.2, который в свою очередь подразделялся на BHV-1.2a и BHV-1.2b, BHV-1.3 в настоящее время переименован в BHV-5.

Подтип 1.2 считается менее вирулентным, чем подтип 1.1. Развитие респираторной или генетической формы заболевания зависит не столько от подтипа вируса, сколько от пути инфицирования животных. Кроме того, подтип 1.3, вызывающий нейропатологию у телят, в настоящее время классифицирован как герпесвирус КРС 5 (BoHV-5 bovineherpesvirus-5).

В антигенном отношении вирус ИРТ содержит 9 структурных белков VP105, VP90, VP74, VP64, VP54, VP50, VP47, VP40 и VP31. При этом иммуно-

генной активностью обладают в основном гликопротеины gI, gII, gIII и gIV, также известные как гликопротеин В, гликопротеин Е, гликопротеин С и гликопротеин D. По данным реакции нейтрализации наибольшей иммуногенностью обладают VP90 и VP74.

4.3. Генетическая характеристика

Как и все альфагерпесвирусы, вирус ИРТ является ДНК-геномным. Его нуклеиновая кислота двухцепочечная и содержит около 136 тысяч пар нуклеотидов. Структурно и функционально в ней можно выделить 4 участка: U_L – уникальный длинный сегмент (100 тыс. п.н.), U_S – уникальный короткий сегмент (13 тыс. п.н.), IR – внутренние повторности (11 тыс. п.н.) и TR – терминальные повторности. Повторности пространственно ориентированы в соответствии друг к другу. Между IR и TR располагается сегмент U_S и направляется в двух альтернативных направлениях к U_L. В связи с этим вирусная ДНК представлена двумя изомерическими формами в неравных эквимолярных соотношениях. Эти изомеры обозначают как прототипный (Р) и инверсионный тип сегмента U_S. Ориентация U_L сегмента фиксирована.

Наличие свыше 60 генов позволяет вирусу ИРТ кодировать целый ряд структурных и функциональных белков, обеспечивающих его проникновение в клетку, репликацию и вирулентные свойства.

4.4. Культивирование

Для выделения и накопления вируса ИРТ используют различные культуры клеток. Ввиду широкого тканевого тропизма возможно использование клеток почек, надпочечников, щитовидной и поджелудочной желез, легких, тимуса, семенников и лимфатических узлов не только крупного рогатого скота, но и других видов животных.

В культурах клеток вирус проявляет цитопатическое действие в течение 24-48 часов в виде округления клеток, появления стерильных пятен, скопления клеток в виде грозди винограда.

При низких титрах вируса ЦПД наступает в течение 48-96 часов. Это действие легко нейтрализуется специфической сывороткой. Для культивирования пригодны перевиваемые линии клеток почек и тестикулов телят. Изменения в них развиваются позднее – на 4-6-е сутки. Репродукция вируса сопровождается подавлением митотической активности клеток и образованием внутриядерных включений. Сначала появляется большое число включений, которые, сливаясь между собой, образуют одно крупное включение с выраженным светлым ободком. Оно занимает почти все пространство ядра. Хроматин сохраняется в виде узкого ободка, непосредственно прилегающего к ядерной оболочке, целостность которой, как правило, не нарушается. Вместе с включениями выявляются небольшие симпласты. Клетки пикнотизируются, округляются и отторгаются от стекла.

При выращивании вируса в монослое клеток МДВК достигается концентрация 6,75-7,25 lg ТЦД₅₀/мл. Помимо первичных и перевиваемых культур клеток используют органные культуры слизистых оболочек верхних дыхательных путей, ротовой полости, ЖКТ, конъюнктивы, влагалища телят и эмбрионы ко-

ров. В культурах из органов вирус обнаруживали через 29 дней после заражения. ЦПД развивалось фокусно, сначала по периферии эксплантатов. В органических культурах слизистой оболочки носа и трахеи телят, убитых на 2 и 7-й день после заражения, вирус находили в течение 1-2 месяцев. В культуре клеток под агаровым покрытием на 4-6-й день инкубации вирус ИРТ образует округлые, с ровными краями, бляшки диаметром 1-2 мм.

4.5. Устойчивость во внешней среде, к химическим веществам, антибактериальным веществам

Вирус устойчив к замораживанию. Устойчивость – при -60 – -70 °С и pH 6-9 вирус сохраняется до 9 мес. Температура 56 °С инактивирует его за 20 мин, 37 °С – за 4–10 сут., 22 °С – через 50 сут. Вирус чувствителен к эфиру, ацетону, этиловому спирту и хлороформу. По устойчивости к химическим дезинфицирующим средствам вирус относится к малоустойчивым (первая группа) микроорганизмам. По устойчивости к химическим дезинфицирующим средствам вирус относится к малоустойчивым (первая группа) микроорганизмам.

Растворы натрия гидроокиси, формальдегида и фенола (1–2%-ные) инактивируют возбудителя в течение 10 мин. Антибиотики и сульфаниламидные препараты губительного действия на вирус инфекционного ринотрахеита не оказывают.

5. Эпизоотические данные

5.1. Распространение в мире (данные МЭБ) и в РБ

На сегодняшний день ИРТ встречается на всех континентах и в большинстве стран с промышленным ведением скотоводства. По данным Международного эпизоотического бюро в 2017 г. из стран, регулярно сообщающих об эпизоотической обстановке, ИРТ не регистрировался только в Швеции, Норвегии, Дании, Швейцарии, Италии, Чехии, Словакии и Словении. Во всех остальных странах с большим поголовьем КРС встречаются клинические проявления болезни.

Страны СНГ не являются исключением – клинические проявления болезни, выделение вируса и серопозитивность скота стали неотъемлемой частью многих крупных ферм и комплексов.

Болезнь регистрируют во многих странах мира, в том числе и в Республике Беларусь, особенно в условиях интенсификации животноводства.

5.2. Восприимчивые виды животных

В естественных условиях болеет крупный рогатый скот, независимо от породы и возраста. Наиболее тяжело болезнь протекает у молодняка откормочного поголовья, особенно мясных пород. Наиболее чувствительны новорожденные телята до двухнедельного возраста, не получавшие коллостральные антитела с молозивом коров. Экспериментально удается заразить овец, коз, буйволов, верблюдов, свиней, оленей. Кроме того, генитальная форма заболевания установлена у беловежских зубров.

5.3. Источники заражения, пути переноса

Источник возбудителя болезни – больные и переболевшие животные, выделяющие вирус с носовым секретом, истечениями из глаз и половых орга-

нов, с молоком, мочой, калом, спермой. Особенно опасны быки-производители, переболевшие генитальной формой ИРТ. Со спермой вирус способен выделяться в течение 6-19 мес. У переболевших животных возможна длительная (несколько лет) персистенция вируса ИРТ, активизация которого может быть вызвана различными стрессовыми факторами.

Предполагают, что в странах Африки антилопы гну являются резервуаром вируса ИРТ. Помимо того, вирус может реплицироваться в клещах, которые играют важную роль в возникновении заболевания среди крупного рогатого скота.

Факторами передачи возбудителя считаются инфицированные воздух, корма, сперма, предметы ухода, транспортные средства, а также птицы, насекомые, люди, контактирующие с больными животными. Не исключена вероятность вовлечения в эпизоотический процесс при ИРТ животных, которые в естественных условиях не болеют, но в их сыворотках крови обнаруживают специфические антитела к возбудителю болезни (овцы, козы, свиньи, олени, буйволы).

В естественных условиях животные заражаются аэрогенно, алиментарно, а также путем прямого (при случке) и непрямого контакта больных со здоровыми животными. В зависимости от способа передачи возбудителя у восприимчивых животных развивается болезнь с преобладанием респираторного или генитального синдромов.

5.4. Сезонность, охват поголовья, территорий

Болезнь на крупных промышленных комплексах регистрируют в любое время года, но чаще при неблагоприятных погодных условиях (осень, зима, весна).

Инфекционный ринотрахеит чаще возникает в хозяйствах, при комплектовании групп животных сборным поголовьем, имеющим разный иммунный статус. Большое число неиммунных животных обеспечивает быстрое и многократное пассирование возбудителя, усиление его вирулентности, что приводит к активизации эпизоотического процесса, массовому заболеванию животных и более тяжелому течению болезни. Уровень специфической защиты влияет на проявление ИРТ и у телят, имеющих низкое содержание колостральных антител в крови; у них возможно нетипичное течение болезни с поражением желудочно-кишечного тракта, головного мозга, суставов, органов дыхания.

В патогенезе болезни, кроме этиологического фактора, имеет большое значение влияние ряда неблагоприятных условий. Такими условиями являются:

1. Неудовлетворительные условия кормления, ухода и содержания маточно-го поголовья; особенно при получении от них телят с низким генетическим потенциалом продуктивности (особенно телочек) и роста.
2. Отсутствие в ряде хозяйств отдельных родильных отделений (на молочно-товарных комплексах и фермах) или нарушение технологии их работы, вследствие чего наблюдается переболевание новорожденных телят вначале желудочно-кишечными заболеваниями (что приводит к снижению резистентности организма), а в последующем - респираторными болезнями, в том числе и инфекционным ринотрахеитом.

3. Недостаток или дисбаланс в организме животных микро-, макроэлементов и витаминов, что приводит к глубоким нарушениям обмена веществ и резкому снижению у животных иммунного статуса.
4. Нарушение технологии получения и выращивания молодняка крупного рогатого скота.
5. Скармливание как взрослым животным, так и молодняку недоброкачественных кормов (сена, концентратов и сенажа), с низкой их питательностью, а также недокорм новорожденных телят в подсосный период.
6. Формирование комплексов или крупных ферм слаборазвитыми или больными животными без предварительного проведения надлежащего ветеринарного осмотра и определения иммунного статуса их организма.
7. Низкая приспособляемость животных к условиям промышленной технологии выращивания, резкий перевод с одного корма на другой.
8. Перегревание или переохлаждение организма животных при перевозке их на необорудованном транспорте.
9. Нарушение зоогигиенических норм содержания крупного рогатого скота (плохие параметры микроклимата в помещении - несоблюдение температурного режима, высокая влажность, сквозняки и др.).
10. Длительное комплектование комплекса или фермы (на протяжении пяти и более дней) разновозрастным сборным поголовьем с различным иммунологическим фоном, частая перегруппировка животных внутри хозяйства.
11. Размещение клинически здоровых животных из благополучных хозяйств или ферм совместно с больными и переболевшими инфекционным ринотрахеитом.
12. Отсутствие во многих комплексах и фермах карантинных помещений для вновь поступающего поголовья и особенно – закупленного молодняка от населения или с других неблагополучных по данной болезни хозяйств.
13. Эксплуатация помещений (секций) без соблюдения принципа «все занято - все свободно», некачественная их механическая очистка и дезинфекция.
14. Несоблюдение требований санитарной и антистрессовой обработки животных перед вывозом из хозяйств или при перегруппировке их внутри хозяйства.
15. Несвоевременная или некачественная специфическая профилактика инфекционного ринотрахеита у маточного поголовья и молодняка крупного рогатого скота.

Заболеваемость ИРТ в таких условиях содержания может составлять от 30 до 90%. Острые вспышки болезни в ранее благополучном хозяйстве характеризуются большим охватом поголовья, болеют почти все восприимчивые животные. В дальнейшем ИРТ может проявляться латентно или спорадически; при поступлении в такое хозяйство неиммунных животных часто регистрируется эпизоотическая вспышка. Летальность при ИРТ может составлять от 1 до 20% и выше. Характерной особенностью инфекции в животноводстве являются частые случаи осложнения секундарной микрофлорой, обуславливающие более тяжелое течение основной болезни и высокую летальность болезни.

6. Патогенез

Попав на слизистые оболочки дыхательных или половых путей, конъюнктиву глаз вирус внедряется в клетки эпителия, где репродуцируется, вызывая их гибель и слущивание. На поверхности слизистых оболочек верхних дыхательных путей под воздействием вируса образуются эрозии, а в половых путях – узелки и пустулы. Из очагов первичной локализации с током воздуха вирус при респираторной форме болезни может попасть в бронхи и альвеолы, а через слезноносовой канал в конъюнктиву, где вызывает дистрофические изменения в пораженных клетках и ответную воспалительную реакцию организма. Адсорбируясь на лейкоцитах, вирус попадает в лимфатические узлы, а в дальнейшем – и в кровь.

Состояние вирусемии проявляется общим угнетением животного и лихорадкой, развивающейся в результате интоксикации. У телят первых недель жизни, в отличие от взрослых, вирус, попадая с кровью в паренхиматозные органы, может репродуцироваться, вызывая в них дегенеративные изменения. При прохождении вируса через гематоэнцефалический и плацентарный барьеры патологические изменения развиваются в мозге (энцефалит), плаценте, матке, плоде. У стельных коров и нетелей плод погибает в последнюю треть беременности, они abortируют. В сыворотке крови abortировавших коров обычно выявляют противовирусные антитела, вирус же чаще выделяют из тканей плода.

Патологический процесс при ИРТ во многом зависит от осложнений, обусловленных другими микроорганизмами, вызывающими пневмонии, гастроэнтериты и др. Более тяжелое течение болезни наблюдают при ассоциативных болезнях (с ПГ-3, аденовирусной, хламидиозной инфекции, вирусной диареи, пастереллезом и др.).

7. Клинические признаки

7.1. Формы проявления и течение болезни

Инфекционный ринотрахеит проявляется в следующих формах:

1. Респираторная форма. В основном поражаются телята от 1 до 6 месяцев.

2. Конъюнктивальная (глазная) форма. Заболевают телята с 15 дней до 6 месяцев, а также поражаются и взрослые коровы.

3. Генитальная форма. Заболевают коровы с поражением репродуктивных органов.

4. Менингоэнцефалитная форма. Такой формой болезни в основном заболевают телята 2-6-месячного возраста.

5. Кишечная форма.

Респираторная форма инфекционного ринотрахеита. При остром течении респираторной формы инфекционного ринотрахеита у животных болезнь, как правило, начинается повышением температуры тела ($39,9-41^{\circ}\text{C}$), в этот период у телят общее состояние организма удовлетворительное. Затем через 1-3 дня температура тела снижается до нормы. В начальной стадии заболевания из носовой полости начинают выделяться серозные истечения (водянистые, прозрачные), а через 3-4 дня они становятся слизистыми, слизисто-гнойными (при осложнении бактериальными возбудителями зачастую регистрируется брон-

хопневмония), у животных отмечается ринит, снижение аппетита, поверхностное, учащенное дыхание, кашель, серозные истечения из носа, слезотечение. У животных отмечается повышенная чувствительность в области гортани и трахеи, слизистая оболочка носовой полости гиперемирована. Слизистые оболочки носа, глотки, гортани резко отечные, у многих животных выражена гиперемия носового зеркала (красный нос) (см. рис. 3-4). На коже носового зеркала, слизистой оболочке носа обнаруживаются эрозии и язвы, покрытые фибриновыми корками серого или серо-желтого цвета. Больные животные быстро теряют массу тела, прогрессирует ухудшение общего состояния организма, наблюдается сердечная недостаточность, ухудшается, а у многих телят полностью отсутствует аппетит, наблюдаются гиперемия кожи носового зеркала («красный нос»), эрозии, сыпь вокруг ноздрей.

При тяжелом течении болезни отмечают признаки асфиксии.



Рисунки 3-4– Характерные поражения носогубного зеркала – «красный нос»

Большинство животных выздоравливают в течение 1-2 недель. В тяжелых случаях на 3-4-й день болезни истечения становятся гнойными, слюноотделение – более интенсивным, иногда в ротовой полости появляются язвы и эрозии (см. рис.5,6).



Рисунок 5– Слюноотделение при ИРТ



Рисунок 6— Гиперемия слизистой оболочки ротовой полости при ИРТ

Затрудненное дыхание и появление шумов при дыхании обусловлено повышенной секрецией слизистой оболочки гортани и трахеи при воспалении, сужением просвета трахеи и щели гортани, а также закупоркой бронхиол пенным экссудатом и фибрином. В результате этого у больных животных наблюдается кашель. Больные животные сильно угнетены, отказываются от корма, занимают лежащее или стоячее положение, при этом вытягивают шею и широко расставляют конечности для облегчения дыхания. Прогноз неблагоприятный. Тяжелобольные телята, как правило, погибают.

Подострое течение респираторной формы ИРТ

У животных болезнь, как правило, начинается повышением температуры тела (39,9-41 °C). Затем из носовой полости начинают выделяться серозные истечения (водянистые, прозрачные), позже они становятся слизистыми, слизисто-гнойными (при осложнении бактериальными возбудителями), у животных отмечается ринит. В этот период воспалительный процесс наблюдается только в верхних дыхательных путях (носовая полость, гортань, трахея). У больных животных наблюдается сухой, болезненный кашель (имеет место поражение только верхних дыхательных путей), а через 2-4 дня кашель становится влажным, безболезненным. Одышка сопровождается сильным болезненным кашлем, хрипами. Животные часто дышат через рот. Аускультацией и перкуссией устанавливают пневмонию.

Кишечная форма инфекционного ринотрахеита у телят

В основном болеет молодняк. При поражении желудочно-кишечного тракта болезнь чаще протекает остро, но может быть и подострое течение, температурная реакция организма при данной форме отсутствует или незначительно повышена. У больных телят отмечают депрессию, отказ от корма, вялое общее состояние организма. У некоторых телят наблюдается серозное истечение из носовой полости на почве развития ринита (кашель, как правило, отсутствует). У многих телят наблюдается гиперемия слизистой оболочки ротовой полости. Она резко гиперемизирована, с кровоизлияниями и синюшным оттенком, на слизистой оболочке могут быть эрозии и язвы. Кожа носового зеркала у многих новорожденных телят резко гиперемизирована с кровоизлияниями, с эро-

зиями и язвами, наложениями коричневых корочек. У больных телят наблюдается диарея. Фекалии желтоватого или зеленовато-желтого цвета, часто с примесью слизи и крови. У животных наблюдается быстрая потеря живой массы за счет обезвоживания организма, западение глазных яблок в орбиту. Продолжительность болезни зависит от возраста животного. Более тяжелое течение болезни с большим процентом летальности наблюдается у телят до 10-12-дневного возраста. У телят старшего возраста болезнь протекает подостро и часто заканчивается выздоровлением (см. рис. 7, 8).



Рисунок 7 – Поражение желудочно-кишечного тракта при ИРТ



Рисунок 8 – Телята с поражением желудочно-кишечного тракта при ИРТ

Конъюнктивальная (глазная) форма инфекционного ринотрахеита

Острый конъюнктивит начинался внезапно и характеризовался выраженной воспалительной реакцией. На первых этапах заболевания в результате действия возбудителя формируется серозное воспаление, сопровождающееся обильным слезотечением, в основном поражаются оба глаза. Больные животные выказывают беспокойство и светобоязнь, часто глаза закрыты (см. рис. 9). При этом основные клинические признаки конъюнктивитов были следующие:

- первые клинические признаки характеризовались ярко-красной локальной или диффузной окраской конъюнктивы, наличием поверхностно расположенной широкопетливой сети сосудов, увеличением их диаметра и интенсивности гиперемии;



Рисунок 9– Гиперемия конъюнктивы

- отек глазного яблока с изменением калибра сосудов, увеличивалось их кровенаполнение, затруднялся отток и снижался уровень проницаемости сосудов, что приводило к выпотеванию плазмы;

- в результате защитной реакции организма, заключающейся в миграции лейкоцитов и фагоцитозе, наступала гибель лейкоцитов вместе с патогенными микробами и образовывался гной, отделяемое было слизистым, слизисто-гнойным или гнойным;

- отмечалось слезотечение, повышенная чувствительность к свету и распространение воспаления на роговицу, что приводило к развитию кератита;

- изменения в роговой оболочке проявлялись в виде перикорнеальной реакции, что указывало на тяжесть заболевания: роговица становилась мутной с серым оттенком, шероховатой, вокруг нее формировалось красное кольцо и развивалась слепота (см. рис. 10-11).



Рисунок 10 – Глазные истечения при конъюнктивальной форме ИРТ



Рисунок 11 – Воспаление роговицы слепота при конъюнктивальной форме ИРТ

Генитальная форма инфекционного ринотрахеита

Если вирус проникает через слизистые оболочки половых путей, развивается генитальная форма – пустулезный вульвовагинит у самок и баланопостит у самцов. Спустя 2–4 дня после инфицирования животное отказывается от корма; отмечается снижение удоя, выраженная гиперемия и отек слизистой вульвы и влагалища.

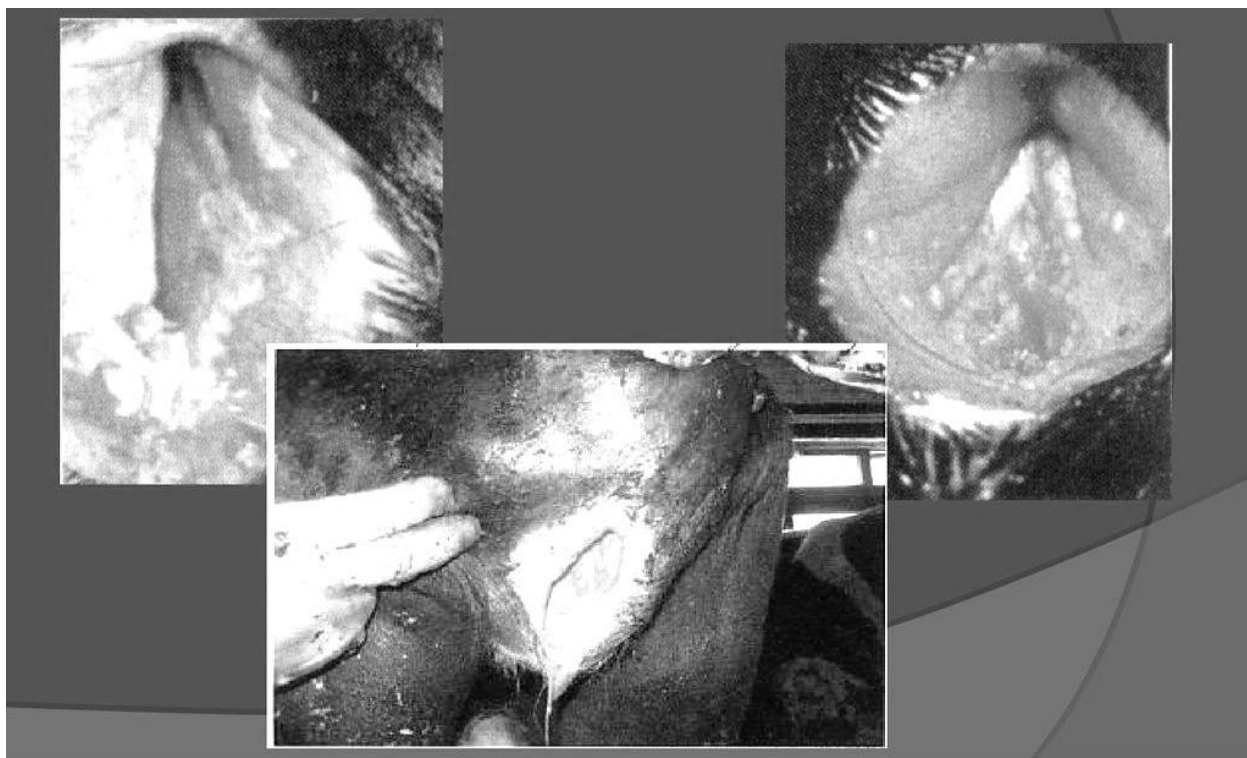


Рисунок 12 – Генитальная форма инфекционного ринотрахеита



Рисунок 13—Пустулезный вульвовагинит при ИРТ



Рисунок 14 – Баланопостит у быка при ИРТ

В дальнейшем на отдельных участках слизистой появляются пузырьки (везикулы), заполненные прозрачной жидкостью. Они могут сливаться, лопаться, и на их месте образуются эрозии и язвы, покрытые слизью и пленками фибрина. Животные беспокоятся, машут хвостами, из влагалища выделяются слизисто-гнойные истечения.

У таких животных обычно повышается температура тела. У самцов воспалительный процесс в основном локализуется на слизистой оболочке препуция, характер поражения такой же, как и у коров.

При неосложненном течении болезни животное обычно выздоравливает через 10–14 дней.

У нетелей и стельных дойных коров болезнь может вызывать аборт на 6–8 мес. беременности (см. рис. 15).



Рисунок 15 – Аборты в 6-8 месяцев стельности при ИРТ

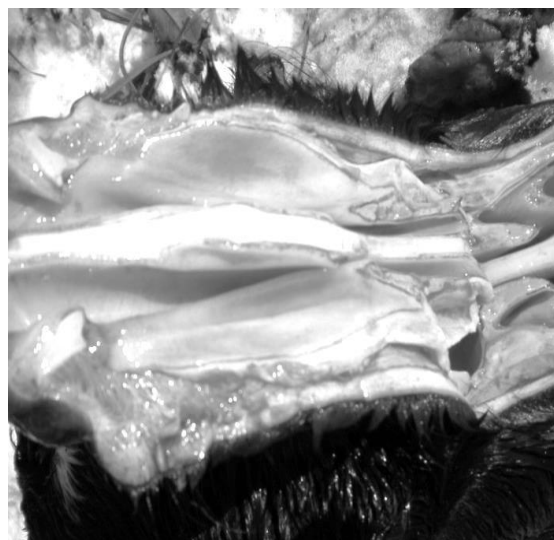
Такие животные за несколько недель до аборта, как правило, переболевают ринотрахеитом в респираторной форме. Интервал между гибелью плода и его изгнанием из организма матери колеблется до 10 дней, а между инфицированием и абортом – от 9 до 105 дней. После аборта возможны метриты, на длительное время снижается и молочная продуктивность.

Менингоэнцефалитная или нервная форма инфекционного ринотрахеита. При этой форме в основном болеет молодняк. При менингоэнцефалитах наряду с угнетением отмечают расстройство двигательных функций и нарушение равновесия. Болезнь сопровождается мышечным тремором, мычанием, скрежетом зубов, конвульсиями, слюнотечением. Процент летальности при данной форме довольно высокий (70-90%).

8. Патологоанатомические изменения при инфекционном ринотрахеите крупного рогатого скота

Характер поражений зависит от формы болезни. При респираторной форме болезни основные изменения обнаруживают в органах дыхания. Кожа носового зеркала гиперемирована с кровоизлияниями, могут быть эрозии и язвы, наложение корочек, вокруг ноздрей может быть пузырьковидная сыпь. Слизистая оболочка носовой полости резко гиперемирована с кровоизлияниями, цианотична в вентральных ходах, имеется скопление большого количества слизи, с примесью гноя и фибрина. Иногда отмечают эрозии. Слизистая оболочка придаточных пазух гиперемирована, набухшая, просветы их заполнены экссудатом. При остром течении болезни слизистые оболочки зева и гортани гиперемированы, отечны с кровоизлияниями, иногда встречаются эрозии. На слизистой оболочке трахеи может наблюдаться остро-катаральное или катарально-геморрагическое воспаление. В просвете трахеи при остром течении болезни наблюдается большое количество пенистого экссудата с примесью фибрина. В легких в таких случаях часто обнаруживают эмфизему, разрыв паренхимы с образованием больших воздушных каверн. У телят до 4-месячного возраста, как правило, довольно часто обнаруживают двустороннюю катаральную брон-

хопневмонию с обязательным поражением верхушечных долей. При тяжелом течении болезни (наслоение различной условно-патогенной бактериальной микрофлоры) наблюдается гнойная или фибринозная бронхопневмония. В грудной полости в месте прикрепления верхушечной части сердца, как правило, обнаруживается студенистый экссудат соломенно-желтого цвета. Заглочные, бронхиальные и средостенные лимфоузлы увеличены в объеме, сочные на разрезе, саловидные (гиперплазия), гиперемированы, при осложнениях – с кровоизлияниями. Селезенка, как правило, без видимых изменений, но может быть уменьшена в объеме, с выраженной бороздчатостью. При наслоении бактериальной микрофлоры она увеличена в объеме, с кровоизлияниями под капсулой. На эпикарде, эндокарде и на аорте иногда могут быть кровоизлияния. Почки без видимых патизменений, в почечных лоханках наблюдается наличие студенистого экссудата соломенно-желтого цвета. В печени - зернистая дистрофия. Желчный пузырь увеличен в объеме, переполнен желчью с примесью слизи. Иногда желчь может быть дегтеобразной.



Рисунки 16-17 – Кровоизлияния и отек слизистой носа



Рисунки 18-19 – Катарально-геморрагическая пневмония

При генитальной форме обнаруживают отечность, везикулы и язвочки на слизистых оболочках половых путей; при осложненных формах – эндометриты. Абортированные плоды отечные, в их печени находят очаги некроза, околопочечная ткань пропитана геморрагическим экссудатом. При гистологическом исследовании материала выявляют тельца-включения в клетках эпителия пораженных слизистых оболочек.

При поражении вымени обнаруживают серозно-гнойный диффузный мастит. Поверхность разреза отечная, отчетливо гранулирована вследствие увеличения пораженных долек. При надавливании с нее стекает мутный гноеподобный секрет. Слизистая оболочка цистерны гиперемированная, набухшая, с кровоизлияниями. При энцефалитах в головном мозге выявляют гиперемию сосудов, отечность тканей и мелкие кровоизлияния.

Гистологическим методом патологические изменения в пораженном респираторном тракте выявляют выраженный клеточный инфильтрат из нейтрофильных лейкоцитов и лимфоцитов в толще слизистой оболочки и подлежащей соединительной ткани, разрушение мерцательного эпителия до базальной мембраны. Впервые дни в эпителиальных клетках обнаруживают внутриядерные включения, обусловленные размножением вируса. Пораженные альвеолы и бронхи содержат нейтрофильные лейкоциты в экссудате. Также лимфоцитарные инфильтраты обнаруживаются в перибронхиальной интерстициальной ткани.

При конъюнктивитах в многослойном призматическом эпителии слизистой оболочки также выявляется большое количество нейтрофилов и лимфоцитов. В пораженных участках эпителиоциты разрушены до базальной мембраны. Также могут выявляться клетки с внутриядерными включениями на границах пораженных участков.

Патологоанатомический диагноз

При респираторной форме отмечают серозно-катаральный, катарально-гнойный, язвенно-некротический ринит, ларингит, фарингит, трахеит, бронхопневмонию, конъюнктивит.

При генитальной форме – пустулезный вульвовагинит и баланопостит.

При неонатальной форме – острый катаральный энтерит.

Патологоанатомический диагноз.

1. Серозно-катаральный, катарально-гнойный, фибринозный, язвенно-некротический ринит, ларингит, фарингит, трахеит.

2. Катарально-гнойная бронхопневмония (осложнение).

3. Серозный лимфаденит подчелюстных, заглоточных, бронхиальных и средостенных лимфоузлов.

4. Гнойный конъюнктивит и кератит.

5. Пустулезный вульвовагинит (у коров) и баланопостит (у быков).

6. Незначительное увеличение селезенки.

7. Острый катаральный энтерит, язвы в слизистой оболочке ротовой полости, десен, сычуга (неонатальная форма).

Отбор и транспортировка проб для гистологического исследования.

Для гистологического исследования материал берут от свежих трупов или убитых животных. Материал отбирается только из тех органов и тканей, где обнаружены те или иные патологические изменения. Из разных участков патологически измененных органов (тканей) вырезают тонкие, небольшие кусочки, но не более 1-2 см толщиной. Вместе с пораженными участками ткани захватывают и граничащую с ней нормальную ткань. Материал тотчас помещают в фиксирующую жидкость, объем которой должен в 10 раз превышать объем взятого материала. В качестве фиксирующей жидкости лучше всего использовать 10%-ный водный раствор формалина. За неимением формалина можно использовать в качестве фиксирующей жидкости 96%-ный этиловый спирт. При применении в качестве фиксирующей жидкости спирта толщина кусочков ткани не должна превышать 0,5 см.

Фиксирующую жидкость во всех случаях через сутки необходимо заменить свежей. Патологический материал фиксируют в стеклянной посуде или в крайнем случае в глиняной.

Головной, спинной мозг и другие нервные ткани лучше фиксировать в 10%-ном нейтральном формалине. Нейтрализуется формалин добавлением в формалин сухого мела или углекислой магнезии до 1/10-1/20 его объема. Для фиксации кусочков мозга можно использовать также 90%-ный спирт, жидкость Карнуа или смесь Буэн-Дюбоска.

В холодное время года во избежание промерзания при пересылке материал, зафиксированный в формалине, как указано выше, перекладывают в 30-50%-ный раствор глицерина, приготовленный на 10%-ном формалине, или в 70%-ный спирт, или в насыщенный раствор поваренной соли.

На банку с кусочками органов и тканей наклеивают этикетку с указанием на ней номера или клички животного. Внутрь банки опускают также этикетку из плотной бумаги или картона с написанным на ней простым (не химическим) карандашом номером животного.

Помещать и одну посуду пробы материала от разных животных можно только при условии, что от каждого животного они завернуты в марлю с отдельной этикеткой.

9. Лабораторные методы диагностики инфекционного ринотрахеита у крупного рогатого скота

Клинико-эпизоотологические данные и патологоанатомические изменения дают основания только для предположительного диагноза на инфекционный ринотрахеит. Окончательно болезнь диагностируют лабораторным исследованием.

Отбор и транспортировка патматериала и материала для вирусологического исследования.

При жизни от больных животных отбирают:

1. Пробы смывов со слизистой оболочки носовой полости, экссудата с конъюнктивы глаз и с преддверия влагалища или влагалища (при наличии патологических изменений). Их отбирают стерильными ватно-марлевыми тампо-

нами или тампоном из поролоновой губки, которые вводят на 20 минут в носовую полость. После взятия проб тампоны помещают в стерильные пенициллиновые флаконы или пробирки, куда добавляют 3-5 мл стерильного физиологического раствора или раствора Хенкса.

2. Носоглоточные смывы получают путем орошения физиологическим раствором или раствором Хенкса носоглотки с помощью шприца. Жидкость сначала собирают в стерильные кюветы, а затем сливают в приготовленные стерильные флаконы или пробирки.

3. Соскобы со слизистой оболочки носа, которые получают с помощью стерильных специальных ложек. Материал помещают во флакон и добавляют 3-5 мл стерильного физиологического раствора или раствора Хенкса.

4. Пробы фекалий отбирают из прямой кишки также ватно-марлевыми тампонами, после чего их помещают во флаконы или пробирки, добавляют 3-5 мл физраствора.

5. Слюну берут при наличии признаков поражения ротовой полости (эрозии, язвы). Выделяющуюся слюну отбирают прямо в стерильные флаконы или пробирки, добавляют незначительное количество (2-3 мл) стерильного физиологического раствора.

6. Во всех случаях взятые пробы материала необходимо как можно быстрее поместить в морозильные камеры холодильника или в сосуд Дюара с жидким азотом и заморозить.

7. От вынужденно убитых и павших животных, не позднее чем через 1-2 часа, отбирают кусочки слизистой оболочки носовой полости, гортани, трахеи, легкого (на границе здоровой и пораженной ткани), селезенки, заглоточные, средостенные, бронхиальные и брыжеечные лимфоузлы. Пораженные участки кишечника с содержимым перевязывают с обоих концов и помещают в отдельную посуду.

8. При наличии конъюнктивита или кератита берут ткани глаз. Для этого ножницами рассекают конъюнктиву и глазные мышцы, глазное яблоко выводят пинцетом из орбиты наружу и пересекают глазной нерв.

9. Отобранный материал помещают в стерильный стеклянный флакон с притертыми пробками или в стерильные целлофановые пакеты, срочно замораживают в морозильных камерах и доставляют в лабораторию в термосе со льдом или в сосуде Дюара с жидким азотом.

В диагностические лаборатории от трупов или вынужденно убитых животных посылают:

1. Не позднее чем через 1-2 часа от вынужденно убитых и павших животных отбирают кусочки пораженной слизистой оболочки носовой полости с перегородкой, гортани, трахеи, легкого (на границе здоровой и пораженной ткани), селезенки, заглоточные, средостенные, бронхиальные и брыжеечные лимфоузлы. Пораженные участки кишечника с содержимым перевязывают с обоих концов и помещают в отдельную посуду. От абортированных плодов – паренхиматозные органы, плодные оболочки.

2. При наличии конъюнктивита или кератита отбирают ткани глаз. Для

этого ножницами рассекают конъюнктиву и глазные мышцы, глазное яблоко выводят пинцетом из орбиты наружу и пересекают глазной нерв.

3. Отобранный материал помещают в чисто вымытый стерильный стеклянный флакон с притертыми пробками или в стерильные целлофановые мешки, срочно замораживают в морозильных камерах и доставляют в лабораторию в термосе со льдом или в сосуде Дьюара с жидким азотом.

Вирусологические исследования включают:

- обнаружение вируса в патматериале с использованием ПЦР, ИФА, РНГА, РИД и др.;
- выделение вируса путем заражения культур клеток почки телят, тестикул бычка, селезенки и почки эмбриона коровы с последующей идентификацией его в РН и РИФ. Для выявления вируса в нативном материале применяется РИФ, РДП и ELISA, для выявления генома вируса - ПЦР;
- идентификацию вирусного антигена на культуре клеток проводят с использованием ПЦР, ИФА и др.

Отбор и транспортировка крови для серологического исследования на инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота.

Для ретроспективной серологической диагностики направляют парные пробы сывороток крови, взятые в начале болезни и спустя 2–3 недели. Прирост уровня сывороточных антител определяют в РН, РНГА, РДП и ELISA с использованием биофабричных диагностикумов.

У крупного рогатого скота кровь берут из яремной вены в верхней трети шеи. Иглы перед взятием крови для каждого животного обязательно стерилизуют кипячением. Шерсть на месте взятия крови тщательно выстригают, а кожу дезинфицируют спиртом или 3%-ным раствором карболовой кислоты. Нужно следить, чтобы кровь стекала по стенке в пробирку струей, а не каплями. Кровь, взятая каплями и вспененная, не пригодна для исследования, так как быстро гемолизуются форменные элементы. При исследовании такой крови могут иметь место ложноположительные реакции. Для серологического исследования в лабораторию можно отправлять и цельную кровь, не отделяя сыворотку, но при условии, что в пути она не будет встряхиваться, так как впоследствии могут также гемолизироваться форменные элементы.

Взятую кровь выдерживают около часа при +30-35°C для свертывания, а затем помещают в прохладное помещение для отстаивания. Через 10-12 часов отстоявшуюся сыворотку сливают в другие стерильные пробирки. Если сыворотка недостаточно отстоялась или верхний слой сгустка плотно прилегает к стенкам пробирки и отстаивание начинается снизу, то сгусток отделяют от стенок пробирки тонкой предварительно прокаленной и остывшей проволокой-спицей.

Сыворотка крови должна быть доставлена в лабораторию в течение первых суток и в исключительных случаях не позднее третьего дня после взятия крови. Не отправленную в течении первого дня сыворотку хранят в холодильнике, не допуская замораживания.

При пересылке сыворотки крови на большое расстояние, особенно летом,

ее необходимо консервировать 5%-ным раствором карболовой кислоты на физиологическом растворе из расчета на каждые 9 мл сыворотки 1 мл раствора карболовой кислоты или 1-2 капли раствора на 1 мл сыворотки. Раствор карболовой кислоты необходимо добавлять по каплям при постоянном встряхивании пробирки с сывороткой.

На каждой пробе сыворотки крови или крови указывают ее порядковый номер или фамилию владельца животного. Пробы направляют с описью в трех экземплярах. Пробирки с сыворотками плотно закрывают стерильными пробками и устанавливают для пересылки в строго вертикальном положении.

Зимой сыворотки упаковывают и пересылают в термочемоданах так, чтобы они не замерзали.

Лабораторный диагноз считается установленным в случае выявления вируса в нативном материале или выделения в культуре клеток и последующего типирования его, или при 2 – 4-кратном приросте специфических антител в крови переболевших животных.

Биологический материал для проведения диагностических исследований (правила отбора проб, транспортировки и хранения)

Материал для выделения вируса и обнаружения антигена должен собираться биопсией или после посмертного обследования с конкrecий кожи. Образцы для выделения вируса следует предпочтительно собирать в течение первой недели с появлением клинических признаков до разработки нейтрализующих антител, однако вирус можно выделить из узловых участков кожи для 3-4 недель. Образцы для обнаружения генома с помощью обычной или в режиме реального времени полимеразной цепной реакции (ПЦР) могут быть собраны, когда присутствуют нейтрализующие антитела. После первого появления поражений кожи вирус можно выделить до 35 дней, а вирусную нуклеиновую кислоту можно продемонстрировать с помощью ПЦР в течение 3 месяцев. Образцы для гистологии должны включать ткань из окружающей области, быть максимальным размером 2 см³ и размещаться сразу же после сбора в десятикратный объем нейтрального буферного 10% формалино-солевого раствора. Ткани в формалине не имеют особых требований к транспортировке.

Образцы крови с антикоагулянтом для выделения вируса из пораженного слоя следует немедленно помещать на лед и транспортироваться как можно скорее. На практике образцы могут храниться при температуре 4 °С в течение 2 дней до обработки, но не должны замораживаться или выдерживаться при температуре окружающей среды. Ткани для выделения вирусов и обнаружения антигенов следует хранить при 4 °С, на льду или при -20 °С. Если необходимо транспортировать образцы на большие расстояния без охлаждения, среда должна содержать 10% глицерина; образцы должны иметь достаточный размер (например, 1 г в 10 мл), чтобы транспортная среда не проникала в центральную часть биопсии, которая должна использоваться для выделения вируса.

Материал для гистологии должен быть подготовлен стандартными методами и окрашен гематоксилин-эозином.

Материал из пораженных тканей для выделения вируса и обнаружения

антигена измельчают с использованием стерильного лезвия скальпеля и пинцетов, а затем мацерируют в стерильной стальной шаровой подшипниковой мельнице или измельчают пестиком в стерильном растворе со стерильным песком и равном объеме стерильного забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS) или модифицированной сывороткой среды Игла, содержащей пенициллин натрия (1000 международных единиц [IU] / мл), сульфата стрептомицина (1 мг / мл), микостатина (100 МЕ / мл) или фунгизона (амфотерицин, 2,5 мкг / мл) и неомицин (200 л / мл). Суспензию замораживают-оттаивают три раза, а затем частично осветляют путем центрифугирования с помощью центрифуги для стенда при 600 г в течение 10 минут. В случаях, когда ожидается бактериальное загрязнение образца (например, когда вирус изолирован от образцов кожи), супернатант может быть отфильтрован через фильтр размера пор 0,45 мкм после стадии центрифугирования.

Проведение лабораторной диагностики, методы исследований

Твердофазный вариант ИФА, или метод ELISA (сокращение от англ. Enzyme-LinkedImmunosorbentAssay) – в его основе лежит взаимодействие антигена с антителом, фиксированном на дне лунки планшеты. Проявление реакции основано на окислении ферментом вещества-субстрата.

Твердофазный вариант ИФА успешно используется как для обнаружения вирусоспецифических антигенов, так и специфических антител у животных-реконвалесцентов или иммунизированных вакцинами.

Применение для реакции промышленно выпускаемых планшет с фиксированным антигеном или антителом (их называют *сенсibilизированными*) позволяет за короткое время исследовать большое число образцов сывороток на наличие антител и другого материала – на наличие антигена. Используемые в ИФА микропанели, в отличие от применяемых в серологических реакциях планшет, имеют плоское дно для исключения оптического искажения.

Обычно для проведения иммуноферментного анализа биологическая промышленность выпускает наборы, в состав которых входят реагенты, сенсibilизированные определенным антигеном или антителом (в зависимости от назначения).

Ведущими в мире производителями ELISA-наборов для диагностики вирусных инфекций являются IDEXX, Bio-X, Sinbiotics Corporation и др.

Основными компонентами наборов являются:

✓ сенсibilизированные антигеном или антителом полистироловые микропанели

✓ иммунопероксидазный конъюгат (называемый просто «конъюгат»)

✓ промывочный раствор

✓ буфер для разведения

✓ стоп-раствор

✓ субстрат

✓ положительный и отрицательный контроли

Иммунопероксидазный конъюгат представляет собой антитело, меченное окисляющим ферментом. В твердофазном ИФА в качестве фермента для мече-

ния антител используют пероксидазу хрена (чаще) или щелочную фосфатазу. Использование пероксидазы хрена является предпочтительным из-за ее большей каталитической активности, что определяет большую чувствительность конъюгата. Обычно в наборе указывают используемый для мечения фермент обозначениями HRP (horseradishperoxidase – пероксидаза хрена) или AP (alkalinephosphatase – щелочная фосфатаза).

Используемый для проведения ИФА субстрат представляет собой окисляемое ферментом вещество до цветного продукта. По интенсивности окрашивания судят о результате реакции. Конечный цветной продукт характеризуется оптическим свойством поглощать световую волну определенной длины, что используется для автоматизации процесса учета в специальных приборах. Выбор включаемого в состав набора субстрата зависит от используемого для метки фермента. В случае применения пероксидазных конъюгатов чаще всего применяют следующие субстраты: ТМВ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин), OPD (ортофенилендиаминадигидрохлорид) и ABTS (2,2'-азинобиос [3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислоты]-диаммониевая соль).

Субстрат ТМВ изменяет свою окраску в синий цвет при действии пероксидазы. При добавлении стоп-раствора окраска меняется на желтую. Учет реакции проводят в спектре до 450 нм.

Субстрат OPD окисляется пероксидазой хрена до желто-оранжевого цветного продукта. Максимум длины световой волной для учета реакции составляет 492 нм.

Субстрат ABTS изменяет свою окраску на зеленую при окислении пероксидазой хрена. При этом учет реакции можно проводить двумя разными световыми волнами с длиной 410 нм и 650 нм. Субстрат ABTS считается менее чувствительным по сравнению с ТМВ и OPD и окисляется за больший промежуток времени – около 20 минут.

В случае применения конъюгатов, меченных щелочной фосфатазой, используют субстрат PNPP (p-Нитрофенил фосфат динатриевая соль), который при окислении изменяет свой цвет на желтый с учетом реакции световой волны длиной в 405 нм.

Для постановки реакции также требуются автоматические пипетки (50-200 мкл), промывочное устройство, автоматическое считывающее устройство. Однако анализ может быть выполнен на микропанелях и без приборов визуально в связи с тем, что при положительной реакции изменение цвета заметно невооруженным взглядом. В этом случае учет результатов реакции может быть проведен визуально, что снижает производительность метода.

Используемые в реакции сенсibilизированные планшеты содержат 96 лунок, которые условно делят по вертикали (буквенно А-Н) и горизонтали (цифрами 1-12) (см. рис. 20).

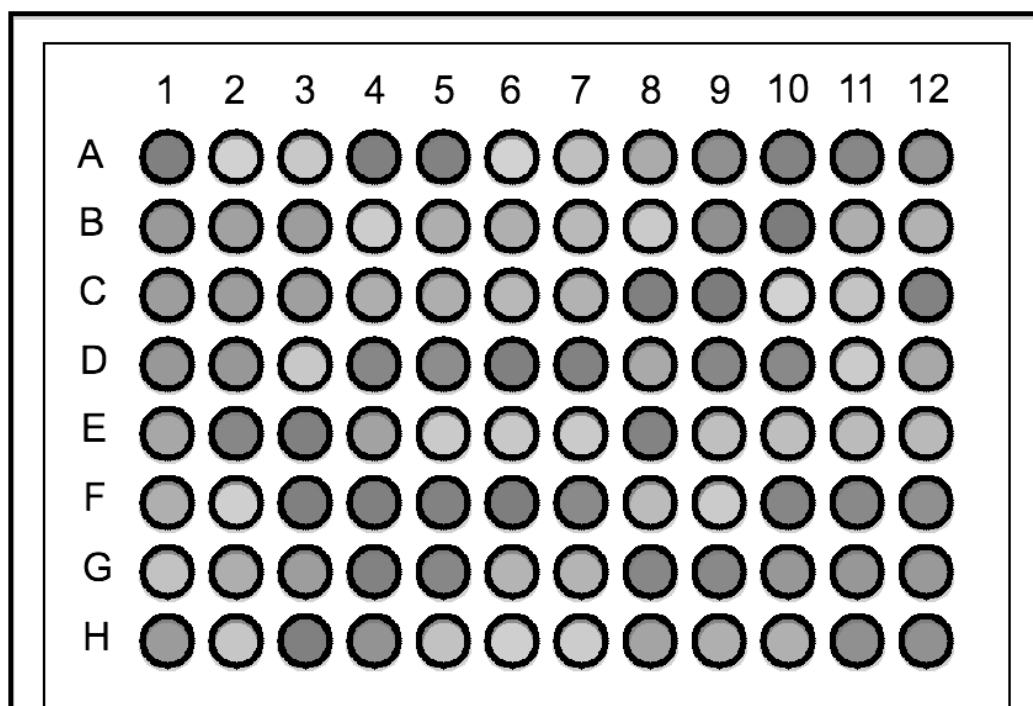


Рисунок 20 – Схематическое изображение планшеты для постановки ИФА

Обычно первые 3-4 лунки (A1-A3 или A4) используют в качестве контрольных – положительных и отрицательных, а остальные 92-93 лунки используют для добавления исследуемого материала.

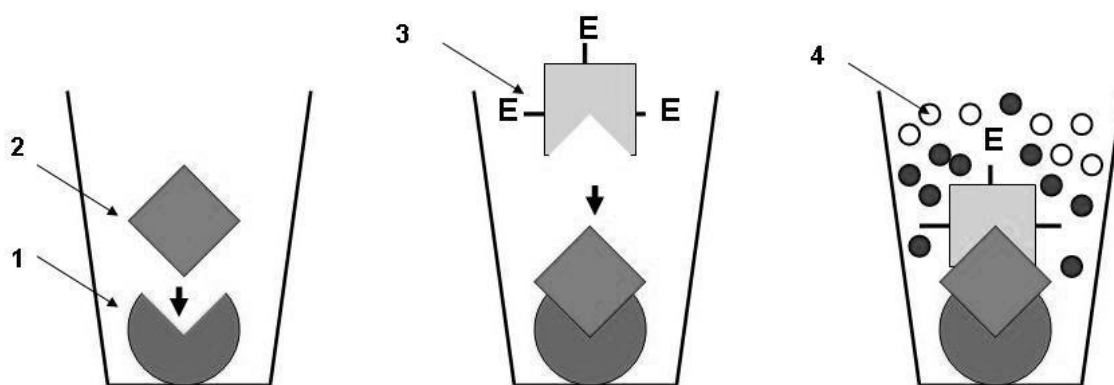
В лунки вносят по 0,1-0,2 мл раствора, содержащего исследуемый антиген или антитело, и инкубируют при 37°C 1,5-2 ч. Микропанели промывают 3 раза по 5 мин. калий-фосфатным буфером с pH 7,4 (компонент набора «промывочный буфер»).

Далее в лунки вносят по 0,1-0,2 мл иммунопероксидазного конъюгата и панели инкубируют 1-2 ч при 37 °C, промывают и затем в лунки вносят по 0,2 мл раствора субстрата. Инкубируют в темноте при комнатной температуре 5-30 мин. Реакцию останавливают добавлением 0,05 мл 2N серной кислоты (компонент набора «стоп-раствор»). Реакцию учитывают визуально по разности в окраске опытных и контрольных образцов или калориметрически в специальном считывающем устройстве при длине волны 450 нм (для пероксидазы).

За положительный результат принимают превышение оптической плотности опытных образцов над контрольными в 5-10 раз.

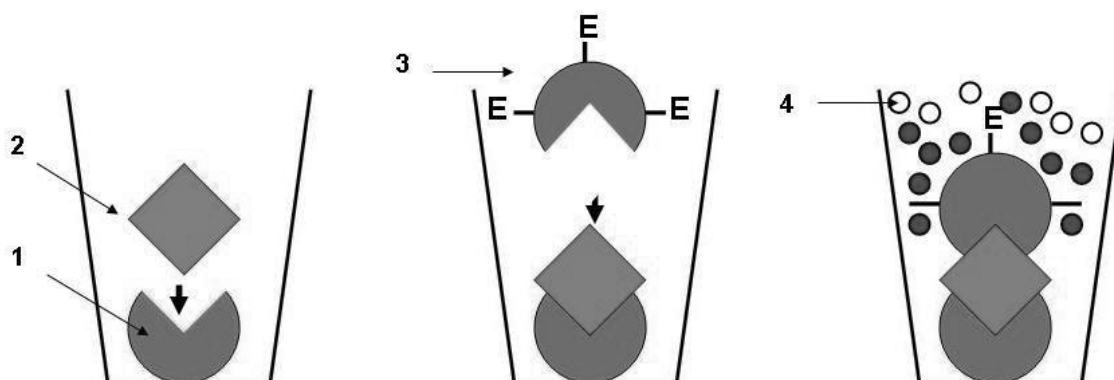
Существует два варианта постановки твердофазного варианта ИФА: для определения антител и определения антигена. Наиболее часто используют вариант постановки для определения антител в сыворотке крови.

В этом случае в ячейках полистироловых панелей фиксируют антиген. Затем добавляют сыворотку, в которой предполагается наличие антител, оставляют на контакт, промывают и добавляют фермент — меченый антиглобулин, содержащий антитела к глобулинам первой сыворотки. Он фиксируется на комплексе антиген-антитело. Количество прикрепленного конъюгата измеряют после добавления субстрата (проявляющего раствора). Субстрат разлагается под действием фермента и образует цветной продукт (рис.21).



1 – фиксированный антиген; 2 – исследуемое антитело; 3 - антивидовой иммунопероксидазный глобулин, 4 - субстрат
Рисунок 21 – Схема постановки ИФА для определения антител

Для выявления антигенов с помощью данного метода используют метод двойных антител, или «сэндвич». Для этого лунки полистироловых микропанелей сенсibilизируют гамма-глобулином, выделенным из специфической к исследуемому антигену сыворотки.



1 – фиксированное антитело; 2 – исследуемый антиген;
 3 – иммунопероксидазный конъюгат (ферментомеченное антитело), 4 - субстрат
Рисунок 22 –Схема постановки ИФА методом двойных антител

Преимуществами ИФА являются следующие: высокая специфичность и чувствительность, простое и дешевое оборудование, исследования легко автоматизировать, что позволяет его применять для массовых анализов; качественную оценку можно проводить визуально; используемые реагенты высокостабильны (пластинки с адсорбированными антителами и соединенный с ферментом глобулин сохраняют полную активность при 4 °С не менее 5 мес.).

Автоматизация ИФА. Результаты, получаемые с помощью ИФА, оценивают с помощью спектрофотометрии, регистрируя концентрацию продуктов ферментативной реакции по оптической плотности.

Для учета результатов реакции можно использовать автоматические спектрофотометры, которые позволяют измерять ферментативную активность в 120 и 2000 образцах в течение часа. Процесс измерения управляется компьютером, пересчитывающим ферментативную активность в концентрации определяемого соединения.

При отсутствии специального оборудования учет результатов ИФА может эффективно проводиться на фотоэлектрокалориметрах. Достоверность результатов анализа при этом несколько снижается, и уменьшается число проб, которое могло бы быть проанализировано за рабочий день.

Часто ценной является качественная информация о наличии или отсутствии данного соединения в исследуемой пробе. В этих случаях учет результатов ИФА можно проводить визуально, по появлению окрашенного продукта ферментативной реакции. Эта особенность метода крайне важна при необходимости массовых исследований вдали от стационарных лабораторий.

Одной из разновидностей твердофазного варианта иммуноферментного анализа является конкурентный ИФА.

Этот вариант анализа основан на конкуренции меченых (конъюгат) и немеченых (исследуемых) антител за связывание с антигеном, адсорбированным на твердой фазе. Количество фермента, присоединившегося к твердой фазе, уменьшится пропорционально содержанию в смеси свободных антител. Для определения антигена используется тот же вариант, но в этом случае искомый антиген конкурирует с меченым, стандартным антигеном за связывание с антителами, иммобилизованными на поверхности твердой фазы.

Конкурентный метод требует минимального числа операций, незначительного расхода реагентов и легко может быть автоматизирован. При проведении конкурентного ИФА для выявления антител лучше использовать меченые моноклиальные антитела, тогда конкуренция конъюгата с исследуемым образцом происходит за единственный эпитоп адсорбированного на твердой фазе антигена. Этот вариант ИФА применяется для определения различных соединений, таких как иммуноглобулины человека, раково-эмбриональный антиген, инсулин и др. Он позволяет выявлять антитела к диагностически значимым эпитопам инфекционных агентов.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – молекулярно-генетический метод для выявления или накопления специфических фрагментов нуклеиновых кислот путем многократного их копирования на основе ДНК-матрицы.

Разработку ПЦР связывают с именем КэриМалиса, который в 1983 году представил данный метод научному сообществу и за что в 1993 году был удостоен Нобелевской премии.

Диагностика инфекционных болезней с помощью ПЦР основана на наличии у любого вида микроорганизмов высококонсервативных участков нуклеиновой кислоты, свойственных только данному виду. Путем анализа предварительно установленной последовательности нуклеотидов нуклеиновой кислоты возбудителя (ДНК или РНК) и сравнения ее с имеющимися последовательностями в Международном Банке нуклеотидных последовательностей можно вы-

явить такие участки. ПЦР позволяет многократно скопировать эти участки и, благодаря высокой концентрации скопированных специфических участков (более миллиарда копий против 300-1000 копий исходной ДНК), их можно визуализировать (увидеть) с помощью электрофореза. Копии специфических участков называют **ампликонами**.

Для постановки ПЦР требуются следующие компоненты:

1. Праймеры – это синтетические олигонуклеотиды длиной 18-25 нуклеотидов. В сущности, это короткие фрагменты одноцепочечной ДНК, которые комплементарны началу и концу амплифицируемого (копируемого) участка. Так как в ДНК имеются 2 цепи (смысловая и антисмысловая), то и праймеров используется 2 – один комплементарен смысловой цепи, другой – антисмысловой. Праймеры являются специфическим компонентом ПЦР, и от качества подбора их последовательности во многом зависит успех реакции. Присоединение праймеров к цепи ДНК называют отжигом.
2. ДНК-полимераза – фермент, который на основе исходной одноцепочечной ДНК и присоединенного к ней праймера достраивает вторую цепь ДНК. В настоящее время в ПЦР используются термостабильные ДНК-полимеразы, которые не теряют свою активность при нагревании до 90-95 °С. Первая такая полимераза, Taq-полимераза, была выделена из термофильной бактерии *Thermusaquaticus*, которая живет в горячих источниках. Ее использование значительно упростило процедуру постановки реакции, т.к. использовавшиеся до этого полимеразы требовали внесения их после каждого цикла реакции.
3. Дезоксинуклеозидтрифосфаты (дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ) служат строительным материалом для синтеза новых цепей ДНК. Обычно вносятся в реакционную смесь в равных концентрациях.
4. Буферный раствор поддерживает оптимальный pH для работы полимеразы. Также может содержать различные вещества, повышающие специфичность отжига праймеров или улучшающие ферментативную активность полимеразы.
5. Зонды используются для ПЦР «в реальном времени».
6. Обратная транскриптаза – фермент, который переводит РНК в кДНК. Используется для выявления РНК-геномных микроорганизмов при постановке ПЦР с обратной транскрипцией в одной пробирке.

ПЦР состоит из 30-40 циклов, каждый из которых состоит из 3 стадий, проходящих при различной температуре:

1. Денатурация ДНК. На этой стадии осуществляется разделение ДНК на две одноцепочечные нити. В ПЦР используется термическая денатурация, т.е. повышение температуры до 94-95° С. Продолжительность 30 с.
2. Отжиг (присоединение) праймеров. Для того, чтобы фермент Taq-полимераза смог достроить вторую цепь ДНК, необходим небольшой

участок двухцепочечной ДНК, с которого начнется элонгация (достраивание второй цепи). На этой стадии праймеры присоединяются к одноцепочечным нитям. Как правило, используется 2 праймера – один для смысловой, другой – для антисмысловой цепи ДНК. Отжиг осуществляется при понижении температуры до 50-60° С. Для каждой пары праймеров существует строго определенная температура отжига (например, 52,4 ° С или 58,5 ° С), отклонение от которой ведет к снижению эффективности реакции, вплоть до прекращения амплификации. Продолжительность 15-30 с.

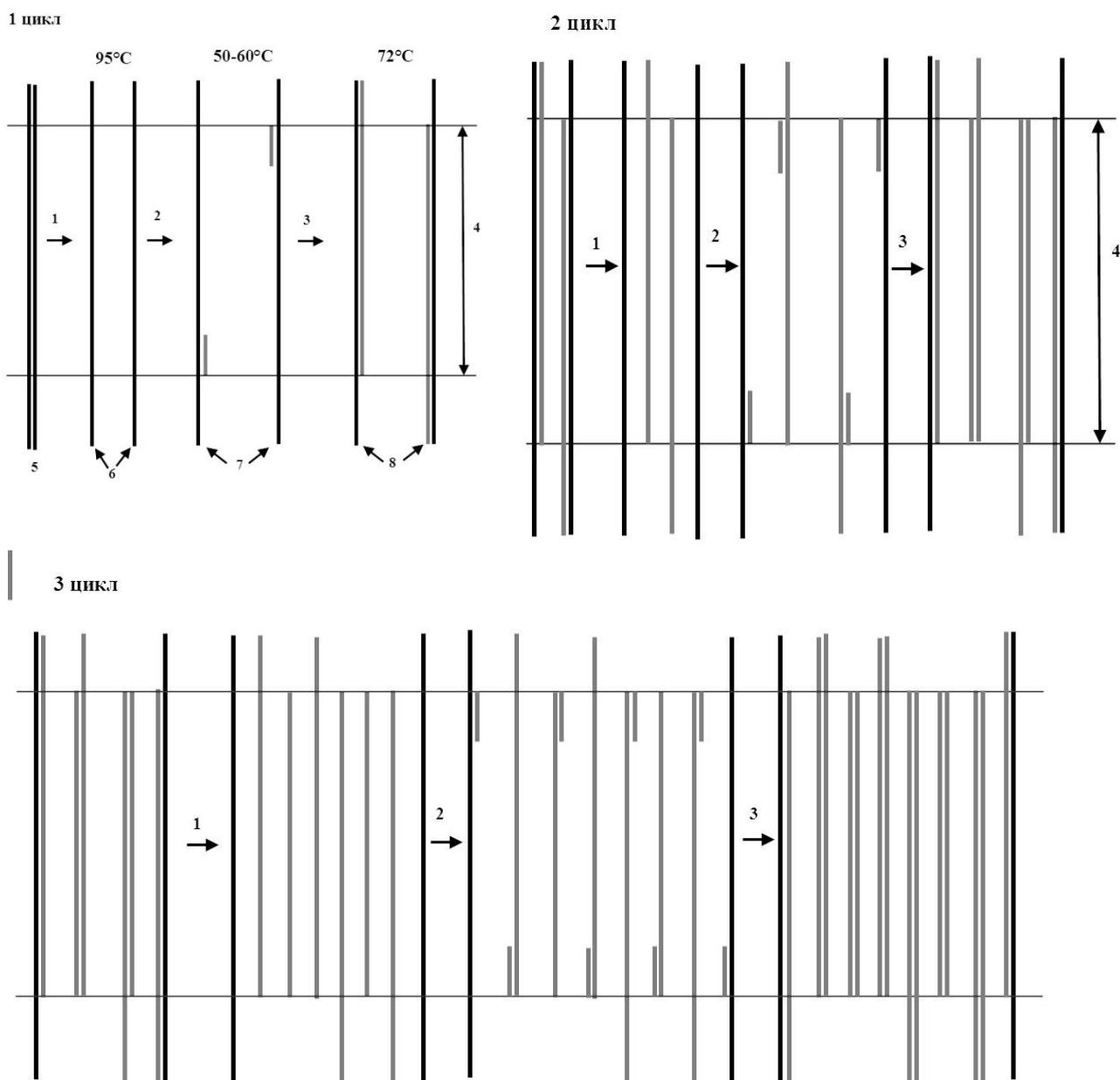
3. Элонгация. Эта стадия необходима для достраивания второй цепи ДНК и протекает при 72° С. Taq-полимераза присоединяется к двухцепочечному участку и достраивает вторую цепь из дезоксинуклеозидтрифосфатов. Продолжительность 15-60 с., в зависимости от длины ампликона. В некоторых случаях возможно объединение второй и третьей стадий цикла, тогда ПЦР называется двухступенчатой.

В молекуле ДНК различают 3' и 5' концы. Полимераза достраивает вторую цепь ДНК только в направлении от 5' к 3' концу, поэтому синтез второй цепи, началом которой является праймер, идет только с одного конца праймера, а не с обоих. По окончании первого цикла реакции из одной молекулы исходной ДНК образуются 2 молекулы, одна цепь в которых является исходной, а вторая – синтезированной. Причем синтезированная цепь короче исходной и начинается с позиции праймера. После 2 цикла образуются 4 двухцепочечные молекулы ДНК, две из которых содержат в своем составе цепи, соответствующие длине ампликона. И уже на 3 цикле из 8 двухцепочечных ДНК 2 молекулы являются ампликонами. К окончанию 4 цикла будет уже 4 молекулы ампликона, и с каждым последующим циклом их количество будет увеличиваться в геометрической прогрессии (см. рис. 23-25).

Техника постановки ПЦР состоит из трех этапов:

1. Выделение нуклеиновых кислот (пробоподготовка).
2. Постановка ПЦР.
3. Учет результатов.

В настоящее время разработано много методик выделения нуклеиновых кислот, которые отличаются по механизму выделения, скорости исполнения и качеству выделенных нуклеиновых кислот.



1 – денатурация ДНК;
 2 – отжиг праймеров;
 3 – элонгация цепи;
 4 – амплифицируемый
 участок;

5 – исходная ДНК;
 6 – одноцепочечная ДНК;
 7 – цепи ДНК с присоединенными праймерами;
 8 – достроенные цепи ДНК

Рисунки 23-25 – Накопление ампликонов в ПЦР

Классическим методом выделения ДНК считается фенол-хлороформная экстракция (или триазольная для РНК). Суть метода основана на растворимости ДНК или РНК в водной фазе и нерастворимости – в органической. Первоначально исследуемый материал подвергают воздействию протеиназы К (фермент, расщепляющий белки на более короткие пептиды). При этом происходит освобождение нуклеиновой кислоты от окружающих ее белков (реакция проходит в буферном растворе на основе воды). Далее добавляют органическую фа-

зу, содержащийся в ней фенол осаждает белки и растворяет в себе другие органические вещества, при этом нуклеиновая кислота остается в водной фазе. После центрифугирования водная и органическая фаза четко разделяются, водная фаза отбирается в чистую пробирку и к ней добавляется следующая органическая фаза (смесь фенола и хлороформа) для более глубокой очистки ДНК в водной фазе от лишних веществ. После нескольких отмывок органическими фазами проводят осаждение нуклеиновых кислот с помощью этилового или изопропилового спирта в водной фазе для отделения их от растворимых в воде побочных веществ (нуклеиновые кислоты в присутствии спиртов выпадают в осадок). Высушивая и растворяя нуклеиновую кислоту в деионизированной воде, получают ДНК или РНК. Данный способ выделения достаточно трудоемкий, длительный и связан с использованием токсических веществ, однако в результате получается высокоочищенная ДНК или РНК.

Наиболее распространенный метод экстракции нуклеиновых кислот основан на использовании сорбентов. Сорбент представляет собой мелкодисперсный порошок, нерастворимый в воде, обладающий свойством осаждать на своей поверхности нуклеиновые кислоты в присутствии сильных ионных растворов. Первоначально, как и в предыдущем методе, используют лизирующий раствор (протеиназа К или другие вещества) для разрушения белков. После осаждения нерастворимых частиц и переноса супернатанта в чистую пробирку добавляют сорбент и буферный раствор. Под воздействием буфера ДНК или РНК переходит в нерастворимое состояние и осаждается на сорбенте. После этого, ресуспендируя и осаждая сорбент, проводят его отмывку буферными растворами от примесей исследуемой пробы. По окончании этого процесса сорбент высушивают и добавляют деионизированную воду. При этом нуклеиновые кислоты переходят с сорбента в воду.

Для автоматизации процесса выделения нуклеиновых кислот используют специальный сорбент на основе магнитных частиц. Формирование осадка сорбента в этом случае достигается за счет магнитного поля, а не центрифугирования как в случае обычного сорбента. Такие приборы значительно сокращают время выделения нуклеиновых кислот из большого количества образцов и избавляют этот процесс от человеческого фактора. Их используют в крупных лабораториях, куда ежедневно поступает более 50 проб на анализ.

Для некоторых модификаций ПЦР возможно использование материала без предварительной экстракции нуклеиновой кислоты, но при этом необходимо использовать высокостабильные разновидности Taq-полимеразы, которые не подвержены ингибированию веществами, содержащимися в исследуемом материале.

После экстракции нуклеиновых кислот следует постановка ПЦР. Для этого готовят реакционную смесь компонентов с учетом их концентрации. Количество каждого компонента, необходимого для 1 реакции, умножают на количество проб (сумма исследуемых образцов и контролей) плюс 1 (для компенсации погрешностей пипетирования) и вносят в таком объеме в реакционную смесь. Далее разносят смесь по отдельным пробиркам и после этого вносят вы-

деленную ДНК или РНК. Пробирки плотно закрывают и помещают в амплификатор. В него вводят программу температурно-временных циклов реакции и запускают. По окончании реакции проводят учет результатов.

В зависимости от исполняемой методики ПЦР процесс учета результатов различается. Классическая ПЦР после ее проведения требует проведения визуализации результатов, т.к. внешний вид реакционной смеси до и после реакции одинаков. Для этого используют электрофоретическое разделение продуктов амплификации в агаровом геле. Этот процесс сводится к следующему. В микроволновой печи расплавляется гель и в него вносится бромистый этидий. Расплавленную агарозу заливают в камеру для заливки гелей и устанавливают гребенку, которая формирует лунки в геле. После застывания геля его переносят в камеру для электрофореза. Реакционную смесь смешивают с буфером для внесения, чтобы она после внесения в лунки не диффундировала в буферный раствор, и переносят в лунки геля. Камеру для электрофореза подключают к источнику тока, устанавливают силу тока и время и включают подачу напряжения в камеру. По окончании электрофореза гель переносят на трансиллюминатор (прибор, просвечивающий гель ультрафиолетом) и просматривают в ультрафиолетовом свете.

Под воздействием электрического поля ДНК будет двигаться в геле в зависимости от молекулярной массы. Чем длиннее фрагмент, тем медленнее будет его движение через гель. Таким образом, происходит разделение содержимого реакционной смеси на фракции. Содержащийся в геле бромистый этидий способен излучать оранжево-красное свечение в ультрафиолете и связываться с двухцепочечной ДНК, поэтому проходящие через гель ампликоны будут присоединять к себе молекулы этого вещества. Содержание бромистого этидия в геле очень низкое, поэтому гель не «светится». Но ампликоны, проходя через гель, встраивают в себя его молекулы и формируют зоны высокой концентрации бромистого этидия, которые в ультрафиолете проявляются в виде светящихся ярких оранжево-красных полос. Наличие светящейся полосы на уровне положительного контроля свидетельствует о наличии искомого фрагмента нуклеиновой кислоты в исследуемой пробе, т.е. проба положительная. Если полоса отсутствует или ее уровень не совпадает с положительным контролем, то она считается отрицательной. В отрицательном контроле не должно быть никаких светящихся полос. Если же они появляются, то это свидетельствует о нарушении правил работы или контаминации реактивов. Отсутствие специфической полосы в положительном контроле свидетельствует о неэффективной экстракции ДНК или неправильно приготовленной реакционной смеси.

Гель-электрофорез – трудоемкий процесс, требующий дополнительного времени на проведение анализа. Кроме того, разнесение продуктов амплификации может привести к загрязнению ПЦР-помещений ими. Поэтому в настоящее время стараются использовать ПЦР в режиме «реального времени». Данная методика не требует проведения электрофореза, а учет результатов можно проводить сразу по окончании реакции.

Преимуществами данного метода являются:

1. Прямое определение наличия возбудителей. Многие традиционные методы диагностики, например иммуноферментный анализ, выявляют белки-маркеры, являющиеся продуктами жизнедеятельности инфекционных агентов, что дает лишь опосредованное свидетельство наличия инфекции. Выявление специфического участка ДНК возбудителя методом ПЦР дает прямое указание на присутствие возбудителя инфекции.

2. Высокая специфичность. Высокая специфичность метода ПЦР обусловлена тем, что в исследуемом материале выявляется уникальный, характерный только для данного возбудителя фрагмент ДНК. Специфичность задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов, в отличие от метода иммуноферментного анализа, где нередки ошибки в связи с перекрестно-реагирующими антигенами.

3. Высокая чувствительность. Метод ПЦР позволяет выявлять даже единичные клетки бактерий или вирусов. ПЦР-диагностика обнаруживает наличие возбудителей инфекционных заболеваний в тех случаях, когда другими методами (иммунологическими, бактериологическими, микроскопическими) это сделать невозможно. В течение нескольких часов с помощью ПЦР из одного фрагмента молекулы ДНК можно получить более 50 млрд идентичных молекул. Таким образом можно изучить генетический материал, присутствующий в крошечных количествах. Чувствительность ПЦР-анализа составляет 10-100 клеток в пробе (чувствительность иммунологических и микроскопических тестов -1000-100000 клеток).

4. Универсальность процедуры выявления различных возбудителей. Материалом для исследования методом ПЦР служит ДНК возбудителя. Метод основан на выявлении фрагмента ДНК или РНК, являющегося специфичным для конкретного организма. Сходство химического состава всех нуклеиновых кислот позволяет применять унифицированные методы проведения лабораторных исследований. Это дает возможность диагностировать несколько возбудителей из одной биопробы. В качестве исследуемого материала могут использоваться различные биологические выделения (слизь, моча, мокрота), соскобы эпителиальных клеток, кровь, сыворотка.

5. Высокая скорость получения результата анализа. Для проведения ПЦР-анализа не требуется выделение и выращивание культуры возбудителя (как культуральные методы), что занимает большое количество времени. Унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции и автоматизация процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4-4,5 часа.

6. Возможность диагностики не только острых, но и латентных инфекций. Особенно эффективен метод ПЦР для диагностики трудно культивируемых, некультивируемых и персистирующих форм микроорганизмов, с которыми часто приходится сталкиваться при латентных и хронических инфекциях, поскольку этот метод позволяет избежать сложностей, связанных с выращиванием таких микроорганизмов в лабораторных условиях. Применение ПЦР-

диагностики также очень эффективно в отношении возбудителей с высокой антигенной изменчивостью и внутриклеточных паразитов.

Следует отметить, что методом ПЦР возможно выявление возбудителей не только в клиническом материале, полученном от животных, но и в материале, получаемом из объектов внешней среды (вода, почва и т.д.). Простые требования к условиям хранения и транспортировки материала в лабораторию не требуют сохранения возбудителя в живом виде, по сравнению с бактериологическими и вирусологическими методами.

Однако существуют и ограничения при проведении ПЦР. Это связано с тем, что амплифицируется ДНК как живого, так и погибшего микроорганизма. Это налагает определенные требования при использовании ПЦР для контроля эффективности лечения. В общем случае подобный контроль должен проводиться спустя промежуток времени, в течение которого происходит полная элиминация возбудителя. Обычно этот интервал составляет 4-8 недель. Кроме того, возможна перекрестная реакция, так как подбор праймеров происходит на основе существующих знаний о геноме данного и сходных микроорганизмов. Теоретически существует возможность присутствия такого же фрагмента и у других микроорганизмов, геном которых в настоящее время не расшифрован, и которые не были протестированы на возможность перекрестной реакции. Присутствие в пробе таких микроорганизмов может привести к ложноположительному результату анализа. Также на ход реакции влияет изменчивость микроорганизмов. Хотя при конструировании тест-системы фрагмент генома, используемый для амплификации, выбирается из высоко консервативной области, изменчивость микроорганизмов может приводить к тому, что некоторые генотипы или штаммы исследуемого возбудителя могут приобретать мутации в амплифицируемом участке генома и таким образом становиться неуловимыми данной тест-системой.

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ, англ. real-timePCR)

Данная методика является модификацией обычной (рутинной) ПЦР, которая требует меньшее количество времени на проведение анализа за счет отсутствия стадии электрофоретического учета результатов. Также для ее проведения требуется более сложный амплификатор, который имеет оптическую часть, измеряющую флуоресценцию.

Сущность данного метода заключается в увеличении уровня флуоресценции при образовании специфического ампликона и его регистрации после каждого цикла реакции.

Существует несколько типов ПЦР-РВ в зависимости от способа генерации репортерной флуоресценции. Два основных типа – это:

1. Применение интеркалирующих флуоресцентных агентов, флуоресценция которых значительно возрастает при связывании с двуцепочечной ДНК.
2. Использование меченых флуоресцентными агентами олигонуклеотидных проб, комплементарных участку PCR-продукта.

В качестве интеркалирующего красителя наиболее часто используют

SYBR Green. Этому красителю свойственно неспецифически связываться с двухцепочечной ДНК. При нахождении в растворе в свободном состоянии он проявляет минимальную флуоресценцию, но при связывании с двухцепочечной ДНК интенсивность флуоресценции значительно увеличивается (примерно в 1000 раз). С каждым циклом ПЦР количество амплифицированной ДНК увеличивается экспоненциально и, соответственно, увеличивается количество связанного SYBRGreen и, как следствие, наблюдается увеличение интенсивности свечения. Преимуществом данного красителя является простота использования. Его действие аналогично бромиду этидия, но в отличие от него он не взаимодействует с Taq-полимеразой, поэтому может быть внесен в реакционную смесь перед проведением реакции. Также SYBRGreen имеет меньший фоновый уровень флуоресценции, чем бромид этидия, что позволяет определять меньшие концентрации двухцепочечной ДНК.

Другими преимуществами интеркалирующих красителей, которые связываются с двухцепочечной ДНК, являются простота создания набора (необходима только пара праймеров), низкая начальная стоимость (меченые олигонуклеотиды стоят намного дороже), возможность построения кривой плавления для определения специфичности продукта.

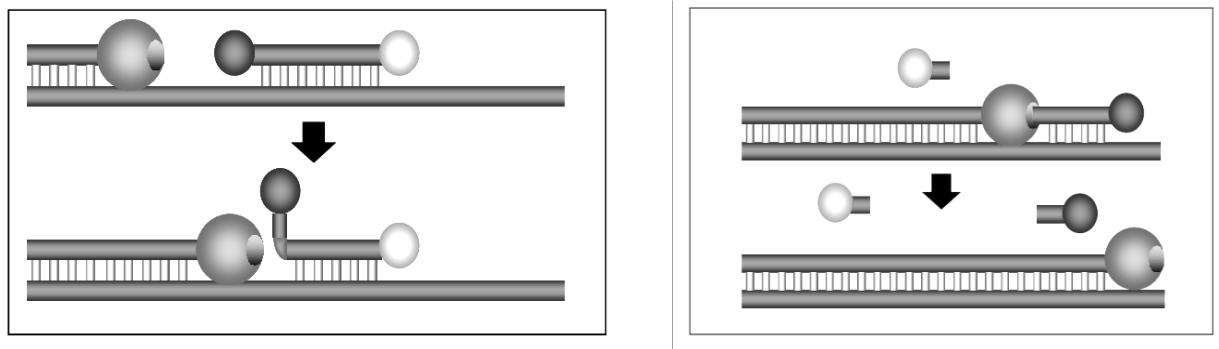
Главным же недостатком использования SYBRGreen является его неспецифичность. Из-за связывания с любой двухцепочечной ДНК невозможно различить амплификацию ДНК-мишени и образование димеров праймеров. Также, если в процессе реакции был амплифицирован неспецифический фрагмент, то это отразится на кривой флуоресценции и будет неотличимо от амплификации ДНК-мишени. В этом случае необходимо подтвердить специфичность продукта. Это можно сделать, производя разгонку продукта на агарозном геле или проанализировав кривую плавления, что гораздо проще. Принцип анализа кривой плавления заключается в том, что в амплификаторе постепенно повышается температура от низкой к более высокой, что приводит к денатурации ДНК. Чем больше молекулярная масса фрагмента ДНК и выше в нем содержание GC оснований, тем выше температура плавления. При денатурации ДНК SYBRGreen переходит в раствор и наблюдается угасание флуоресценции. Сравнивая температуры плавления известных ампликонов, легко определить наличие других неспецифичных ампликонов или праймеров-димеров.

Наряду с интеркалирующими красителями в real-time ПЦР используют меченые олигонуклеотидные пробы. Это технологии TaqMan, MolecularBeacons и LightCycler.

TaqMan PCR основан на использовании 5'-эксонуклеазной активности полимеразы. В реакционную смесь добавляют ДНК-пробы, меченные на 5'-конце флуоресцентным красителем, а на 3'-конце — фосфатной группой и гасителем флуоресценции. Пробы комплементарны участку амплифицируемой области. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу.

При отжиге праймеров проба количественно связывается с комплементарным участком ДНК. Во время стадии элонгации полимеразы синтезирует

комплементарную цепь ДНК и, дойдя до участка, гибридизованного с пробой, начинает расщеплять пробу за счет 5'-экзонуклеазной активности. В результате флуоресцентная метка отделяется от гасителя, и ее свечение может быть детектировано. Таким образом, увеличение флуоресценции будет прямо пропорционально количеству наработанного PCR-продукта (рис. 26-27).



Рисунки 26-27 – Взаимодействие праймера с Taq-полимеразой, обладающей 5'-нуклеазной активностью

MolecularBeacons (см. рис. 28) отличается от TaqMan тем, что концы пробы (на которых находятся, соответственно, метка и тушитель флуоресценции) комплементарны друг другу. В результате, при температуре отжига праймеров они схлопываются и образуют структуру типа «ручки сковородки» (stem-loop), где зона комплементарности пробы с матрицей находится в петле.

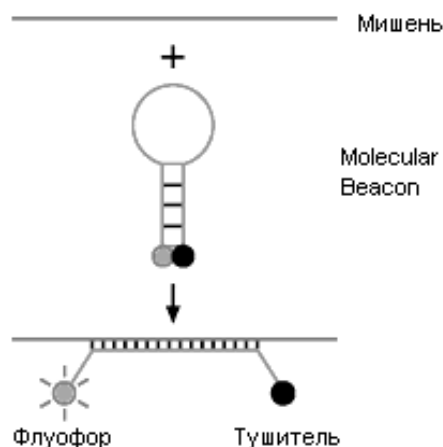


Рисунок 28 – Принцип MolecularBeacons

При гибридизации пробы с матрицей вторичная структура разрушается, флуоресцентная метка и тушитель расходятся в разные стороны, и флуоресценция от метки может быть детектирована.

В методике LightCycler (см. рис. 29) используется две пробы, меченые флуоресцентной меткой. Принцип метода заключается в переносе энергии от одного флуорофора, находящегося на 3' конце первой пробы, ко второму флуорофору, находящемуся на 5' конце второй пробы, который происходит в том случае, когда расстояние между флуорофорами составляет 1-3 нуклеотида.

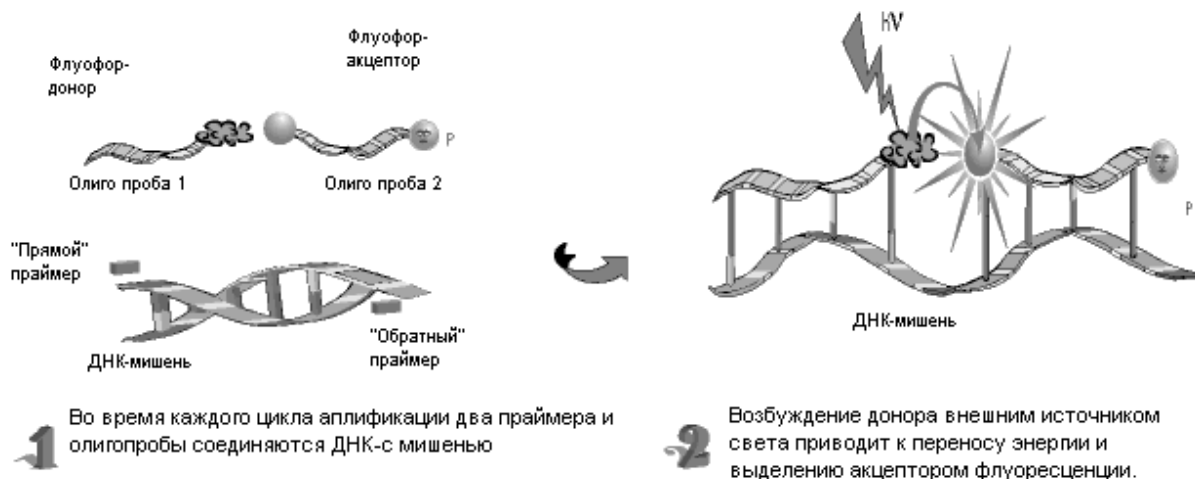
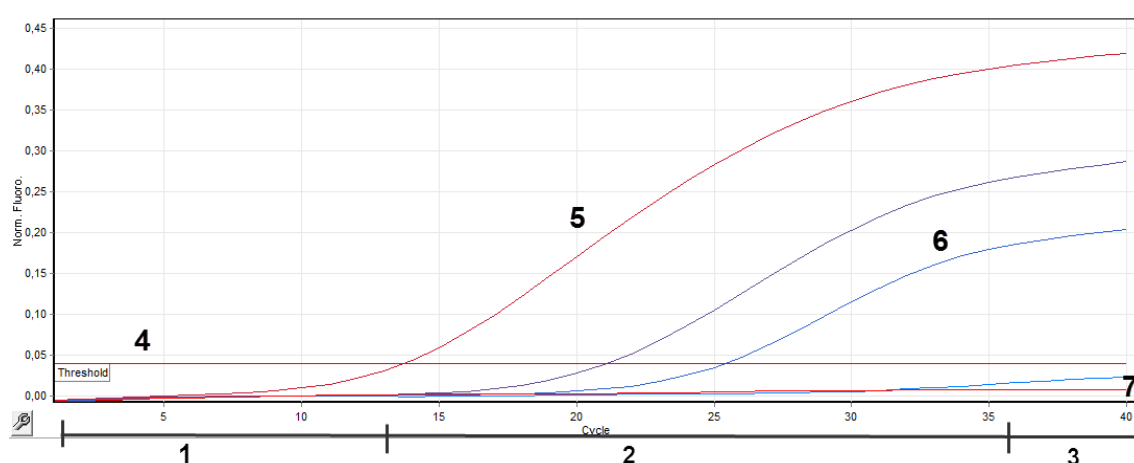


Рисунок 29 – Принцип LightCycler

Процесс учета результатов при ПЦР в реальном времени сводится к анализу графика кривых флуоресценции, который строится на основании данных, полученных с прибора после каждого цикла реакции (см. рис. 30).



- | | | |
|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 1 – фаза инициации; | 4 – пороговая линия; | 7 – отрицательный контроль |
| 2 – экспоненциальная фаза; | 5 – положительный контроль; | и отрицательные пробы |
| 3 – фаза плато; | 6 – положительные пробы; | |

Рисунок 30 – График кривых амплификации

На графике ось абсцисс соответствует циклу реакции, ось ординат – уровню флуоресценции. В начале реакции количество ампликонов невелико, и поэтому флуоресценция в пробирке ниже предела детекции прибора и соответствует фоновому уровню. С каждым циклом реакции количество ампликонов экспоненциально увеличивается и, соответственно, увеличивается флуоресценция. В определенный момент уровень флуоресценции преодолевает уровень чувствительности прибора, и мы видим подъем графика. Эта фаза от начала реакции до начала подъема графика называется фазой инициации. После этого идет экспоненциальная фаза, при которой количество ампликонов растет по экспоненциальному закону. При истощении реакционной смеси, когда один из компонентов реакции заканчивается, количество образуемых ампликонов

уменьшается, и флуоресценция остается неизменной – фаза плато. По окончании реакции определяют пороговую линию, которая соответствует уровню фоновой флуоресценции. Все исследуемые образцы, чьи кривые амплификации пересекают пороговую линию, считаются положительными, остальные – отрицательными.

По сравнению с рутинной ПЦР модификация в реальном времени обладает следующими преимуществами:

1. Скорость проведения анализа увеличивается за счет отсутствия учета реакции методом электрофореза.
2. Отсутствие контаминации лабораторных помещений продуктами амплификации, т.к. не требуется открывать пробирки и пипетировать амплифицированную ДНК.
3. Возможность наблюдения за ходом реакции и получения предварительных результатов до окончания реакции.
4. При введении положительных контролей с заранее известной концентрацией можно получить количественные данные исследуемых образцов.

Недостатки данного метода связаны с возможностью получения ложноположительных результатов при использовании нестабильного зонда (при его самопроизвольном разрушении во время реакции), а также ложноотрицательных результатов (при изменчивости организма зонд может терять специфичность и не присоединяться к матрице ДНК).

10. Дифференциальный диагноз (Инфекционный ринотрахеит необходимо дифференцировать от парагриппа-3, аденовирусной и хламидийной инфекции, респираторно-синцитиальной инфекции, пастереллеза, учитывая при этом возможность смешанных инфекций. Основными в дифференциации этих болезней являются результаты лабораторного исследования, тем более что возможно инфицирование животных одновременно несколькими вирусами и бактериями.

11. Иммуитет и специфическая профилактика

Иммуитет у переболевших животных длится не менее 1,5-2 лет, однако у животных реконвалесцентов, имеющих антитела, состояние абсолютной иммунности бывает редко, и их следует рассматривать как потенциальный источник инфицирования других животных. Для профилактики ИРТ применяют живые и инактивированные вакцины.

Переболевшие животные приобретают активный иммуитет. В их сыворотке крови обнаруживают вируснейтрализующие, комплементсвязывающие и преципитирующие антитела, уровень которых не всегда находится в прямой зависимости с невосприимчивостью животных к заражению. У животных, переболевших респираторной формой ринотрахеита, иммуитет более продолжительный (не менее 1,5–2 лет), чем у перенесших пустулезный вульвовагинит.

В зонах, где диагностируется инфекционный ринотрахеит, у телят в первые 15 дней жизни имеются колостральные антитела. Уровень их непосредственно зависит от уровня антител у матери и количества молозива, полученного новорожденным впервые 6 ч жизни. Постинфекционные и молозивные антите-

ла ингибируют образование противовирусных антител в ответ на введение вакцины.

С учетом эпизоотической ситуации для активной профилактики ИРТ используют живые и инаktivированные вакцины отечественного и зарубежного производства. Живые вакцины против ИРТ чаще всего применяют в откормочных и неблагополучных по ИРТ хозяйствах. Живую вакцину против ИРТ крупного рогатого скота из штамма КМИЭВ-V123 для вакцинации телят 10-дневного возраста применяют двукратно с интервалом 14 дней (первое введение вакцины интраназальное, второе – подкожное). Иммунитет вырабатывается к 5–7 дню и сохраняется до 1 года.

В хозяйствах, где одновременно регистрируется ИРТ, ПГ-3 и вирусная диарея, используют трехвалентную живую культуральную вирус-вакцину против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 и вирусной диареи крупного рогатого скота. Применяется для иммунизации бычков на откорме. Разработана в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси», выпускается в условиях ОАО «БелВитунифарм».

Для профилактики инфекционного ринотрахеита у новорожденных телят используют поливалентную инаktivированную культуральную вирус-вакцину против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной инфекций крупного рогатого скота «Тетравак». Стельных коров и нетелей за 2 месяца до отела вакцинируют двукратно с интервалом 21–28 дней внутримышечно в дозе 5,0 см³ в области крупа. Вторую вакцинацию проводят не позднее, чем за месяц до отела. Разработана в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси» (авторы – П.А. Красочко, И.А. Красочко, В.А. Машеро и др.). Выпускается в условиях ОАО «БелВитунифарм».

В настоящее время успешно прошла производственные испытания ассоциированная вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, и коронавирусной инфекции, эшерихиоза и сальмонеллеза молодняка крупного рогатого скота «Поливак-6», разработанная сотрудниками кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» (авторы – П.А. Красочко, Я. П. Яромчик, И.А. Красочко, Ю. А. Шашкова, П.П. Красочко).

В племенных и репродукторных хозяйствах чаще применяют инаktivированные вакцины против ИРТ. Согласно инструкциям по их применению, проводят двукратную иммунизацию животных, с интервалом между введениями 14-21 день, коров вакцинируют в последние месяцы стельности, телят от иммунизированных коров – с 40-45-дневного возраста, телят с неизвестным иммунным фоном – с 6-недельного возраста. Иммунитет вырабатывается через 14 дней и сохраняется не менее 6 мес.

12. Лечение

Лечение больных животных инфекционным ринотрахеитом должно быть комплексным.

Для специфической терапии больных животных инфекционным ринот-

рахеитом применяют гипериммунные сыворотки и сыворотку реконвалесцентов (от ранее переболевших животных). В связи с тем, что инфекционный ринотрахеит чаще протекает в ассоциации с другими инфекционными болезнями, сыворотка реконвалесцентов в большинстве случаев является более эффективной. Рекомендуется сыворотку реконвалесцентов получать и применять животным одного и того же хозяйства, одного и того же комплекса.

Доноров для получения сыворотки реконвалесцентов подбирают из числа животных, находящихся на одной ферме, переболевших респираторными болезнями, которые должны иметь хорошую упитанность, живую массу не менее 380 кг и более. Перед взятием крови их исследуют на туберкулез, бруцеллез, лейкоз, лептоспироз, хламидиоз.

Кровь от таких животных можно отбирать во время их убоя на мясокомбинате. Перед убоем исследуют сыворотку крови на наличие титра антител. Кровь берут от животных с высоким титром антител - к парагриппу-3 - 1:160 и выше, инфекционному ринотрахеиту, вирусной диарее аденовирусной и респираторно-синтициальной аденовирусной инфекции, хламидиозу и микоплазмозу - 1:32 и выше.

Кровь от животных-доноров можно брать непосредственно в хозяйстве. Ее берут из яремной вены в объеме 0,6 л на 100 кг живой массы в зависимости от упитанности и индивидуальных особенностей животного. Для этого используют стерильные 3-литровые бутылки, шланги и кровопускающие иглы. К игле присоединяют резиновый шланг длиной 100-120 см диаметром 0,2-0,3 см, а другой его конец соединяют со стеклянной трубкой. Шланг с наконечником и иглой сворачивают в кольцо, заворачивают в два слоя бумаги, перевязывают шпагатом и стерилизуют в автоклаве.

В бутылки заливают физиологический раствор из расчета 50 мл на 1 л крови. Горловину покрывают двумя слоями пергаментной бумаги, перевязывают шпагатом и автоклавируют 40 минут при температуре 120°C и давлении 1,5 атмосфер. Перед введением иглы в вену верхний слой бумаги на бутылки приподнимают, а нижний - прокалывают стеклянным наконечником резинового шланга, соединенного с иглой. Кровь необходимо направлять по стенке посуды, которую наполняют не более чем на 2/3 емкости. Перед взятием крови стенки бутылки увлажняют ранее внесенным в нее физиологическим раствором.

Кровь для свертывания фибрина оставляют на 20-24 часа при температуре 20-25°C. Сыворотку сливают в стерильную посуду и ставят в холодильные камеры. Сгустки фибрина также ставят на 48 часов в холодильные камеры при температуре 4°C для отделения оставшейся в нем сыворотки. Сыворотке дают отстояться, затем ее охлаждают, консервируют, добавляя на каждые 900 мл сыворотки 100 мл 5%-го стерильного раствора фенола.

Раствор фенола готовят на физиологическом растворе, стерилизуют в автоклаве, добавляют в сыворотку мелкими порциями при непрерывном осторожном ее помешивании.

Сыворотка хранится в темном, сухом и прохладном месте (температура 0- (+10°C)). Срок годности при таких условиях хранения - 6 мес.

Сыворотку крови расфасовывают в отдельные флаконы, наклеивают этикетки с обозначением на них наименования биопрепарата, даты изготовления и объема. Сыворотку крови проверяют в районных ветеринарных лабораториях на стерильность, безвредность и иммуногенность.

Стерильность сыворотки проверяют посевом на питательные среды (МПА, МПБ, МППБ), предварительно выдержав ее 48 часов в термостате при 37 °С. За средами наблюдают в течение 7-10 дней. Отсутствие роста колоний микроорганизмов свидетельствует о стерильности сыворотки.

Безвредность сыворотки проверяют введением ее под кожу двум морским свинкам по 5 мл и пяти белым мышам - по 0,5 мл. Препарат считается безвредным, если в течение 7-10 дней животные остаются клинически здоровыми. Безвредность сыворотки можно испытать на 2 клинически здоровых телятах, которым сыворотку вводят подкожно в дозе 2 мл на кг живой массы. Срок наблюдения 7 дней. Если в течение этого срока на месте введения и в общем состоянии телят не будет обнаружено изменений, то сыворотка считается безвредной.

Активность сыворотки к вирусу инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи определяют в реакции нейтрализации на культуре клеток или в РНГА, против вируса парагриппа-3 - в РЗГА, к респираторно-синтициальной инфекции и аденовирусу - в РНГА, хламидиозу и микоплазмозу - в ИФА. Наличие высоких титров антител свидетельствует о высокой активности сыворотки.

Сыворотка хранится в темном, сухом и прохладном месте (температура от +1 до +10 °С), Срок годности при таких условиях хранения - 6 месяцев.

Сыворотку реконвалесцентов с лечебной целью вводят подкожно или внутримышечно в дозе 2-3 мл/кг и даже 3-4 мл/кг. Через 1-2 дня при необходимости ее вводят повторно.

В последнее время рекомендуют применять сыворотку реконвалесцентов для лечения больных телят в виде аэрозолей, полученных с помощью аэрозольного генератора холодного тумана или САГ-1, САГ-4 или САГ-10. Перед распылением к ней добавляют 10 % стерильного химически чистого глицерина. Один раз в день 3 дня подряд на 1 м³ герметизированного бокса или камеры распыляют 2 мл сыворотки при экспозиции 1 час. Увеличенные до 3-4 мл на 1 м³ дозы сыворотки дают лучший результат.

Сыворотку реконвалесцентов применяют и с профилактической целью. Ее вводят телятам в день завоза на комплекс внутримышечно или подкожно в дозе 1-2 мл/кг, а затем еще 2 раза с интервалом 7-10 дней. К сыворотке крови добавляют 10 % стерильного химически чистого глицерина. Аэрозольную обработку телят можно проводить непосредственно в помещении. Один САГ-1 рассчитан на обработку 400-500 м³ помещения. В зависимости от размера помещения используют необходимое количество аппаратов. Их подвешивают на высоте 2-2,5 метра от пола. Перед включением компрессора в помещении отключают вентиляцию, закрывают двери и окна. Компрессор включают на 10 минут, затем делают перерыв, через 10-15 мин его снова включают на 10 минут.

С целью повышения эффективности сыворотки реконвалесцентов можно

проводить гипериммунизацию быков-продуцентов инаktivированными вакцинами против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторной синтициальной инфекции, ротавирусной и короновирусной инфекций. Одну из вакцин вводят первый раз внутримышечно в дозе 8 мл. Через 7 дней вакцины вводят в дозе 12 мл, а через следующие 7 дней – по 16 мл. Спустя 10 дней после 3 введения вакцины, у быков-продуцентов отбирают кровь из расчета 0,6 л на 100 кг живой массы, а через 10 дней еще раз из расчета 1,6 л на 100 кг массы.

ОАО «БелВитунифарм», на основе хоздоговоров с потребителями, готовит из крови убиваемых на мясокомбинатах животных сыворотку, пригодную для профилактики респираторных болезней на ферме, комплексе, из которых поступили животные для убоя. Сыворотка содержит комплекс специфических антител (иммуноглобулинов), отражающих в динамике результат взаимодействия макро- микроорганизмов на данный момент, в данном (конкретном) стаде (комплексе, ферме). Препарат предназначен для профилактики и лечения при ассоциативных болезнях респираторных болезнях крупного рогатого скота.

Для специфического лечения больных телят вирусными болезнями применяется поливалентная гипериммунная сыворотка против вирусных пневмоэнтеритов. Ее можно применять парэнтерально в дозе 1-2 мл/кг живой массы животного один раз в день три дня подряд, а также аэрозольным методом при помощи САГ из расчета 2 мл на 1 м³ камеры один раз в день три дня подряд.

Применение антибиотиков и химических средств для лечения больных инфекционным ринотрахеитом животных.

Наиболее эффективным направлением при инфекционном ринотрахеите крупного рогатого скота является комплексная терапия с применением специфических, а также патогенетических, симптоматических и других средств.

Применение антибиотиков и химических средств в виде аэрозолей.

1. Аэрозоль гипериммунной сыворотки или сыворотки реконвалесцентов в дозе 4 мл на 1 м³ камеры с добавлением антибиотиков тетрациклинового ряда из расчета 20 мг/м³ и 5 % химически чистого глицерина один раз в день 5-6 дней подряд. Экспозиция 60 минут. Больных телят лечат в специально оборудованных боксах.
2. Аэрозоль 20%-ного раствора молочной кислоты с добавлением 10 % стерильного химически чистого глицерина один раз в день 3-4 дня подряд из расчета 4-5 мл на 1 м³ камеры; экспозиция 50 минут.
3. Аэрозоль тимола из расчета 0,25 г на одного теленка до месячного возраста и 0,5 г - на теленка старшего возраста. Тимол растворяют в этиловом спирте в соотношении 1:16, добавляют 10 % химически чистого глицерина. Полученную смесь распыляют 1 раз в сутки в течение 3-5 дней в дозе 3-4 мл на 1 м³ камеры. Экспозиция 30-40 минут.
4. Аэрозоль препаратов йода. На 1 м³ камеры берут 1 г кристаллического йода, 0,09 г алюминиевой пудры и 0,13 г хлористого аммония. Вначале смешивают йод кристаллический с хлористым аммонием, после чего добавляют алюминиевую пудру и несколько капель воды. В результате тер-

мореракции образуется парообразный аэрозоль йодистого аммония, полученный безаппаратным способом. Лечение проводят один раз в день на протяжении 4-5 дней.

5. Аэрозоль растворимых сульфаниламидных препаратов вместе с сывороткой реконвалесцентов из расчета: на 1 м³ камеры - 0,5 г норсульфазола, 5 мл воды дистиллированной и 4 мл сыворотки реконвалесцентов, с добавлением 5 % глицерина, 2 раза в день на протяжении 5-7 дней. Экспозиция 1 час.
6. Аэрозоль 0,25 %-го раствора этония на физрастворе, в который добавляют 5 % норсульфазола растворимого, 5 % химически чистого глицерина. Смесь распыляют из расчета 5-10 мл на 1 м³ камеры 1 раз в день в течение 4-5 дней. Экспозиция 60 минут. При необходимости лечение повторяют.
7. Аэрозоль трипсина, растворенного в физиологическом растворе из расчета 26 мг на 1 м³ камеры 2 раза через день. Экспозиция 30 минут. Через 3 часа после применения трипсина телят обрабатывают аэрозолем 3 %-ного раствора перекиси водорода и 0,02 % раствора фурациллина по 3-4 мл на 1 м³ камеры. Экспозиция 30 минут.
8. Хлорскипидар, полученный методом возгонки из расчета 2 г хлорной извести и 0,02 г скипидара на 1 м³ помещения. Хлорскипидар нужно чередовать с препаратами йода, так как хлор раздражает слизистые оболочки. Курс лечения 4-5 дней.

Групповое применение лекарственных препаратов с кормом для лечения больных инфекционным ринотрахеитом телят.

При массовом заболевании крупного рогатого скота инфекционным ринотрахеитом рекомендуется лекарственные препараты добавлять в общее количество корма для всех животных данной группы.

1. Терравитин-500 по 20-40 мг/кг массы животного 2 раза в день, тримеразин по 1,0 на 15 кг живой массы 2 раза в день, бионит-120 по 3-5 г на животное 1 раз в день, аскорбиновая кислота 1,0 на животное 1 раз в день. Лечение продолжают в течение 7 дней.
2. Ветдипасфен по 1,5-2 г и ацетилсалициловая кислота по 1,0 г на животное два раза в день, аскорбиновая кислота по 1,0 г 1 раз в день. Курс лечения 6-7 дней.

Индивидуальное применение лекарственных препаратов.

1. Раствор, состоящий из: 40 % раствора глюкозы - 300 мл; 96 % спирта ректификата - 300 мл; воды дистиллированной - 600 мл. Внутривенно по 30-50 мл раствора на животное в возрасте 1-1,5 месяца и по 50-60 мл телятам старших возрастов, 1 раз в день 3 дня подряд. На 4 день болезни после введения первого состава раствора применяют следующий состав: 10 % раствор хлористого кальция - 15 мл, 40 % раствор глюкозы - 25 мл; 40 % раствор гексаметилентетрамина - 10 мл; 20 % раствор кофеина бензоата натрия - 2-3 мл. Внутривенно один раз в день, курс лечения 4 дня.
2. Раствор, состоящий из: 96 % спирт ректификат - 75 мл; изотонический

раствор - 250 мл; глюкоза порошок - 25 г; сульфакамфокаин - 6-8 мл. Внутривенно, из расчета 0,5 мл на 1 кг живой массы 1 раз в день. Курс лечения 4-5 дней.

3. Хорошим терапевтическим эффектом обладает смесь, состоящая из: вторая фракция АСД - 10 мл; сыворотка реконвалесцентов - 200 мл; 2 %-ный раствор новокаина - 10 мл, сульфакамфокаина - 16 мл. Подкожно в дозе 30-35 мл на животное 1 раз в день, 3 раза с интервалом в 3 дня.
4. Эффективны при инфекционном ринотрахеите противовирусные препараты – рекомбинантный гамма-интерферон, биферон, препараты серебра, ципровирин, рибовирин, абактан Д и др.

При инфекционном ринотрахеите для предупреждения наслаивания различной микрофлоры бактериальной этиологии (условно-патогенные и патогенные сапрофиты) хламидиями и микоплазмами необходимо применять антибиотиков широкого спектра действия.

Применение отхаркивающих и разжижающих средств:

1. Натрий гидрокарбонат (сода пищевая) с молоком, обратом или комбикормом в дозе 25-27 г на 100 кг живой массы ежедневно в течение 6-8 дней.
2. Йодистый калий внутрь с молоком или обратом в дозе 3-4 г на животное в течение 7 дней.
3. Хлористый аммоний внутрь в дозе 10 мг/кг живой массы 2 раза в день на протяжении 5-6 дней.
4. Эуфиллин подкожно в дозе 0,1-0,3 г чистого вещества на теленка 1,5-2 месячного возраста 2 раза в день в течение 5 дней.
5. Листья мать-и-мачехи внутрь в дозе 20 г на животное в виде отвара в течение 6-7 дней.

Эффективность всех лечебных мероприятий во многом зависит от обеспечения животных полноценными кормами и создания нормальных условий содержания.

13. Профилактика и меры борьбы (МЭБ и РБ)

Мероприятия по профилактике инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота

Основой профилактики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота является строгое соблюдение ветеринарных требований по охране хозяйств от заноса возбудителей инфекционных болезней, проведение комплекса мер, направленных на повышение резистентности организма животных, своевременная диагностика болезней.

В целях предупреждения заноса возбудителя инфекционного ринотрахеита на комплексы и фермы комплектование поголовьем необходимо проводить животными из благополучных по инфекционным заболеваниям хозяйств с карантинированием их в течении 30 дней. В этот период вновь поступивших животных подвергают одновременному клиническому осмотру с обязательной термометрией, диагностическим исследованиям, а при необходимости и вакцинации.

Получение здоровых телят на молочно-товарных комплексах и по производству говядины.

При выращивании молодняка крупного рогатого скота важной задачей является повышение естественной резистентности их организма, в том числе и иммунного статуса после их рождения. Внутриутробное развитие телят во многом зависит от состояния здоровья маточного поголовья, мониторинг за которым должен начинаться еще до наступления беременности. В хозяйствах для организации полноценного кормления маточного поголовья необходимо создавать хорошую кормовую базу - 20-25 ц кормовых единиц на условную голову в год. Глубокостельных коров и нетелей обеспечивают кормами хорошего качества. И рацион для них должен быть сбалансирован по питательным веществам, переваримому протеину, витаминам, минеральным веществам, сахару в зависимости от массы животных и планового удоя. Животным ниже средней упитанности суточную норму кормления увеличивают на 1-2 кормовые единицы. Сухостойных коров за 60 дней, а нетелей за 90 дней до отела формируют в отдельные группы. Глубокостельных коров запускают 2 месяца до отела и содержат в сухостойной группе до 8-10 дня перед отелом. В этот период следует обращать больше внимания на кормление и моцион животных.

Суточный рацион коров на 6-9 месяце стельности должен содержать: сухих веществ - 14 кг, крахмала - 5-6 кг, сырого протеина - 800-900 г, кальция - 75 г, фосфора - 50 г, железа - 840 г, меди - 140 мг, магния - 500 мг, кобальта - 1,4 мг, йода - 14 мг, витамина А - 65000 ИЕ, витамина Д - 5000 ИЕ, витамина Е - 1000 ИЕ.

Период отела коров и нетелей и приема новорожденных телят.

Глубокостельных коров и нетелей за 8-10 дней до отела переводят в родильное отделение, которое состоит из родильного помещения и профилактория. Родильное отделение должно быть рассчитано на 12 % имеющегося маточного поголовья и состоять из 3-х изолированных секций: предродовой, отела и послеродовой.

Коров и нетелей с признаками наступающих родов за 10-12 часов до отела переводят в родильные боксы (денники) секции отела. Полы в них должны быть утепленными с использованием доброкачественной соломенной подстилки. В боксах животных не привязывают.

В родильном отделении обеспечивают круглосуточное дежурство опытных операторов.

У новорожденного теленка немедленно после рождения удаляют салфеткой или полотенцем слизь из ноздрей, рта, ушей, обрывают пуповину (если не произошел самопроизвольный обрыв), из культи выдавливают кровь и дезинфицируют ее 5 % раствором йода или 1 % раствором калия перманганата, или дезинфицирующим сопреем. Затем предоставляют корове возможность облизать теленка, обсушивают его в специальных термоклетках при температуре +40 +45 ° С, после чего взвешивают.

При отелах в боксах теленка оставляют с коровой не менее одних суток, затем его переводят в профилакторий.

Коров после отъема телят переводят в послеродовой сектор родильного отделения, в котором содержат не менее 10 дней.

Период содержания телят в профилактории до 20-ти дневного возраста.

Новорожденных телят после отъема от коров переводят в изолированные секции профилактория в индивидуальные клетки размерами: 1200 x 900 x 1200 мм. В каждой секции для обогрева телят оборудуют светильники с инфракрасными лампами, а также устанавливают ультрафиолетовые источники (ИКУФ-2) из расчета 1 источник на 2 клетки. Профилакторий должен иметь 4-5 изолированных друг от друга секций. Каждая секция заполняется телятами не более чем за 4 дня. Продолжительность содержания телят в профилактории не менее 20 дней.

В секциях профилактория должны соблюдаться следующие параметры микроклимата: температура воздуха + 20 °С; относительная влажность - 75 %; движение воздуха - 0,16 м/с; содержание аммиака в воздухе - 0,15 мг/л; воздухообмен 20 м³/час на 1 ц живой массы.

Родившийся теленок практически лишен антител, он получает их с первыми порциями молозива. Для обеспечения максимальной иммунной защиты новорожденных необходимо учитывать следующие основные особенности колострального иммунитета: слизистая кишечника телят проницаема для иммуноглобулинов в течение первых 3-часов - а максимальное количество антител в молозиве матери содержится в первый час после родов. В связи с этим первую порцию молозива теленок должен получить не позднее, чем через 1-1,5 часа после рождения. Телятам до 7-дневного возраста выпаивают молоко и молозиво от коров-матерей не реже 4-5 раз в сутки, в дальнейшем - сборное. Не допускают выпаивания телятам молозива от коров, больных маститами.

Начиная с 3-4 дня жизни, телятам через 1-2 часа после кормления дают остуженную до 20-25 °С кипяченую воду, с 10-12 дневного возраста - воду 12-15 °С. Телятам назначают витамины, микроэлементы, различные общеукрепляющие организм препараты. С 11-го дня теленка переводят на трехратное кормление.

После окончания срока выращивания в профилактории, телят переводят в телятник или на комплекс для группового содержания. Отстающих в росте и развитии телят комплектуют в группу и размещают в отдельную секцию.

При комплектовании технологических групп не допускают постановку в одну изолированную секцию телят разновозрастных групп.

Подготовка помещений к постановке молодняка в хозяйствах.

При подготовке помещений к размещению очередной партии животных необходимо провести санитарный ремонт, их механическую очистку и дезинфекцию всех поверхностей, подлежащих обеззараживанию.

Механическую очистку помещений проводят после полного их освобождения от животных и лишнего оборудования. После этого струей воды под давлением удаляют остатки навоза и корма. Наиболее загрязненные поверхности орошают горячим 2 %-м раствором гидроксида натрия или 3-5 %-м раствором кальцинированной соды и через 30-40 минут моют повторно струей воды под давлением.

Дезинфекцию в помещениях проводят методом орошения, а при возможности их герметизации - аэрозольным методом. Дезинфекцию можно проводить аэрозолями 40 % формальдегида из расчета 5 мл на 1 м³ при температуре воздуха в помещении не ниже +15 °С при относительной влажности не менее 60 %. Экспозиция - 24 часа. После этого помещение проветривают или остатки формальдегида нейтрализуют 20 % раствором аммиака из расчета 10 мл на 1 м³ помещения.

Подготовка и отбор телят для постановки на комплексы и фермы по откорму бычков и выращиванию телок и нетелей. Комплексы и фермы по производству говядины и выращиванию телок и нетелей должны комплектоваться здоровыми одновозрастными животными. Молодняк должен поступать на комплексы и фермы уже приученный пить молоко из ведер или поилок.

За две недели до отправки телят из хозяйства их обязательно вакцинируют против инфекционного ринотрахеита в зависимости от эпизоотической обстановки. Количество хозяйств поставщиков должно быть как можно меньшим. Максимальное их количество не должно превышать 4-5.

Для комплектования откормочных комплексов и по выращиванию телок и нетелей необходимо отбирать клинически здоровых с хорошей энергией роста телят, в сыворотке их крови должно содержаться не менее 5-6 % белка. Отбор и прием каждой очередной партии телят производится с участием ветеринарных специалистов с обязательным индивидуальным клиническим осмотром и термометрией. Перед отправкой за 30-60 минут до погрузки каждому теленку выпаивают по 125 г глюкозы на 2 л воды, внутримышечно вводят по 5 мл три-витамина, 500000 ЕД тетрациклина или окситетрациклина. Если телята должны транспортироваться на расстояние 40 км и больше – им вводят аминазин в дозе 1,7 мг на 1 кг живой массы теленка, при отсутствии аминазина можно вводить димедрол. Перед погрузкой проводят санитарную обработку телят.

Транспортировка и прием телят на комплексы и фермы по откорму крупного рогатого скота и выращиванию телок и нетелей. Транспортировать телят надо с предосторожностями, не подвергая их переохлаждению, перегреву, травматическим воздействиям. Кузов автомашин обивают мягкими упругими материалами. На дно кузова посыпают сухие опилки или солому, которую меняют после транспортировки каждой партии телят.

Поступающих на фермы или комплексы телят размещают в специально закрепленные за каждым хозяйством карантинные секции или боксы, не допуская смешивания животных из разных хозяйств. Комплектуют группы телят в секции в сжатые сроки (не более 3-5 дней) одновозрастным поголовьем. Секции или боксы эксплуатируют по принципу "все пусто - все занято", предусматривающему полное освобождение помещений от всех животных предыдущей технологической группы, санацию и подготовку к размещению следующей группы. Категорически запрещается доукомплектование секций новыми партиями животных.

Поступивших телят в течение первых 7-8 часов нельзя поить холодной водой (автопоилки отключают). Через 5 часов им выпаивают молоко или ЗЦМ с

добавлением 125 г глюкозы на животное.

Поступивших на комплекс телят обрабатывают сывороткой реконвалесцентов, а через 10-15 дней вакцинируют с учетом эпизоотической ситуации.

На комплексах и специализированных фермах не допускаются перегруппировки телят различных производственных групп, нарушающие установленную технологию.

В секциях в зимний период температура воздуха должна быть: для телят в возрасте 20-90 дней - +15 °С, 90-120 дней - +12 °С, старше 4-х месяцев - +10°С. Относительная влажность 75 %, скорость движения воздуха 0,3-0,5 м/с, содержание углекислого газа 0,2 %, аммиака 0,2 мг/л. Особенно опасно превышение таких показателей одновременно как влажность и содержание аммиака.

В теплый период года скорость движения воздуха должна быть 0,5-0,8 м/с.

При переводе телят из одного помещения в другое необходимо сохранять первоначальные технологические группы, не допуская их смешивания.

В обычных хозяйствах важнейшим моментом в профилактике инфекционного ринотрахеита является выращивание телят холодным методом – в специальных индивидуальных домиках. Индивидуальные клетки с новорожденными телятами в зимний период содержать в закрытых помещениях или под оборудованными навесами. Для избегания сквозняков и сырости домики, размещаемые на открытом воздухе, обкладывать тюками соломы или оббивать рубероидом (деревянные). Вход в клетки закрыть мешковиной или брезентовым поломом, который опускать при температуре ниже -10 °С. Слой соломы, в качестве подстилочного материала, в зимний период в клетке должен быть не менее 30 см.

После перевода телят в старшие группы, освободившиеся клетки подвергнуть тщательной механической очистке и влажной дезинфекции 5 % горячим раствором натрия гидроокиси или формальдегида. В специально оборудованных навесах (при клеточном содержании телят) проводить аэрозольную дезинфекцию (в присутствии телят) 1- 1,5 % горячим раствором формальдегида один раз в две недели.

Племенных животных (быки, телки), поступивших по импорту, карантинируют 30 дней и используют в строгом соответствии с Инструкцией «О ветеринарно-санитарных мероприятиях при импорте животных, продуктов и сырья животного происхождения и фуража».

Выполнять требования работы предприятий закрытого типа (разделение территории ферм на производственную и хозяйственную зоны, выполнение санитарных правил обслуживающим персоналом со сменой одежды и обуви в санпропускниках, запрещение посещений ферм посторонними людьми, наличие дезбарьеров и др.).

14. Мероприятия по ликвидации инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в случае его возникновения

При подозрении на заболевание животных инфекционным ринотрахеитом работники хозяйств (ферм) обязаны немедленно сообщить об этом ветеринар-

ному врачу, который проводит клинический осмотр животных, выявляет и изолирует больных, получает от них материалы и направляет в диагностические ветеринарные учреждения для подтверждения диагноза.

При установлении инфекционного ринотрахеита, хозяйство объявляют неблагополучным по этой болезни и решением исполкома районного Совета народных депутатов вводят ограничения. При этом запрещают ввод в хозяйство и вывод из него животных, а также перегруппировку их внутри хозяйства, вывоз фуража и предметов ухода. Для ухода за животными закрепляют отдельный обслуживающий персонал.

Всех животных, за исключением больных, находящихся в новом эпизоотическом очаге, немедленно иммунизируют вакциной против инфекционного ринотрахеита согласно наставлению по ее применению. Больных животных изолируют и лечат гипериммунной сывороткой, неспецифическим глобулином или сывороткой реконвалесцентов. При осложнениях секундарной инфекцией применяют антибиотики, желательно пролонгированного действия, сульфаниламидные и нитрафурановые препараты.

В хозяйствах мясного направления при стационарном неблагополучии (стационарный эпизоотический очаг) всех животных, подозрительных по заболеванию и подозреваемых в заражении, иммунизируют вакциной против инфекционного ринотрахеита.

Животных хозяйств молочного направления, находящихся в новом эпизоотическом очаге, иммунизируют вакциной согласно наставлению по ее применению. Больных животных лечат. Животных, находящихся в угрожаемой зоне, вакцинируют инактивированными вакцинами.

Оздоровление племенных станций от ИРТ осуществляют без применения вакцин. Быков с признаками баланопостита выбраковывают; сперму, полученную от них за 2 месяца до болезни, уничтожают. Сперму от всех быков направляют для вирусологического исследования, а сыворотки крови - для серологического. Быков, у которых в сперме обнаружен вирус или в сыворотке крови выявлены противовирусные антитела, выбраковывают, а сперму от них уничтожают. В дальнейшем 2 раза в год от быков исследуют на ИРТ сперму и сыворотки крови. Для осеменения коров используют сперму только от здоровых быков. Племенное предприятие объявляют благополучным при отсутствии положительных серологических реакций и баланопоститов у быков-производителей, а при исследовании их спермы не выделен вирус ИРТ.

Помещения, где содержатся больные и подозрительные по заболеванию животные, а также предметы ухода, спецодежду, подстилку и навоз обеззараживают в соответствии с «Инструкцией по проведению ветеринарной дезинфекции, дезинвазии, дезинсекции и дератизации».

Шкуры павших и вынужденно убитых животных обеззараживают путем вымачивания в дезрастворе: 50 г алюминиевых квасцов, 200 г поваренной соли на 1 л воды при температуре 16–18 °С в течение 48 ч.

Туши убитых животных после созревания мяса и при отсутствии в них дегенеративных изменений выпускают без ограничений. При обнаружении

воспалительных и некротических процессов на слизистой носа, трахеи, легких, желудочно-кишечного тракта эти органы подвергают технической утилизации.

Молоко от больных и подозрительных по заболеванию животных после пастеризации при 70 °С в течение 30 мин. может быть использовано в корм животным.

При входе в помещения, где содержатся больные животные, устанавливают дезматы, обильно смоченные дезраствором.

Хозяйство объявляют благополучным по инфекционному ринотрахеиту - пустулезному вульвовагиниту и ограничения с него снимают через 30 дней после последнего случая выздоровления больного животного. Перед снятием ограничений помещения, где находились больные животные, подвергают заключительной дезинфекции, о чем составляют акт.

Литература

1. Биологические препараты для профилактики вирусных заболеваний животных: разработка и производство в Беларуси / П. А. Красочко [и др.]. – Минск : Беларуская навука, 2017. – 492 с.
2. Болезни крупного рогатого скота и овец / П. А. Красочко [и др.]. – Махачкала, 2007. – 657 с.
3. Ветеринарная энциклопедия : в 2 т. Т. 1. А – К / С. С. Абрамов [и др.] ; ред. А. И. Ятусевич. – Минск : Беларуская Энцыклапедыя імя Петруся Броўкі, 2013. – 463 с.
4. Ветеринарная энциклопедия : в 2 т. Т. 2. К – Я / С. С. Абрамов [и др.] ; ред. А. И. Ятусевич. – Минск : Беларуская Энцыклапедыя імя Петруся Броўкі, 2013. – 597 с.
5. Выбор варианта вакцины против инфекционного ринотрахеита / В. В. Максимович [и др.] // Белорусское сельское хозяйство. – 2016. – № 2 (166). – С.34–36.
6. Выращивание и болезни телят (кормление, диагностика, лечение и профилактика болезней) : монография / В. С. Прудников [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2016. – 367 с.
7. Диагностика инфекционных болезней сельскохозяйственных животных: вирусные заболевания : монография / А. А. Шевченко [и др.]. – Краснодар : КубГАУ, 2018. – 485 с.
8. Диагностика, лечение, профилактика и меры борьбы с желудочно-кишечными болезнями молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии : рекомендации / Н. В. Сеница [и др.] ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины, Кафедра эпизоотологии и инфекционных болезней животных. – Витебск : ВГАВМ, 2013. – 45 с.
9. Диагностика, лечение, профилактика и меры борьбы с респираторными болезнями молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии (рекомендации) / Н. В. Сеница [и др.]. – Витебск: УО ВГАВМ, 2019. – 54 с.
10. Диагностика, лечение, профилактика и меры борьбы с респираторными болезнями молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии : рекомендации / Н. В. Сеница [и др.]; Витебская государственная академия ветеринарной медицины, Кафедра эпизоотологии и инфекционных болезней животных. – Витебск: ВГАВМ, 2013. – 42 с.
11. Иванова, И. П. Инфицированность стад крупного рогатого скота возбудителями респираторных инфекций в хозяйствах Минской области / И. И. Иванова, П. А. Красочко // Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию со дня образования БелНИИЭВ им. С.Н. Вышелесского / Белорусский НИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского. – Минск, 2000. – С. 105–106.
12. Инфицированность молодняка вирусом инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / П. П. Красочко [и др.] // Современные технологии сельскохозяйственного производства : материалы XXIII Международной научно-практической конференции (г. Гродно, 15 мая 2020 г.). – Гродно : ГГАУ, 2020. – С. 31–33.
13. Кашко, Л. С. Серологический мониторинг крупного рогатого скота в отношении вирус-возбудителей пневмоэнтеритов телят / Л. С. Кашко, П. П. Красочко // Достижения науки и техники АПК. – 2014. – № 11. – С. 66–68
14. Красочко, П. А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота : автореф. дис. ...д-ра биол. наук : 03.00.23 / П. А. Красочко ; ФГУ ВНИТИБП РАСХН. – Щелково, 2009. – 46 с.
15. Красочко, В. П. Генетическая вариабельность вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / В. П. Красочко, П. П. Красочко, Я. П. Яромчик // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2020. – Т. 56, вып. 1. – С. 57–60.
16. Ветеринарные и технологические мероприятия при содержании крупного рогатого скота / П. А. Красочко [и др.]. – Смоленск : Универсум, 2016. – 508 с.

17. Красочко, П. А. Иммуностимуляторы и современные способы коррекции иммунного ответа / П. А. Красочко, В. А. Машеро // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология и санитария. – 2004. – № 1. – С. 32–36.
18. Красочко, П. А. Колостральный иммунитет у телят, полученных от коров, иммунизированных против ротавирусной инфекции и колибактериоза крупного рогатого скота / П. А. Красочко, Ю. В. Ломако, Я. П. Яромчик // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2010. – № 2. – С. 58–62.
19. Красочко, П. П. Сравнительная иммуногенность вакцин против инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в условиях хозяйства, не проводящего специфическую профилактику / П. П. Красочко, Я. П. Яромчик, Л. С. Кашко // Актуальные проблемы биотехнологии в аграрно-промышленном комплексе : материалы Международной научно-практической конференции / Институт экспериментальной ветеринарии. – Минск, 2015. – С. 219–222.
20. Методические указания по отбору биологического материала для лабораторных исследований / С. В. Петровский [и др.]. – Витебск : УО ВГАВМ, 2017. – 48 с.
21. Молодняк крупного рогатого скота: кормление, диагностика, лечение и профилактика болезней : монография / Н. И. Гавриченко [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2018. – 288 с.
22. Новые и возвращающиеся болезни животных : монография / А. И. Ятусевич [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2016. – 400 с.
23. Определение интерферониндуцирующей активности комплексного противовирусного препарата / П. А. Красочко [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2018. – Т. 54, вып. 2. – С. 35–38.
24. Организационно-технологические требования при производстве молока на молочных комплексах промышленного типа [Электронный ресурс]. – Режим доступа : https://mshp.gov.by/documents/animal/trebovaniya_moloko.pdf. – Дата доступа : 13.08.2020.
25. Оценка эпизоотической ситуации по инфекционным энтеритам телят в хозяйствах Витебской области / П. А. Красочко [и др.] // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2018. – Вып. 2 (9). – С. 35–39.
26. Средства специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота и свиней : практическое пособие / П. А. Красочко [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 368 с.
27. Эпизоотологический метод исследования : учебное пособие / В. В. Макаров [и др.]. – Санкт-Петербург : Лань, 2009. – 224 с.
28. Эпизоотология и инфекционные болезни : учебник для студентов и магистрантов учреждений высшего образования по специальности «Ветеринарная медицина» / В. В. Максимович [и др.] ; ред. В. В. Максимович. – 2-е изд., перераб. и доп. – Минск : ИВЦ Минфина, 2017. – 823 с.
29. Яромчик, Я. П. Анализ отчетности ветеринарных диагностических учреждений Республики Беларусь по инфекционным энтеритам телят / Я. П. Яромчик // Молодые ученые - науке и практике АПК : материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых (г. Витебск, 5–6 июня 2018 г.) / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2018. – С. 47–49.
30. Выращивание и болезни молодняка : практическое пособие / А. И. Ятусевич [и др.] ; ред. А. И. Ятусевич [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2012. – 816 с.
31. Рисунок 1. Интернет-источник: https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZivSAf880yFkL5fm0CeAGe2HVYb4s0re9NgSEi5cP7otKWofKfOLageGZgTLqJD4RxTbE3FnLbYgexkm86in04Aoc0Ktd52G7b7TSiY3mT9p3UQZ8IB4Ot9IzilHwJmhi9OhPdeAkBWOpGCWpD1piqNCaYAS99R4EUB2xL9bmMXceFSLWh1S21wkvxWV9QmmMI4-mm8_1FpE5Ba97D0nhR8mLo-jyeA-a3rR9UbRYhZV7zXcyF96eMDvKAQ5f11rYMb68Ww-doVYoni1Omx1efJl0GtQzLFXLCiyBWjO_1TIVp_1hn1tpOSffum2AAF1GYdMQclak8AJCb

Va3gPkDb8q2Tvm4KfQ&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru.

32. Рисунок 2. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?q=%D0%92%D0%B8%D1%80%D1%83%D1%81+%D0%B8%D0%BD%D1%84%D0%B5%D0%BA%D1%86%D0%B8%D0%BE%D0%BD%D0%BD%D0%BE%D0%B3%D0%BE+%D1%80%D0%B8%D0%BD%D0%BE%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%85%D0%B5%D0%B8%D1%82%D0%B0+%D0%BA%D1%80%D1%83%D0%BF%D0%BD%D0%BE%D0%B3%D0%BE+%D1%80%D0%BE%D0%B3%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%B3%D0%BE+%D1%81%D0%BA%D0%BE%D1%82%D0%B0,+%D1%83%D0%BB%D1%8C%D1%82%D1%80%D0%B0%D1%82%D0%BE%D0%BD%D0%BA%D0%B8%D0%B9+%D1%81%D1%80%D0%B5%D0%B7+%D1%84%D0%BE%D1%82%D0%BE&sxsrf=ALeKk02TpDSaFFwslDKYVVP2onsKkr1K2w:1596605503644&tbm=isch&source=iu&ictx=1&fir=bj2Nh0RiwNRmDM%252Cdw1Vl7PZWLVl-M%252C_&vet=1&usg=AI4_-kSUcd2fWvfA1hA-xRWRTD0qJuBCnQ&sa=X&ved=2ahUKEwiiipD_qoPrAhUxi8MKHZb2CwUQ9QEwBnoECAoQBQ&biw=1235&bih=767#imgsrc=XYLaOnMQyXE82M.
33. Рисунок 3. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZivaHPXBFdrCz6fm4v9I2QTomhcQeBVb37cH63TbfBtzQ93ddLL67oHJOzWcRK9X6U5Bwrj9scBy1xlkW8uihG37qRlMXzyd6i3YbvRHBfUPYj8fCLHA8CjDgC2ku9nrjWj0TN2M2vkErd2Lgu8Up7BAIf4DpWsT9vM7UbRLoqXuNsZDaTqIZhOV1Gk_1gukFlkOSFRbeHLsY-nlXI7_1Zm5-Gt0Cx-2dxjyj01tuw001Y6eXlNqviG7XIKPIocPScsEsiYbPRiUtYsOv2p8kIACdbqUiTqjl7SFhghKEV1TCa-IY8hAbSx_1aUUGpSpW1tHlR282gQSFCJ3DXRbjrN9gg97jyByg&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru.
34. Рисунок 4. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZiskzScoeBruS46keLoJeu3GjhzCdhwmCPkZMiY3VdsAua4LJy7uxvLdeFNImGnoiRmo2us4P28vQD54cak48d6qLNCC3VbBYk5mX5AAXYH-3mR9RN-77_16_1R7WBZ6UyWXNd-c-rS-MjJTbFTp-siRKOap1EKEZiYNBe7Qx0y-xV00_1ZPNaMFarXwYr1LUm5Pxs8TQOll8EHXQtbdWbS2Px50O55EwNJ78BpRnRnWOju9FNraaDHoFKepxNMivJ1TW6HCHnD56oBnMBZgc4v59CVJbVOmb_1FbB5S9LrAZzPUdYfk36QTmjkbMZlCZ84f7En_1ktRidd0Tg7iV4WcWIZcKMYwc8g&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
35. Рисунок 5. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZitnkmgtfrkgPFoM-P5NSzTcNVFk_1cKMNdHCLuV2MUXe2-dmHcDHhb5mZFBs_1u0m3PkWidbgPoM3AfuiiGoMbhr-Csrk64veypsxxlxbuzZKk1g6rx3Y8sTZX-Cho3jLcAEMZOotvd9TvZ2EgF4gKj2s3tWKSicY8Kr_1ioK3IR_161W-MlDEuyVoXdObpDKGHvNgNO9_1-rRivCQR09J1tJGnhidldbqr6nO7ROWtqFcAB-nD46aa1j5IGiKBFuY6GHMrYP0S5yUP2ryfRZayvmvF5o1Xq7D_17-2d1Xjx-aKRQK7TnHXscbDhaF2QCZkiu8kKZl4GbS-WsZ4DVEBj8xIL1yq4cA&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
36. Рисунок 6. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZiu91wfQjmf7xF6I1mnX5Z_1YOsHqL1xIqJFsyD9gYY7q8w08vwQCZzVSvLyyLOBeez_1o95J9zOxbIG6PBsPel6vxVw9DacZx_1DAs6Z8nHj1A29iBBY_10tomDMwldmLdnrndxd5g17LtFHSdSCCIU1IWgkMI7qP7wucX7R1CHEjn

0y83AACwkF2mK9j7aS3zIb9qHb4TDnmj2lXIeRowJA1spsC5MeoMgGE4jOg1gATaR6Lok
yeF0IkpDdxqq0adjrngns7Vl-X3PyyursRddI13J-
S0Z52VLqge0jnpO0hS31x6oxldjM5DBO8sfFHNxHt6btaAtdiYXPMaIVIOGHX5gIjn0A&btn
G=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA
%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.

37. Рисунок 7. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZivR6DwLPe32b-3iYkBaNrGxX2rRIUG-qPy4_1qcZ561hswYZFojmT_18-n2Gbmvh3Ejw8iZpApAPjbAw5dAhc_1SBgi-vXqb6xhCcAu30V77BELxeKN3LkfehUxtliePVUS_1mImnCix6CkbQbZwijKXUI7FOpC-KU5C0gNWgnWJuWMw50SvOJEAPkdDHoB8S8EpMXkQfPdX6a-sreQuBsSZNE3bbGLx68PTYIB6Yg_1zjX-zVtTl6m4PLUCpRo-YzGHGnsjp3OoJgI2WdHk6EhE-Z73XHFEgCxMUD_1dPKnrW4mgGIdMUFdDojm8C_1k0pIvm_1xPlgUmCCTzuvM-PmhxxI0EcZsjWkQ&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
38. Рисунок 8. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZivhXrySRh64WljFWKtDzs2wzGVRM5t1MNK687-21aM0-WLyJnp-3rsRhEwMxNNGrDY9Epa8sqv1fEUouFIwFoSAwhEgAn5lyON4xMM4E_1M5D6dKCCt-kHlK-8DLsk7LGGcLR8pRcjRHoV1GFRdVhNtvV7ZoQcvqHvA_1bTdxkyecYEEY98F6raG4hwK8BTSejZNqQTrO2Opqh5n7-nS979Et82r_1NdUvV_1IEW5OnVOjTY4LdtEzVb25Ne8dGDHM21xh49cpwooJXQVKxg7OWefB0HqYx_1khSd_19sXrHbqaedcwGxHSEAugQc3_1TczBs_1281qBuq3J50_1iFYb5trbjnnT4QirZGw&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
39. Рисунок 9. Интернет-источник:https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZisdcA--uSmg0UDqfZicobrZxHxk8thpyg313metzkFKZebmb9tNd-j33R5bcd9YZLrrloAN4_1OOKbX_1wzX_1h3decirce_1rZcWCXBvfpzDcYXKa-Ut5YDe32LBr7sZe1-2V0e43vaX3DaCBsNWlh2jHvYX000J0g-0Celf4cQ_1LyGmrLxqML_1txTlbGWvYOpMZZKTWBR9Klek8hIGBuYK9DsdBxuPV9FLCEUqMs6Mca95qGdo7BOToGfRRErWesh9cWhCWnYKnhIUslDkOKVAdEECO-80HTk65sS3l6NKgO1bGrsjWditzaLBkhoX1YGt2xGuW4kkZ4uHdI-FeJPMnmhDRdlIA&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
40. Рисунок 10. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZis9PSyMKYnHYOFsyBND98HlAX_1s9DWTCq5D6PITQybQtGD65JSe1uByuCWs5ApNc-bUh4xQRYrCxOSSABQ2OAHr-Py9q-Dx4MMxt3GuC9ACUrG8PYn-wOYThgKCHv6Do7cSpzJoHv1ynTVSfLYpFwX8GElQODOwQByjejuh0J4ynxXb_1_1Gdd5TKRw-a8wx8pPiW3AyaLjRdA9TyNPnBs1XiclM7JwPsfD24x2-6eVzSj_126cksnT3gCUmdFREuQVNzvcykWrxeVtIJuc_1UIa2_1uO2NubjxT-q7tcg2UqzcyCEoZHXC-kswczoePIId-mtb0HdXJiblhGOuv3q0Gt9ns-bb-y8w&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
41. Рисунок 11. Интернет-источник:
https://www.google.ru/search?tbs=sbi:AMhZZitc9Hw2YQ5JBhH1e2ziEOzqT7zII9qKZWPgg3WhFWAGq2OlMACuiTPGV4HsZaT_1Lytrlh43IHlHUMb2js9NcSjwuxG17Elzea9fH-kL--EHw4RhB60uCsOpuj4LUBuldN9JPIDajl5NZXlZny4RGGfXxgM6qUmeEJ31copjcJljZSQj1

6WrlUU1NDGr8lPrHVl9YPxCcEsqgB5qrdg6yO7WixRaGNHH5kih_1ClydOc3Mu1LRD5mu
ZVJyHJjCg0cmrVXGERzivoWADTMIQ2I0qtk5pVG9Xshfft8l9EN2z5wNBgG_1JWs-
20Qq3_1hZi24ESOoeYlh1mPnF0ollMi7QAs8-8CFA&hl=ru-BY.

42. Рисунок 12. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZiuNn9UtGIdZyXNpPX7WxaC7TrM9ZfDyzG68J95rasqAN9MYzgEwjn85xrDZZnfnNlv6oDx_1kmxW0CCw7RHg3EO-FN6TqqbbF2l_1-UuC590jaNb2iJHWzUlqPSrwHvrkJ7mMVrMN3R2he3gVuz5B4StvwUfSZFJqwfGZaO8bt2wJHNGiJI2rmO0Uye5k8qOGNUlc9v5tAqVqMZ12RZeFbjgzKtW6CIm7_1iCIVSNDvPYXUBLjL5qcapZ_1F7MlBEda_17xGdyTpCEmS0Vb3zeXZHJFXGJwpV4I6RwurCqKjP_1G4N5VIWVNHfVx5SnL8cHD_1ozxIvD7WNH0UyLlcSAbak2fTVtE-w&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
43. Рисунок 13. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZitpmHXVHNJPoaGvv9eRYrWw06eo--Qami264PPKkQ6aZypCQXTiJ8OuP3easj_1fTnt2BwF8QG2Uh47NVoSjYj7Trjx-iPgp2Xwzm92nkzMs2t1CHtqyuE0gmvmnx6haX1Fimd9dlMd5wPm4U8IVljkfSHzAdYOfAarg6q-plUmpJc0EYsF52jwC975vA-OXtkjTgs51u0txYuRaD7RuuE4OHfHuOjgL0vCHbRfsvqZQ18lkYAReLKcDJuuhvdGH6PKlMWjThZ3kOgCi5SMxftz5dX4sks-bkPWa0AE63yzdGEwReLJcH8Seyu4nE602RlwjRwobUFnVloXQB1Hvm9dygYqsQ&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
44. Рисунок 14. Интернет-источник: https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZitWlZUUJ1s4_1AtArA752xd4IptMLMdqdljNL7FTX0ae7Taz67Dnj0Tfn5myzYCBuuDZo9Uc76TnNpkW0l1eHwwsEPJ0uEp4yCWGH55ZT90Flwqo1bmudqpr7TFUdMG9pl0T9sTieat-mQxRue_1BceYQYHIDQRDp1sL41PhCT1LbY40HWYavkLz5Oy0eWpG88hFt31GaZiLEy8WMKSPZg-Y4y8cLRgE4A5kgAcaOMoI2ki7xp8zTtXdWPIWdBYPQY8a5vNJ5TRylm6Nik0XfDP3fcuB4yrTtVr28VhzGMWmUrrQHkYZg2a3LuOJXK83IUu9fanqMny7rMVHK0gF7X5Vqp2nQ&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
45. Рисунок 15. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZitWnqLsJv4V9cDrUGsHWbouMZvqwxT22D1_1jtVSgW9QWdMf_15pSvNXJ08DDFS9RPm9RZPKGVZWR8nKSuAh3337cVQ_18vtu12e3BuJByjp5RCv8kSqbBldL1r1hmqVwRRAdNJF6Cj_1qq_1wUXBhO8jQ6CX4wjs0Go8qym4tP--22rxeoWCtZqQmK4KkgkTI62JM4XNkJbRbd9vXnkQIVS7cGRJuCt1_1ELuzinLn3UUb2lchlzM_1BhluC7fBsRq-HjcJsmmCO8GjOHrec7N-0urNUSWIs23VoALFHPAoN2ZsW8syWfp0MPfcafI7A9inZWtY17D9j6PNVeTfAyPAuYbiLGOhewg&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
46. Рисунок 16. Интернет-источник: https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZiseBB6TF4yr4cBM7aymi-CBI_1Cy4y_1GjzK585rm0-8JK-yKyxT6rMGVpQARcA2zJQiZM7QKwuYPybqGjyd5KwP-aP7evnmAkkrH46JSXwe6158dyfgHppNAB1NeaerbSz1lhP1pt-rU0wqAqEhVqmWdTc4OmI_1fIAXZpUOJZ87byVNiQ29TNyPS9tiThdvkykHhZhdw-LcPwLC_1YBQzbqYvWci1c4ZW3VVwut82LNBfh4yu2VsAdfy3KmkIBJshKoseWxIwI4Ehj94w1P4o1XkwXdOUDzwjE6lsg-rQV28cymMyi4jLtqqn47kMr2C5UYwsNYS92VfGJEZWHDyLdkdvkeYpA&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D

1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru.

47. Рисунок 17. Интернет-источник: https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZitDrJx34HnIwZPKr3LnoiYdKSNGID39pNCt2kkixwAtMAyeEgLKp83MhetUSHbDOaoZmG-BkaBucOvxHST9gXtB9IAAt135QDLSfa1kqI8B7L6C-bS80zEuNVFyQ88p8GM8MrJRPIMDqVWFU17qqXra5mAgRSGiTXTSMeJ5bE74pYP8QvPUWex3jMfr7SINoJpLS-fyGfvnGMBAXEGqhvwqAl2VJkVwQc1eTv7Bwa7ZRRbIpKlFOlKJEwySY4Uv1BzENzjsqVcyRw4kotqQXa1zq_1xdLp2KDZwmwSzgJzhRBv0wKkzQ_1YsS9ON5coNieU4PRJ9jeWD--FVQbZDFXGVG3d8bbkA&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
48. Рисунок 18. Интернет-источник: https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZiu5WLJEsixCcbkD2Ab8cjKNFLh5xh0xmZEОс_1osJXJ5dCPKjHK3gPwZFqVsEtoQEpv9yvWpYg28AdMpIR6LfyKyQn4W9aeizmOJXb9fwJ-N1wNJd8hIS67X-mGh5lCStTdxnabYA0dO9Uu_1707oXxRTToEd8AVPBARzTvs8LLARVsH5kbvPLanpgC-YgF6o70hXyuz351P9o0JFJx5dva1Qma84vf97sfqmRbi1KJsElB4vrNnKtrijJt2comxUmLTzbP84HXixxy33JLdbP_1sSdUjlMW7y3VJdwkCD3Q8JKorwZzIK5l7AyMsCeHaqnDag3V0hEDfCzYWVU9ezT8evYEq4Wg&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
49. Рисунок 19. Интернет-источник: https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZisTHw-SFCXPo_1JRIOUXe7pesSVqt-NEOz2glyKsrZ-XyPkReeiT3eW3qT5MJV5SAcB9pBcX0B5UpgNVyxRmXPRtVTUAq_1GwORZyLZH1RyH2liwxssuXLmNgMSH-L6AMf0yvLS2VHPFIjqI9ZCIHzQciOSHFlhAVMBpB7qrWtD75XLXgpDRMstrY2MtDFV7V9oXGkvApErhg44Sn2-LKw4dkZ7iYvMw6HtkswJEscWg1hR5paq_12ywMFGfFS3JCpITHtb2rAgb0_182cqq_1lOLBZnTGddGollGO8NVAXdTh-rG07-zuXxrv03lKFT8tsuaNhtZ2TYESumggw0L8yz5xXrOBOUMg&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
50. Рисунок 20. Интернет-источник: https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZitcqOOX-tSwIcbltyTv5ACv6efAcSeT-jM9EsT7dTiyGkBj5lrILPg9RIfSf-NIKuMRvQoTvQVLtHdvdpApFnmWB1iXI1drjg_1kbDIsGrXte-zRAzUla04XykgN_1FPG-dys4OkhQg3nqK_1acin0AqRd_1dkaN12CPLX6WKghbTtlSPHep2pcl8X1ctz3k9vU0zdIxNda dzJg-7RBqrgxeG0duNzlEek-HrSCPAXnMPktFKxrDQvzEd15aOIKWLOLSEaD-AYdD4yUCte4P_1wP53KE_1AQQ3il4yHdjBo2mflPYOUVJ64pQtt6HZ6bOh0ZsE_1OhxpT-ewaS35J8Sh6vRz8IgXiKIA&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
51. Рисунок 21. Интернет-источник: https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZivuhFO59FOG9-6kAjkeuhH4NLWPUMfdfbVyMlCxDkukWhOA2qRt6kNQOqjToLHj8glw4YAUOQEcjhGxGTFjbNvWYHyCstCjbmc3DCbQ5MreLICXlNJLLdo75NHJXudqeGK2TDDaDaOM3_1fl3nsdXMIa77xadlb3h_1MKwapQ2WHHclPfnWs-hKAN-lvLoPp6idVfGla1qG3pF2txJLRW66JTr1i2QJUvLWzWoMtRqgkeLNM5LsvHeUlMDRhjaad7_1zIohcW1VDn74_1deC_1xDxhPPbflDDryYhqHHqtY3M9ObmrVc73sLXzpQlXpHJ8t-EUOHYwN5SRlO3n1sWHOtaP-SxbzZ9Q&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-

БҮ.

52. Рисунок 22. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZivkAZj1qPiwHPc8rAy7h_1WHnTpVj2QQvBz0UCeL031X_1vfsYrG00JlfpGuHp6n_1Ykrb7SG4I99Spwyyj0EusxVMW2FpaVFBERkFY7bHsMKOg4xD5QDUiVnNymkjALdwcbbf5sMPUbGZbHolVdTQuwv8sflxaeYZy-Wytx4HugsY_1MFBnbj4rY7b0l3HZN1dfyMrreweIBm4cuDO_1pg3yNhCpV3QVo3CqNHwPYUAIImBK6cQ2ZqVWKEYOrNBWXPXENlJClGDfOdQomvRuIh0sHG1THMrolWACpeiJq1pulzNr6UkWIAUJ61j4ui2WqUsMIDeJOwoGZXfAW0vO8lWzyFp-5yNw&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
53. Рисунок 23. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZitBKipoxblLjHktZ0j8Fj4QskKLwd ecYuU6KwWCYMarQVosjrKgJnnjASno1UhcRiiRz-OOM2b_1-dV_169JYrkm3NZlbq0Q_1_1h-lCxEl3wEc0gXW19Kuxrd1B-8Ywd9nilOUEDpFMJ4ISIH0wiX8LgT36SbXtPYzuVc_1KU9ZkGbzKcqwl6PksxqE359MhzpeC35SYH6vXs4r7cfBEvlJk-GfEEWo4IG--_1ZV-IgFIFGRvnbkZd7xf3QsdaeDn41IRNMvDTRvSfzO1ZWjO0_13-lAXf3dKI4svLTBZgffjWeMqRl9ivSjSlXhDjEgtDg-7TipjD_1yfa3lb8zyv-ptQwjCdZl6CrQ&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
54. Рисунок 24. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZis1jC02EIlPj1xWTsbgd23zynDyrR1ewwplcy6bvEVERUOpNSMDDcdS2_18IoyP97n61eWNHj17-VGub1vQAY4YHxUFGF8eWj5toI21KDMRHIf6NJsK9oLQhxHPqRNTPoKouT1Tw-HRCljsJqglwf2kSfQjljMj9K6PfmLsvBzDiNdmX015Z2A3xVf2vGpz7WAGl0xujb3woZVS5L5hBqs0d8oyHVmb6iG9hAIG_1CodJXVIO8rE1-kRlO57BdZHuE4I7Gr1k9NAesaSSch6IHqf5ejr4Lq7bYqvIIMb_1l-Hzt8hv-ssq3JTaiNO2NKQpjstIYCqTF9knvJ7z-1uHySvZCc-log&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
55. 51. Рисунок 25. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZivMG08Yl0LFEyjevz6gXGIpSnqy9IUzMeJM3B_1_1m0kuBl2bUpBPZNcYLjdB2-EB10IRNwXvzvBffHyFGC0cDM_1iBhu82ikCWjUn7NyXAlBUw_1XTHdbM6jMwoI1s-ChcHAN5KizyjtN-lf6PdPDA0LGOsVtX_1VWGUzohLP-Thm9VhUAjyXawGlrZaFjDQ9E7o35shK8Mro4bC8MKCJ_1sHhZLGnYOpQsuQJxsaV5Wn8COORp_1YotJrec2bJL9J_1UboNvSWEj6o0uc_1em7ZcqBYhL8d-PoJlut3YoxNWV4OkY8_1HH58zCQOxNwD914HW8x_1XpV9EMFUVbuIWtefVB4Wi2GKCTwLw&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
56. Рисунок 26. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZisJtn4A8WBllrQVshlpyy3KbHlkCe4yKlwjxE901AzlMB2GmLYm3oAAmYAjm2O7f6NR7gMNCsweBSYOsGoWkMePsgcQSZTqdMHEbut99fCmNkwpKOTfxAO2nLODnMgxNhKeHXKprPrSDUBmaoJ_1_1Q6gNBHwVsdQDKGSdm-Bhh6S42rHXKNPKJRa2eeZ5edKMvXwcizvemOkrsC73pLgTDFnWao-w6ptG3qiDin4-4iqeqKcFxP9H49KT1YDyfaf9hZ9LrFrJBq4xx-L5qRXHuCd1ERfv05EWWgpV_1Hao4C8MKG0Pr62AW8LZnIPO0QmB-shmgAC4Ujs-GFjWM8uN_1k6u33WPw&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.

57. Рисунок 27. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZisePkUxW5OoVBnQxW6HMPpRrPLCyVzx-We_1QgYrhh20GrWPSIwfWzxkrSyqVJGG0D_1mEyUV6HK3FKIANU6iBaf4MiZugHJy_1iFP1M3UeXde-3l3LuOytu8uxtqidzIad6Tz87q1AzcML1FFeoStoq5sCRS-7FO0ajflMVvtoP9F2myxXtYvK09Cy7EwbwnjToQtYgSdXNgRs0iQPAGWFlvtYvP4FT7jQBRINvHI3gE0pc1-Abi-_1A7NlNnXWvE-cGWteM4WAUjrbykoCmfFaUKFB39GITCI13q9ZEzZRw_1pxILxXfjXMCsGfVj5OKTuJk5gu8xUYtVHTg3LuUOL0BbC4K04Ilyw&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
58. Рисунок 28. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZiupbzOGRZFxxR6beYQt5woOE4rS0il7n2v5D6ebPGCsgXs9sDIIdwI94NNNCV0zdNqVj0xm0d5_1e-MBJYJ1kUvBMrrOrhcfyz6NWqAoKujvNRdFafFBAZIl9WXcVE4DTVT2ArG0UKfpHe4GLLwW_1EBNiT3JDiUrnLPqyffYL89zFHkZ5kNkj5Qf5WLW4RYr5EPK76ckrCWXERwt5WRhiHL-bCgW8AeQA43mvYQoYl6UQ_1aOZGEhhyqhgbZzkwEin8xkAEFOQxL-_1O9GBIf7Q4L-n40pkTCe2yMl6r9K8UN6zD9CzS58HBPP9LGUQN9XAhjpi-6im2MPriPvNVS-BfHWwkz90A&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
59. Рисунок 29. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZivWMLJVhpXsEHYbfeHTxVQhoYzDzZHR YHb6hzfX0iE725IVtjCn0P_1LXkC5R8gYwREKfk3IpLTQ3kGxPjnzP-TbnKLJm1fOugV10NVDFfV1vslX_1j5SsGPe3d3mirOkKdCQS3eVktSxl0oWg76HoLmsZj2thlci05Q3kL-_1-3AJWYm_1uktSbfPg5xbSQ11TvrD9u145sLQ6oIuV9-os97plddZ_1no32gNvBzGzqVaRB5JQGYooAH6YhYfTD_1E50N9XuS3x1wNc0hVpFYiZjp6oQL-3YdRK_1wDlZrGKWbaOmerHI-FTEvshRV96mrSGey-VAt_14-VbD5xuBk2hk9-w6BbkVh2A&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.
60. Рисунок 30. Интернет-источник:
https://www.google.com/search?tbs=sbi:AMhZZiuaCi8higI1E7Yu59pHaoS9l0kLBTo1-ncdnNif9U1U1ggIkiif1ZymZIfYCsXGFJP7RN7e8DgU7fBj2vuqdOblqiLNxaY1U08NduJ_1jqyDzLY_1VENiWs_1siei9To_1B2-k7RCEbovzDnMzrifhd8y1bYXoE7xtua--1KQtwTsw9_1Yd5x1o48k7UTpnX209SQ5HJ2RYO8pfGYVW8TZ323fZFzYKGBF5nAKCusqTZZ7FKLfbBdwFyI9xo8lYDhXu2IqKcofjpBlXhgNZw6r-iNLM8NrUlXJ1JvrK6_1-UhXkVhFRzU7t7TW5DPGGzPaqz0vMzjR1XiEMdtEXM2Y3s57xtZ98Vc4Q&btnG=%D0%9F%D0%BE%D0%B8%D1%81%D0%BA%20%D0%BF%D0%BE%20%D0%BA%D0%B0%D1%80%D1%82%D0%B8%D0%BD%D0%BA%D0%B5&hl=ru-BY.

Учебное издание

Красочко Петр Альбинович,
Синица Николай Владимирович,
Яромчик Ярослав Петрович и др.

ИНФЕКЦИОННЫЙ РИНОТРАХЕИТ КРУПНОГОРОГАТОГО СКОТА

Учебно-методическое пособие

Ответственный за выпуск	П. А. Красочко
Технический редактор	О. В. Луговая
Компьютерный набор	Н. В. Синица
Компьютерная верстка и корректор	Е. В. Морозова

Подписано в печать 18.08.2020. Формат 60×84 1/16.

Бумага офсетная. Ризография.

Усл. печ. л. 3,75. Уч.-изд. л.3,49. Тираж 80 экз. Заказ 2073.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»
государственная академия ветеринарной медицины».
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.

ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.

Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.

Тел.: (0212) 51-75-71.

E-mail: rio_vsavm@tut.by

<http://www.vsavm.by>