

2. Acres S. D., Babiuk Z. A. Studies on rotaviral antibody in bovine serum and lacteal secretions, using radioimmunoassay // Amer. Vet. Med. Ass., 1978. V. 173, N 5, part 2, p. 555–559.

3. Bachmann P. A. Viral gastroenteritis in calves: cause and prevention // Mod. Vet. pract. – 1983. V. 64. – N 7. – P. 559 – 565.

УДК 619:616.98:578.834.1-07:636.2.

Ю. Г. ЗЕЛЮТКОВ, Витебский ордена „Знак Почета” ветеринарный институт имени Октябрьской революции

## ДИАГНОСТИКА КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ ТЕЛЯТ

В последнее время в большинстве сообщений указывается на то, что энтериты новорожденных телят имеют инфекционную природу, возникают на фоне неблагоприятных факторов кормления, содержания и нарушения условий комплектования животноводческих комплексов.

В подавляющем большинстве случаев нарушение функций желудочно-кишечного тракта происходит в результате патогенного действия одного или нескольких вирусов, а также энтеропатогенных групп бактерий кишечной палочки.

Среди вирусных агентов определяющее место принадлежит рота- и коронавирусам [2,4,6,8,9]. Коронавирус крупного рогатого скота впервые был выявлен в США E. L. Stair [10]. Об индикации коронавируса в пробах фекалий телят с признаками диареи в нашей стране сообщили А. И. Улендеев, И. Т. Саттаров и др. [7, 8]. Этиологическое значение коронавируса в формировании диареи было установлено экспериментально при инфицировании новорожденных телят, лишенных молозива и гнотобиотов. При этом выявлено, что коронавирус вызывает более тяжелые формы поражения желудочно-кишечного тракта, чем ротавирус, в связи с тем что в патологический процесс вовлекаются не только тонкий, но и толстый кишечник, а также брыжеечные лимфоузлы.

Достаточно широкое распространение, отсутствие надежных средств лечения и профилактики коронавирусной инфекции телят, а также то, что у больных телят прогрессирующе атрофируется слизистая кишечника с последующим снижением адсорбционной способности питательных веществ, антител, нормальной продукции питательных ферментов, что приводит к нарушению нормального развития животных – все это и определяет тот существенный экономический ущерб, регистрируемый при возникновении данной болезни.

Известно, что ряд заболеваний, связанных с поражением желудочно-кишечного тракта, имеют идентичные клинические признаки, а это затрудняет проведение дифференциальной диагностики – лабораторные исследования, позволяющие провести достоверную диагностику, приобретают первостепенное значение, что является важным условием успешной борьбы с коронавирусной инфекцией.

В настоящее время иммунологическая диагностика коронавирусной инфекции осуществляется с использованием реакции гемагглютинации,

реакции торможения, реакции иммунной флуоресценции, иммуноферментного анализа и электронной микроскопии [1, 3, 5, 7, 10].

Основными достоинствами иммуноферментного анализа являются высокая чувствительность и специфичность, возможность автоматизации процесса, что очень важно при проведении массовых исследований. О возможности использования ИФА при диагностике коронавирусной инфекции телят сообщили И. Г. Коромыслов и др. [5].

В наших исследованиях основной целью являлась индикация коронавирусного антигена в пробах фекалий телят с симптомами поражения желудочно-кишечного тракта, выявление специфических антител в сыворотке крови с признаками диареи, изучение диагностической эффективности ИФА и РТГА при диагностике коронавирусной инфекции.

В своей работе мы использовали пробы фекалий от телят 3–18-дневного возраста с признаками поражения желудочно-кишечного тракта, полученных в хозяйствах БССР, стационарно неблагополучных по кишечным заболеваниям; пробы сыворотки крови от телят с симптомами патологии кишечника; коронавирусный антиген, специфическую антикоронавирусную сыворотку, ротавирусный антиген и антиротавирусную сыворотку (диагностикумы получены из ВИЭВ); антитела диагностические против глобулинов быка, меченные пероксидазой, антивидовую флуоресцирующую сыворотку против глобулинов быка, комплемент морской свинки, антикомплементарную флуоресцирующую сыворотку (диагностикумы получены в НИИ им. Н. Ф. Гамалеи); 0,5%-ную суспензию эритроцитов мышей и 0-группы человека. В ряде случаев проводили отбор проб сыворотки крови матерей с целью исключения наличия в пробах крови телят колостральных антител.

Работа проводилась в такой последовательности. При отборе проб сыворотки крови и фекалий от телят с признаками диареи тщательно изучали эпизоотическую ситуацию. А после установления наличия коронавирусной инфекции проводили обстоятельное клиническое исследование больных животных. При этом установлено, что чаще всего коронавирусная инфекция регистрируется в весенне-зимний период. Это связано, с одной стороны, со значительным снижением резистентности, нарушением условий содержания животных и большим количеством отелов. Чаще всего заболевание наблюдалось у новорожденных телят в 7–18-дневном возрасте, хотя коронавирусный энтерит в виде моноинфекции регистрировали и в более старшем возрасте. На стационарность болезни существенное влияние оказывает наличие в хозяйстве животных-вирусоносителей. Направление скотоводства и порода животных какой-либо существенной роли в возникновении и течении болезни не играют. У больных телят отмечается угнетенное состояние, незначительное вздутие живота и повышение температуры, чаще – в начале заболевания. Затем появляется профузный понос. При этом фекальные массы водянистой консистенции желто-зеленого цвета, иногда (особенно при смешанном течении с ротавирусной инфекцией или осложненной присутствием энтеропатогенных

форм кишечной палочки) с примесью крови. Акт дефекации в начале болезни учащен, а затем по мере снижения аппетита его интенсивность ослабевает. В некоторых хозяйствах при осложнении ротавирусной инфекцией заболевание заканчивается гибелью животных через 4–6 дней. В зависимости от внутрихозяйственных условий уровень заболеваемости и смертности колеблется от 30 до 92%. Следует отметить, что с возрастом заболевание встречается реже, протекает в легкой форме и в большинстве случаев, особенно при проведении симптоматического лечения, заканчивается выздоровлением.

Отбор проб фекалий для выявления коронавирусного антигена проводили в период появления специфических признаков болезни. Полученные пробы использовали в качестве исследуемого вирусосодержащего материала при постановке РГА, РИФ, ИФА.

При проведении РГА были использованы: 0,5%-ная суспензия эритроцитов мышей, стандартный коронавирусный антиген, микротитратор Такачи. С целью исключения наличия в пробах фекалий ротавирусов проводили постановку РИД и РГА с эритроцитами 0-группы человека. Исключение наличия колиинфекции осуществляли при микробиологических исследованиях. При проведении РИФ использовали общепринятую методику непрямого варианта с применением антивидовой и антикомплементарной флуоресцирующих сывороток. Препараты изучали в трехкратной повторности в каждом из вариантов. Постановку иммунологических реакций сопровождали необходимыми контролями.

Пробы фекалий, полученные от телят с признаками диареи, использовали для приготовления 40%-ной суспензии на изотоническом растворе хлорида натрия, которую фильтровали через марлевый фильтр и осветляли низкоскоростным центрифугированием. Полученную суспензию использовали в качестве испытуемого антигена в РГА с эритроцитами белых мышей. Максимальное разведение, где регистрировали позитивный результат, составляло 1:128.

При проведении РИФ указанную выше суспензию фекалий, избегая замораживания-размораживания, подвергали концентрированию путем центрифугирования в течение 30 мин при 4500 об/мин. Супернатант отбрасывали, а осадок использовали для приготовления препаратов для РИФ. Изучение препаратов с использованием люминесцентного микроскопа позволило констатировать (независимо от варианта РИФ) наличие специфического свечения в цитоплазме клеток. Причем в некоторых случаях отмечено различной интенсивности изумрудно-желтое свечение в виде гранул, зерен различных размеров, а в ряде препаратов установлено диффузное желто-зеленое свечение цитоплазмы. Следует отметить, что интенсивность свечения при изучении препаратов, обработанных с применением флуоресцирующей антикомплементарной сыворотки, было выше, чем в препаратах, где использовалась антивидовая люминесцирующая сыворотка. Кроме того, количество серопозитивных результатов при 100%-ной совпадаемости по обоим вариантам в первом случае было выше, чем при применении антивидовой сыворотки. Следует отметить, что РИФ в данном

случае характеризуется низкой эффективностью вследствие интенсивного лизиса инфицированных клеток эпителия кишечника. В целях получения достоверных результатов препарат для ИФА необходимо готовить в день получения материала.

В дальнейшем ранее приготовленная суспензия проб фекалий была испытана в качестве антигена в ИФА, которую проводили в следующей последовательности:

1. На поверхности лунок полистироловых плашек с плоским дном фиксировали специфическим антикоронавирусным иммуноглобулином (получен из ВИЭВ). С этой целью в лунки вносили по две капли иммуноглобулинов, плашки закрывали крышкой, помещали в термостат на 2 ч при 37°C. ИФА во всех случаях проводили с применением микроплат отечественного и зарубежного производства.

2. По истечении указанного времени лунки плашек тщательно промывали твин-калийфосфатным буфером с pH 7,4. С целью повышения специфичности ИФА оставшуюся свободную поверхность твердой фазы блокировали избытком 1%-ного яичного альбумина (режим обработки прежний) и после тщательного промывания лунок добавляли испытуемый антиген.

3. С целью определения концентрации короновирусного антигена готовили последовательные двойные разведения суспензии фекалий с использованием ФБР с pH 7,4. Для этого в каждую лунку вносили по две капли ФБР, а затем в первую – две капли исследуемой суспензии фекалий и готовили разведения. Плашки закрывали крышкой и выдерживали в термостате при 37°C в течение 2 ч.

4. Спустя 2 ч каждую лунку плашки тщательно промывали твин-калийфосфатным буфером (ТФБ), а затем вносили по две капли иммуноглобулина кролика, полученного к глобулинам быка, меченного пероксидазой. Условия сенсibilизации прежние.

5. По истечении 2 ч плашки тщательно промывали ТФБ с pH 7,4. Перед проведением учета результатов ИФА в лунки плашек вносили по две капли пероксидазного конъюгата, состоящего из девяти частей 5-аминосалицевой кислоты и одной части перекиси водорода.

6. Учет результатов ИФА проводили через 5–15 мин по завершении проявления коричневой окраски в контролях, принимая во внимание интенсивность ее, которую оценивали в плюсах: 4+ – интенсивное коричневое окрашивание лунок; 3+ – коричневое окрашивание лунок; 2+ – нежный коричневый оттенок; "–" – интенсивность окраски на уровне отрицательных контролей.

В ходе проведения ИФА было определено, что интенсивность окраски лунок прямо пропорциональна содержанию искомого компонента в изучаемом материале и не зависит от места производства плашек. В целях обеспечения высокой специфичности постановку ИФА сопровождали всеми необходимыми контролями.

Таблица 1. Результаты выявления коронавируса антигена

Номер хозяйства	Количество проб	РТГА		РИФ		ИФА	
		Количество положительных проб	%	Количество положительных проб	%	Количество положительных проб	%
1	25	7	28,0	12	48,0	18	72,0
2	17	4	23,5	6	35,3	12	70,5
3	21	3	14,2	7	33,3	13	61,9
4	15	3	20,0	5	33,3	9	60,0
5	31	6	19,3	12	38,7	20	64,5

В табл. 1 указаны результаты РИФ, проведенной с применением антикомплемментарной флуоресцирующей сыворотки. Следует указать, что результаты РИФ в этом варианте были несколько выше, чем при использовании антивидовой сыворотки и полностью совпадали с первым вариантом. Предельное разведение в ИФА, где еще регистрировали позитивный результат, составило 1:3200.

Исследование проб сыворотки крови, полученных одновременно с отбором проб фекалий и в более поздние сроки (с интервалом 12–14 дней), проводили с применением РТГА и ИФА. Постановку РТГА осуществляли по общепринятой методике с использованием микротитратора Такачи и 0,5%-ной суспензии эритроцитов белых мышей. Испытуемые сыворотки предварительно инактивировали при 58°C в течение 30 мин, а затем подвергали обработке перйодатом натрия с последующей его нейтрализацией 5%-ным раствором глюкозы (в соотношении 1:1). После обработки разведение сыворотки составило 1:4. В качестве антигена в РТГА и ИФА использовали коронавирусный диагностикум ВИЭВ.

Постановку ИФА осуществляли в той же последовательности, что и в первом случае, с той лишь разницей, что на первом этапе сенсibilизацию лунок плашек проводили стандартным коронавирусом антигеном с последующим внесением и разведением исследуемых проб сыворотки крови.

Таблица 2. Результаты исследования проб сыворотки крови

Номер хозяйства	Количество проб	РТГА		ИФА	
		Количество положительных проб	%	Количество положительных проб	%
1	58	45	77,5	53	91,4
2	65	49	75,3	58	89,2
3	48	31	64,6	38	79,1
4	35	24	68,6	29	82,8
5	72	38	52,7	55	76,4
6	39	24	61,5	29	74,3
7	46	30	65,2	37	80,4
8	68	33	48,5	45	66,2

Анализ результатов РТГА и ИФА указывает на совпадение результатов реакций во всех случаях и более чем в 70% случаев установлено совпадение результатов по выявлению как коронавирусного антигена, так и специфических антител. Предельное разведение в РТГА составило 1:512, а при проведении ИФА – 1:4096. Следует также указать, что во всех изучаемых хозяйствах в большей или меньшей степени установлено наличие коронавирусной инфекции.

## Выводы

1. С целью выявления коронавирусного антигена целесообразнее использовать ИФА, обладающую высокой чувствительностью и специфичностью.

2. При приготовлении препаратов для РИФ с целью выявления коронавирусного антигена в нативном материале необходимо использовать свежую концентрированную суспензию фекалий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Инфекционные болезни животных: Справочник / Сост. Ю. Ф. Борисович, Л. В. Кириллов; Под ред. Д. Ф. Осидзе. – М.: Агропромиздат, 1987. – С. 48–50.
2. Зароза В. Г. Коронавирусный энтерит телят // Желудочно-кишечные болезни телят и меры борьбы с ними: Озорная информация. – М., 1985. С. 48–51.
3. Коромыслов И. Г. Сравнительная чувствительность иммуноферментного метода, РГА и РТГА при выявлении коронавируса телят и антител к нему // Докл. ВАСХНИЛ. – 1985. – № 5. – С. 44–46.
4. Коромыслов Г. Ф., Авиллов В. С., Лебедев А. И., Гоголев М. М. Рота- и коронавирусы и их роль в этиологии диареи новорожденных телят // Сельское хозяйство за рубежом. – 1980, – № 6. – С. 51–54.
5. Коромыслов И. Г., Шарабрин О. И., Гуненков В. В. Иммуноферментный метод в диагностике коронавирусной инфекции у крупного рогатого скота // Бюллетень ВИЭВ. – 1985. – Вып. 58. – С. 48–51.
6. Сатторов И. Т., Мникова Л. А., Авиллов В. С., Сологуб В. К. Коронавирус – возбудитель диареи новорожденных телят // Ветеринария. – 1982. – № 11. – С. 26–27.
7. Улендеев А. И. Использование РГА и РТГА для ускоренной диагностики коронавирусного энтерита у телят // Новое в диагностике и профилактике заболеваний животных при промышленной технологии содержания. – Ульяновск, 1981. – С. 7–11.
8. Mebus C., Stair E. L., Rhoades M. B., Twihaus M. J. Neonatal calf diarrhea: propagation, attenuation and characteristics of a coronavirus-like agent // Am. J. VET. Res. – 1973. – 34, 2, 145–150.
9. Sharpee R. L., Mebus C., Bass J. P. Characterization of a calf diarrhoea coronavirus // Am. J. Vet. – 1976. – 37, 9, 1031–1041.
10. Stair E. L., Rhoades M. B., White R. B., Mebus C. A. Neonatal calf diarrhea: purification and electron microscops of a coronavirus-like agent // Am. J. Vet. Res.-1972. – 33, 1147–1156.