МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

ПО ЛАБОРАТОРНЫМ И ПОЛЕВЫМ ИССЛЕДОВАНИЯМ АРБОВИРУСОВ

1975 г.

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель Министра
здравоохранения СССР
П. Н. Бургасов
№ 1186-74
27 сентября 1974 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
ПО ЛАБОРАТОРНЫМ И ПОЛЕВЫМ ИССЛЕДОВАНИЯМ АРБОВИРУСОВ

Москва—1975

Методические рекомендации предназначены для использования сотрудниками научных и практических учреждений, проводящих исследования по арбовирусам.

Арбовирусы, или вирусы, переносимые членистоногими, широко распространены в природе. Многие из них вызывают тяжелые заболевания у людей. Клещевой и японский энцефалиты, крымская и омская геморрагические лихорадки, западнонильская лихорадка и москитные лихорадки являются арбовирусными инфекциями. Кроме возбудителей этих инфекций, в СССР в последнее десятилетие открыт ряд новых для науки (Тюлений, Баку, Охотский, Сахалин, Сокулук, Иссык-Куль, Баткен, Карши, Залив Терпения) или новых для нашей территории (Синдбис, Семлики, Укуниеми, Трибеч, Тягиня, Дхори) арбовирусов. Их роль в патологии человека еще не изучена.

В связи с тем, что человек осваивает новые территории в результате промышленного строительства, хозяйственной деятельности или в поисках природных ресурсов, арбовирусы представляют потенциальную опасность для здоровья. Этим обосновывается интерес к исследованиям арбовирусов.

Выявление природных очагов арбовирусов идет двумя путями: вирусологическая разведка и серологические исследования. Первое направление является основным, т. к. выделение вируса из природных резервуаров или от больных является прямым доказательством существования очагов. Серологическая разведка дает лишь ориентировочные результаты.

Природным резервуаром арбовирусов являются членистоногие (клещи, комары, мокрецы) и позвоночные животные, в том числе перелетные птицы. Последние, благодаря передвижению на большие расстояния, могут являться связующим звеном между отдельно расположенными природными

очагами и осуществлять занос вирусов из одних очагов в другие. Выбор объекта исследований определяется в конкретных условиях в зависимости от поставленной задачи. Эффективность исследований в значительной степени зависит от применения правильных методических приемов

Настоящие методики даны по основным полевым и лабораторным исследованиям арбовирусов, а именно: сбору материала от людей и в природных очагах, выделению арбовирусов, серологическим реакциям массового использования — реакции торможения гемагглютинации и связывания комплемента, индикации арбовирусов в членистоногих по иммунофлуоресценции.

ПОЛЕВЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

I. СБОР МАТЕРИАЛА В ПРИРОДНЫХ ОЧАГАХ АРБОВИРУСОВ

К настоящему времени (1972 г.) на территории нашей страны выделено 16 арбовирусов: в субарктике — вирус Тюленей (Магаданская, Камчатская, Мурманская области), в умеренной зоне — вирус клещевого энцефалита (от восточных до западных границ), японского энцефалита (Приморский край), омской геморрагической лихорадки (Омская и Новосибирская области), Западного Нила (Астраханская область), Тюлений (Сахалинская область), Кемерово (Кемеровская область, Прибалтика), Укуниеми (Прибалтика, Западная Украина), крымской геморрагической лихорадки (Крымская, Астраханская, Ростовская области, Краснодарский и Ставропольский края), Сахалин (Сахалинская область), москитной лихорадки (Крымская область), в субтропиках — крымской геморрагической и москитной лихорадок, Сокулук, Иссык-Куль и Баткен (Среднеазиатские республики), Западного Нила, Синдбис, Баку и Тягиня (Азербайджанская ССР) Нет сомнения, что этим списком не исчерпываются арбовирусы, циркулирующие на территории СССР и имеющие важное значение в патологии человека и домашних животных. Поэтому работы, направленные на поиски природных очагов арбовирусов, путей циркуляции и мест резервации возбудителей, а также возможностей заноса их на территорию СССР из-за рубежа перелетными птицами, являются весьма актуальными. Очень важный этап работы — выяснение обстоятельств, обуславливающих возникновение эпидемически опасных ситуаций.

Для выявления всего круга вопросов по изучению экологии арбовирусов, необходимо проведение комплексных исследований с участием эпидемиологов, вирусологов, зоологов, паразитологов, биогеографов. Конечной целью исследования является разработка рациональной системы мероприятий по профилактике и борьбе с арбовирусными инфекциями.

Цель настоящего методического пособия — рекомендации единых методов сбора материала в природе и его первичной обработки с учетом условий нашей страны и современного уровня знаний по экологии арбовирусов. В данных «Методических рекомендациях» не разбираются вопросы работы с клещевым энцефалитом, так как ряд особенностей, степень изученности и обилие уже опубликованных инструктивных материалов выделяют эту арбовирусную инфекцию из общего ряда.

1. Выбор мест для порведения исследования и ключевых участков для сбора материала

Перед выездом в поле выбирают район для проведения исследований. При этом используется целый ряд предварительных сведений. В зависимости от целей исследования могут быть избраны места: 1) где отмечены заболевания людей известными арбовирусными или похожими на них инфекциями; 2) где уже выделены арбовирусы от домашних или диких позвоночных, членистоногих-переносчиков или получены положительные серологические данные при исследовании крови местных жителей, домашних и диких животных; 3) где на основании теоретических предпосылок предполагается наличие природных очагов арбовирусов; 4) где по косвенным признакам можно ожидать занос арбовирусов (например, места массовой концентрации перелетных птиц) или активизацию их циркуляции (массовые скопления позвоночных при обилии кровососущих членистоногих); 5) типичные для данного ландшафта (при проведении систематической разведки необследованных территорий); 6) места, где нужно подтвердить отсутствие арбовирусов.

Ключевые участки или конкретные пункты для сбора материала в иследуемом районе подбирают, используя литературные и ведомственные сведения, а также личное ознакомление с природными условиями обследуемой территории.

Для получения сравнительных данных и для изучения пространственного распределения эпизоотии ключевые участки закладывают в основных типах биоценозов, наиболее характерных для данной местности. Местами сбора материала служат также населенные пункты и их окрестности, где были обнаружены идентифицированные или подозрительные случаи заболевания людей и животных, а также скотоводческие хозяйства, птицефермы, звероферм ы и т. п. Ключевые участки закладывают также в местах массовых скоплений диких позвоночных животных и повышенного обилия кровососущих членистоногих. Площадь каждого ключего участка

определяется конкретными особенностями района исследований, поставленными задачами, составом и возможностями рабочей группы. Ориентировочно можно рекомендовать размер от одного до нескольких квадратных километров.

А. ОЦЕНКА ПРИРОДНЫХ УСЛОВИЙ

Главная цель исследований природных условий — выявить современное распределение на обследуемой территории биоценозов, включающих патогенные арбовирусы, и охарактеризовать основные факторы среды, оказывающие влияние на популяцию возбудителей. Для предварительной оценки природных условий используют опубликованные данные о природных особеностях местности и имеющиеся картографические материалы, а в процессе полевых исследований проводится комплекс наблюдений на месте работы и составляются схемы и планы обследованного района.

Перед выездом в поле необходимо, помимо знания административного положения обследуемой местности, составить общее представление о природных особенностях района работ, ознакомившись с его комплексной физико-географической характеристикой. Из существующей обширной географической литературы выбирают данные о ландшафтно-географическом положении района, т. е. устанавливают, в какой физико-географической стране, зоне, провинции, области он расположен, проходят ли зональные границы по его территории. Особое внимание должно быть обращено на данные о рельефе, размещении водоемов, характере растительности и степени увлажнения, сезонным данным по осадкам, температурному режиму ($\Sigma t° \geqslant 10°$), месячным изотермам. Необходимо собрать возможно более полные сведения о членистоногих — переносчиках заболеваний (видовой состав, изменения численности, распределение, связь с позвоночными — прокормителями) и о массовых видах позвоночных. Для этого следует ознакомиться с биогеографическими и медико-географическими источниками, которые существуют для отдельных районов СССР. Полезные сведения о территориальном распределении природных условий в нужном районе дают комплексные карты и атласы республик, краев и областей Советского Союза. Из работ такого характера можно использовать серийные издания: «Республики Советского Союза», «Природные условия и естественные ресурсы СССР» издательства АН СССР, «Труды заповедников СССР». Можно пользоваться физико-географическим атласом мира (ГУГК, 1964), Атласом СССР, региональными атласами по областям и респуб-

ликам СССР, такими мелкомасштабными картами как «Карта растительности СССР 1 : 10 000 000» (ГУГК, 1960), «Зоогеографическая карта СССР» 1 : 10 000 000 (ГУГК, 1960), «Карта лесов СССР» 1 : 10 000 000 (ГУГК, 1960), «Климатическая карта СССР» 1 : 10 000 000 (ГУГК, 1965).

На первом этапе полевых исследований полезно провести ознакомление с подобранной для изучения территорией и выбор ключевых участков с помощью аэровизуального обзора. Его можно осуществить с легкого самолета (ПО-2, Як-12) или вертолета, облетая на небольшой высоте (300—400 м) всю территорию, подлежащую изучению. При этом надо иметь крупно- или среднемасштабную карту или план местности, чтобы во время полета наносить на них все необходимые пометки.

При первых выходах в поле по ходу маршрутов отмечают рельеф, расположение водоемов, выявляют и описывают приуроченные к комплексу этих факторов биоценозы разных рангов — сверху вниз от биоценозов зон до четко различающихся растительных формаций. Наиболее доступно и рационально проводить геоботанические описания, указывая для каждого выдела видовой состав фоновых растений по ярусам от верхнего до наземного, возраст насаждений, высоту растений, их обилие и проективное покрытие, характер почвы, грунта и степень увлажения. Параллельно учитывают все видимые признаки, свидетельствующие о животном населении, приуроченном к различным растительным формациям.

В результате серии разведывательных маршрутов составляют картосхему размещения на исследуемой территории основных типов биоценозов, к которой впоследствии «привязывают» эпидемиолгические и эпизоотологические данные.

При работе на ключевых участках для наглядного изображения размещения биоценозов, точек работы, мест проведения учетов, взятия проб и т. д. используют имеющиеся картографические материалы: крупномасштабные топографические карты (1 : 25 000 — 1 : 1 000 000), карты лесоустройства, землеустройства, планы колхозных и совхозных земель, аэрофотоснимки. (Для получения аэрофотоснимков и топографических карт требуется специальное разрешение, которое нужно оформлять до выезда на работу)

Нанесение обстановки и полученных сведений на план или карту проводят в процессе наземных наблюдений и маршрутных работ. С подробностями проведения маршрутной съемки (взятие азимутов, определение углов и направлений, определение расстояний разными методами, учет ошибок) можно подробно ознакомиться в соответствующих руководствах.

Сведения об общем климатическом режиме на обследуемой территории и о местных особенностях погоды можно получить на ближайшей метеорологической станции, а для детальной сравнительной характеристики условий в разных биоценозах (и разных ярусах) следует регулярно измерять температуру и влажность (с помощью термометра, гигрометра и психрометра или соответствующих самопишущих приборов) В процессе всех наблюдений нужно ежедневно записывать состояние погоды — облачность, осадки, ветер и т. п.

Б. СБОР ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ СВЕДЕНИЙ

Сбор материалов для характеристики эпидемиологической ситуации проводится в трех основных аспектах: 1) получение статистических сведений о населении обследуемого района; 2) изучение связей населения с потенциальными или действующими природными очагами арбовируса; 3) выявление заражаемости и заболеваемости населения арбовирусами.

1. Статистические сведения о населении включают данные: а) по общей численности населения в районе обследования, ее распределению по административным территориальным единицам и по населенным пунктам разного типа (города, поселки городского типа, сельские поселки и временные поселения человека: полевые станы, дома отдыха, лагери, турбазы и т. д.); б) по возрастной структуре населения (через каждые 5 лет: 0—4, 5—9 и т. д. или по трем группам: 0—17 лет, 18—49 лет, 50 лет и старше) и по длительности пребывания в данной местности; в) по профессиональному составу. Статистические сведения можно получить в местных Советах депутатов трудящихся.

2 Для оценки связей населения с природной средой все сведения о населении (пункт 1) приурочивают к различным ландшафтным зонам и другим природным подразделениям местности. При этом используют карты административного деления территории с нанесенными на них населенными пунктами, по которым собраны статистические сведения, сопоставляя их с картами распределения природных условий — как с изданными ландшафтно-географическими картами, так и с картами и планами, составленными в процессе собственных исследований природных условий в районе работ. Статистические данные суммируются по населенным пунктам в контурах определенных ландшафтных выделов. Все эпидемиологические данные рассчитываются на 100 тысяч населения.

При необходимости проведения детального эпидемиологического анализа некоторые сведения об интенсивности связи местных жителей с природой (по роду профессиональной деятельности, в период отдыха, в разные сезоны года и т. п.) могут быть дополнительно получены методом поголовного опроса населения в процессе подворных обходов, проводимых обычно с участием местных медицинских работников (среднее звено). Для этого разрабатываются анкеты с вопросниками той или иной степени детальности. К числу важных сведений относятся данные об интенсивности связей населения с членистоногими — переносчиками арбовирусов и о динамике этих связей во времени и в пространстве. Для оценки этого фактора наблюдения паразитологов дополняются анкетными сведениями, полученными при подворных обходах. При этом в анкету включаются вопросы о нападении кровососущих членистоногих в разных условиях (например, о случаях присасывания клещей и т. п.).

3. Первыми и наиболее важными задачами, возникающими при анализе взаимоотношений населения с популяцией возбудителя, являются: а) возможно более полное выявление клинических случаев, позволяющих предполагать арбовирусную этиологию; б) проведение лабораторной диагностики выявленных случаев; в) проведение иммунологического обследования населения для изучения заражаемости.

Подозрение на арбовирусную инфекцию должно возникать при появлении вспышек заболеваний в весенний, летний и раннеосенний период, или спорадической заболеваемости, протекающей с явлениями энцефалита, менингита, геморрагического синдрома, общелихорадочного заболевания с сыпью, лимфаденитом, суставными и мышечными болями, а в некоторых случаях — только с подъемом температуры. Клиническая картина при арбовирусных инфекциях не имеет патогномоничных симптомов. Даже в случае инфекций, протекающих с симптомами поражения ЦНС, с геморрагическим синдромом, клиническая картина варьирует от тяжелейших случаев с летальным исходом до инаппарантного течения. Причем при большинстве арбовирусных инфекций инаппарантные формы встречаются значительно чаще, чем клинические. Эти особенности клинической картины при арбовирусных инфекциях обусловливают необходимость использования лабораторных методов при постановке диагноза. Только на основании выделения вируса от больного (обследуются пробы крови в возможно более ранние сроки заболевания) или репрезентативного нарастания ($\geqslant 2$ log) титров антител в парных сыворотках, взятых в ранний период и в период

реконвалесценции (через 2—4 недели), может быть поставлен достоверный этиологический диагноз при любой арбовирусной инфекции. Наиболее полное выявление случаев заболеваний с подозрительной этиологией может быть проведено с помощью подворных обходов во время вспышки.

Характер иммунологической структуры населения является основным показателем, на котором сказывается влияние почти всех факторов, воздействующих на интенсивность заражения. Серологическому обследованию подлежит население, проживающее в населенных пунктах, типичных для данной местности. В каждой ландшафтной зоне серологическое обследование должно быть проведено по крайней мере в двух сходных пунктах (или группах пунктов), расположенных по возможности в разных местах данной ландшафтной зоны. Из обследования исключаются лица, привитые против арбовирусных инфекций, а также недавно приехавшие. Общее количество обследованных должно составлять около 0,1—0,3% от всего населения. На каждом объекте (по 2 на каждую ландшафтную зону) должно быть обследовано около 200 чеолвек разных возрастных групп. Минимальный объем обследования на объекте — 100 человек в возрасте от 18 до 49 лет. Отбор лиц для обследования среди разных контингентов в избранных населенных пунктах осуществляется методом случайной выборки. Образцы крови собираются однократно в конце или после окончания эпидемического сезона (июль-декабрь), идеально—двукратно (перед и после окончания эпидсезона у одних и тех же лиц). Кровь берут стерильно шприцем из вены в количестве 5—10 мл. В порядке исключения допустим сбор крови на диски фильтровальной бумаги.

Разработать и обосновать рациональную систему мероприятий по борьбе с инфекцией дает возможность только комплексная оценка всех эпидемиологических сведений (главным образом, места и интенсивность связей жителей с природным очагом и переносчиками инфекции, характер заражаемости и заболеваемости), а также эпизоотологических сведений об основных хозяевах и переносчиках вируса, их экологии и межпопуляционных взаимоотношениях, о факторах заноса инфекции и механизмах переживания неблагоприятных сезонов. Это могут быть либо профилактические меры (предохранение от покусов переносчиками, вакцинация населения), либо ликвидация возможности заражения на определенных площадях (методы дезинсекции и дератизации) вплоть до ликвидации конкретного природного очага путем прерывания возможности осуществления цикла круговорота возбудителя. Актуальной может быть и разработка

мероприятий по предотвращению возможного заноса инфекции из других очагов в том случае, когда подобный занос достоверно доказан и выявлены его пути и механизмы.

2. Сбор позвоночных животных

При изучении позвоночных животных прежде всего стараются выявить все доступные признаки наличия эпизоотий. Так, при некоторых арбовирусных инфекциях замедляется рост молодых животных и т. д. Однако следует помнить, что при многих известных арбовирусных заболеваниях клинически выраженных признаков у позвоночных не обнаруживается, и развитие эпизоотии в популяции внешне не заметно. Во всех случаях в выбранных для исследования местах определяют видовой состав (фауну), обилие разных видов и изменения численности, распределение животных по биотопам, взаимоотношения позвоночных с кровососущими членистоногими. Существенное значение может иметь также изучение половой и возрастной структуры популяций, местных и сезонных особенностей образа жизни. Основное внимание уделяют наиболее многочисленным видам позвоночных, подвергающимся массовому нападению кровососущих членистоногих.

Разнообразие систематического положения и экологических особеностей позвоночных заставляет разделить их на несколько групп, требующих для изучения применения специфических методов. Это: 1) мелкие млекопитающие (грызуны и насекомоядные), 2) летучие мыши, 3) средние и крупные млекопитающие (разных отрядов и семейств), 4) птицы, 5) холоднокровные позвоночные (в основном пресмыкающиеся). Методы сбора материала приведены отдельно для каждой группы.

А. МЕЛКИЕ МЛЕКОПИТАЮЩИЕ

1) Методы отлова и учета

Наиболее распространенным методом оценки обилия мелких млекопитающих является учет ловушками со стандартной приманкой. В качестве орудий лова применяются пружинные капканчики (ловушки Геро или Соколова). Ловушки расставляют в линию в однородном местообитании. В настоящее время наиболее часто употребляются учетные линии с числом ловушек в 25, 50 и 100 штук, с расстоянием между ловушками 5 м. Наиболее удобна учетная линия из 25 ловушек. Стандартной приманкой служит корочка хлеба, смоченная растительным маслом. Учетные линии расставляют

вечером, не позже, чем за час до захода солнца. Утром, после восхода солнца, ловушки снимают. Показателем обилия служит число зверьков в расчете на 100 ловушко-суток.

Для вычисления достоверных сравнительных показателей обилия объем учетных работ в каждом местообитании должен составлять не менее 150 ловушко-суток единовременно (в течение одной декады). Периодически в связи с сезонными изменениями численности зверьков учеты в тех же местах обитания повторяют.

Численность некоторых видов учитывают линиями ловушек или капканов, расставленных без приманки. Так, для учета водяной крысы можно использовать дуговые капканы №№ 0 и 1, расставляя их по урезу воды вдоль берега на дорожках и кормовых столиках через 10 м друг от друга. Показателем обилия в этом случае служит число зверьков, пойманных на один километр однотипной береговой линии.

Применение стандартных линий дает возможность использовать для оценки численности членистоногих переносчиков такой показатель, как число эктопаразитов, собранных с зверьков на 100 ловушко-суток или на одну стандартную учетную линию.

Применение метода ловушко-линий дает возможность характеризовать сезонное и многолетнее изменение обилия мелких млекопитающих, изучать территориальное и биотопическое размещение зверьков, производить их отлов и получать ряд ценных сведений об экологии хозяев паразитов и носителей арбовирусов. Подробно способы учетов и обработки полученных данных изложены в сборнике «Методы изучения природных очагов болезней человека» п/ред. П. А. Петрищевой и Н. Г. Олсуфьева, Медицина, 1964 г.

Некоторые мелкие млекопитающие (землеройки, мышовки, лемминги и др.) плохо ловятся или совсем не идут в ловушку с приманкой. В этих случаях для учета численности зверьков используют ловчие канавки или заборчики, которые устраивают во всех основных местах обитания, пригодных для вкапывания цилиндров. Преимуществом этого метода является и то, что зверьки добываются живыми. В канавку длиной 50 м, шириной и глубиной 25 см вкапываются 5 ловчих цилиндров (металлических или сделанных из толя, рубероида). Диаметр цилиндра 25 см (ширина канавки), высота 50—60 см. Цилиндры вкапывают с интервалом 12,5 м. Края цилиндра должны вплотную соприкасаться с вертикальными стенами канавки, а верхний обрез цилиндра должен быть на 0,5—1 см ниже дна канавки. Можно заменить канавки заборчиками: полосы из плотного картона, фанеры

или жести высотой 25—30 см, вставляют в бороздку глубиной в 2—3 см, прорубленную в почве и закрепляют в вертикальном положении шпильками из толстой проволоки. Цилиндры вкапывают в том же порядке, что и в канавки так, чтобы вертикальный обрез цилиндра был на 2—3 см ниже поверхности земли, а края заборчика заходили на 0,5—1 см внутрь цилиндра. Канавки и заборчики обходят рано утром и собирают зверьков, попавших в цилиндры. Единицей учета служит число зверьков, попавших в цилиндры за 10 дней работы одной канавки. При условии регулярной чистки канавки дают также массовый материал для изучения сезонной динамики численности эктопаразитов в определенных местах обитания. Но при этом следует учитывать возможность перехода эктопаразитов с одного зверька на другого, попавшего в тот же цилиндр.

Одним из основных способов учета численности грызунов и других обитающих в норах млекопитающих открытых ландшафтов — в степи, пустыне, на сельскохозяйственных угодьях, лугах и в некоторых типах тундр является подсчет нор или входных отверстий в них. Благодаря простоте и доступности этот способ учета незаменим для быстрой ориентировочной оценки размещения животных по биотопам. Подсчет нор осуществляют на пробных площадках или маршрутных лентах различной ширины. В зависимости от вида учитываемых животных и плотности их населения размеры площадок могут колебаться от 0,25 до 10 га. Прямоугольная площадка пересекается цепью учетчиков, идущих на равном расстоянии друг от друга. Каждый учетчик подсчитывает норы на полосе между собой и идущим по одну сторону соседом. Ширина обзора колеблется от 1 до10м, в зависимости от густоты и высоты травяного покрова и размера учитываемых нор. Если учетчик работает без помощника, то обследование площадки совершается при движении челноком. Чтобы не подсчитать повторно одни и те же норы, учетчик после очередного хода ставит на соответствующих сторонах площадки метки, каждый раз передвигая их на ширину обзора. При учете мелких грызунов отмечают группы нор (колоний) и число входных отверстий, разделяя их на жилые и нежилые.

Маршрутный учет заключается в подсчете входных отверстий, отдельных нор или их групп на лентах различной ширины. Маршрутный учет нор мелких грызунов можно проводить вдвоем или в одиночку. При учете вдвоем учетчики связаны закрепленным на поясах шнуром, длина которого, в зависимости от густоты и высоты травостоя, колеблется от 2 до 6 м. Один из учетчиков отмеряет пройденное расстоо-

яние, другой записывает длину маршрута в каждом биотопе и результаты учета. Оба учетчика считают семейные группы нор, подразделяя их на жилые и нежилые, и число входных отверстий. Учитываются норы, не только целиком попавшие в учетную полосу, но и попавшие частично — с одной стороны маршрута (правой или левой — по выбору учетчиков). Записывают, на каком месте учетной полосы встречена каждая нора. При переходе из одного биотопа в другой отмечают пройденное расстояние. При маршрутном учете мелких грызунов, проводимом одним человеком, пользуются ограничителем в виде двухметровой рейки, на концах которой свободно висят прутья. Рейку средней частью закрепляют с помощью ремня на груди учетчика, а свисающие прутья ограничивают ширину обзора. Мерой пройденного расстояния служат шаги учетчика, переводимые при обработке учетных данных в метры. Во всем остальном техника ведения учета и записи результатов одним человеком не отличается от таковой при учете вдвоем.

Количественный учет некоторых грызунов путем подсчета их нор можно проводить с автомашины, аэровизуально или по аэрофотоснимкам. С машины, идущей со скоростью 25—30 км/час, подсчитывают норы, встреченные в полосе шириной 20 м (по 10 м с каждой стороны машины), определяемой на глаз, и отмечают жилые они или нет. Результаты учета выражают числом нор на один гектар обследованной площади. С автомобиля можно вести учет численности зайцеобразных, грызунов, насекомоядных, имеющих хорошо заметные норы (пищухи, сурки, суслики, некоторые песчанки) или оставляющих на поверхности обширные выбросы земли при устройстве нор (слепушонки, слепцы, цокоры, водяные крысы в период зимовки, кроты и т. д.). Учет с автомобиля позволяет быстро улавливать общие черты распределения зверьков, намечать границы отдельных поселений и распределение вида в целом. Использование коэффициентов заселенности нор, полученных при стационарных работах, позволяют перевести данные автомобильных учетов некоторых видов (сурки, суслики, большие песчанки) в показатели обилия зверьков на единицу площади.

Аэровизуальный метод учета разработан применительно к большой песчанке. С самолета, летящего на высоте до 200 м по заранее намеченному маршруту, подсчитывают все норы больших песчанок, попадающие в полосу, ширина которой определяется углом, образуемым двумя линиями, идущими от глаза наблюдателя через точки, заранее намеченные на переднем или заднем краю крыла самолета. По-

казателем численности служит среднее количество нор, отмеченное за 5 минут полета. Аэровизуальный учет численности большой песчанки позволяет установить относительное обилие нор на различных участках обследуемой территории, выяснить их границы и связь с определенным ландшафтом.

Аэровизуальный учет численности ряда видов млекопитающих и применение для этой цели крупномасштабных аэрофотоснимков весьма перспективны. С их помощью можно в кратчайшие сроки составить представление о кружеве ареала, очертаниях отдельных поселений, особенностях биотопического распределения и численности некоторых видов на обширных пространствах. Проведение подобных учетов на протяжении нескольких лет позволяет получить количественную характеристику пульсации границ отдельных поселений и ареала в целом.

2) Абсолютный учет численности

Для получения данных об абсолютном обилии зверьков применяют метод полного вылова зверьков на площадках, изолированных для того, чтобы избежать вселения со стороны. Изоляция достигается огораживанием площадок различными способами и материалами. Для изоляции площадок по учету численности сусликов надежным препятствием служит дощатый забор 60 см высотой или даже шнур с цветными флажками, закрепленными вплотную друг к другу. Полуденных и гребенщиковых песчанок хорошо задерживают проволочная сетка высотой 80—90 см, при условии расстановки вдоль ее нижнего края снаружи и внутри площадки капканов с интервалом 10—15 м. Надежную изоляцию площадок по учету численности мелких зверьков в лесу можно получить, огораживая площадку при помощи фанерных или металлических заборчиков 30 см высоты с двойным рядом ловчих циллиндров (внутри и снаружи заборчика). Облов изолированных площадок в основном производится для получения поправочных коэффициентов к менее трудоемким относительным способам учета. Лишь в лесных местообитаниях его можно применять с прямой целью — установления плотности популяции зверьков — прокормителей личинок и нимф иксодовых клещей.

Для исчерпывающего вылова зверьков на изолированных площадках применяют комплекс ловушек: проволочные капканчики (ловушки Геро или ловушки Соколова), живоловки, дающие возможность получить живых зверьков, и канавки с цилиндрами для отлова плохо идущих в ловушки землероек, мышовок и др.

Абсолютный учет численности мелких грызунов можно проводить также и на неизолированных площадках путем индивидуального мечения и повторных отловов зверьков живоловками. Наилучшим методом мечения является ампутация пальцев в определенном порядке. Цифра 1 получается ампутацией первого пальца, 2 — второго, 3 — третьего и т. д. Цифра 6 получается ампутацией первого и второго пальца на этой же лапе, 7 — первого и третьего, 8 — первого и четвертого, 9 — первого и пятого пальцев 10 получится, если отрезать первый палец на другой лапе. Правая задняя лапа служит для обозначения единиц, левая задняя — десятков, правая передняя сотен, левая передняя — тысяч Таким образом, можно получить до 9 999 номеров (Наумов Н. П., 1951, Кучерук В. В , 1952).

Для ловли живых зверьков в целях мечения и получения ценного материала для вирусологического и серологического обследования используют разные системы живоловок. Мышей, полевок, мелких песчанок, хомячков ловят сетчатыми и проволочными ловушками с домиками и без них. Ловушки без домиков можно употреблять только в теплый период года или в южных районах. В холодную погоду следует пользоваться ловушками с домиками, куда можно поместить гнездовой материал и запасы корма. При жаркой погоде, чтобы предотвратить гибель зверьков от перегревания, ловушки всех конструкций надо либо очень часто проверять, либо закрывать на день. Водяных крыс, хомячков, песчанок, сусликов ловят живоловками Зайцева. Для ловли сусликов используют также «донецкие» ловушки. Живых сусликов и сурков можно добывать капканами, надевая на их дужки резиновую трубку или обматывая их материей, чтобы не нанести повреждения зверьку. Мелких насекомоядных добывают в ловчие цилиндры, методика та же, что и при учетах с помощью канавок и заборчиков (См. раздел «Мелкие млекопитающие; методы отлова и учета» наст. «Методических рекомендаций»).

Живых зверьков можно добывать также осенью и зимой при полной разборке стогов, скирд, ометов Этот же метод используют и для учета. Обилие характеризуют числом особей на 1 стог или омет или на единицу объема разбираемого субстрата.

Применение всех методов учета в каждом конкретном случае не всегда осуществимо. В зависимости от местных условий и наличия сил и средств следует избрать наиболее продуктивные и доступные методы учета и отлова зверьков.

Б. ЛЕТУЧИЕ МЫШИ

В последнее время выявлено не только участие летучих мышей в арбовирусных эпизоотиях, но и роль их в переносе возбудителей на большие расстояния. Поэтому, если в районе исследования есть скопления летучих мышей, необходимо собрать материал для определения их связи с арбовирусами.

Добывают живых летучих мышей на местах дневок. Это обычно укрытые и затемненные места: дупла деревьев, старые пустующие постройки, чердаки, пещеры, глубокие трещины скал. Подвесившихся или укрывшихся для отдыха летучих мышей можно просто сбивать палкой, выпиливать верхние участки дупел, добираться до них с помощью лестницы или каната и собирать руками. В сумерки после заката и перед рассветом их можно отлавливать паутинными сетями (см. раздел о птицах). Сети расставляют у входов в пещеры, у труднодоступных мест дневки. В сухих районах эффективно расположение сетей по берегам ручьев, речек и над открытым зеркалом воды. Следует учесть, что за сетями нужно вести постоянное наблюдение и сразу же вынимать из сети попавших зверьков. Для защиты от покусов, зверьков следует брать только в плотных перчатках или рукавицах.

Видовой состав выявляется при определении добытых экземпляров. Приблизительная оценка численности и распределения может быть дана в результате подсчета зверьков на местах дневок или по итогам наблюдения их активности.

В. СРЕДНИЕ И КРУПНЫЕ МЛЕКОПИТАЮЩИЕ

Млекопитающие, относящиеся к категории средних и крупных (крупные грызуны, хищные, копытные и др.) нередко служат важными прокормителями кровососущих членистоногих (например, взрослых иксодид, комаров и др.) и могут регулярно вовлекаться в эпизоотический процесс, о чем свидетельствует присутствие вируса или антител к нему. Поэтому при поисках арбовирусов, изучении природных очагов и разработке способов их оздоровления, надо оценить роль и этих позвоночных в круговороте инфекции.

Главные сведения, необходимые для оценки их значения,— это видовой состав, территориальное распределение и численность, а также связи их с переносчиками инфекции. Видовой состав выявляется предварительно по данным, опубликованным в зоологической литературе, а на месте —

по опросам местных жителей (охотников и натуралистов), по сведениям местных охотничьих и заготовительных организаций и по непосредственным наблюдениям в природе.

Численность охотничье-промысловых зверей можно оценивать по данным заготовок, а также выяснять у местных охотников путем опроса или рассылки специальных анкет. Однако, степень достоверности опросных сведений не слишком высока Для проведения учетов в полевых условиях полезно привлечение опытного охотника. Учеты проводят преимущественно маршрутным методом с охотничьей собакой (лайкой, гончей, фокстерьером, таксой). При этом фиксируется длина и ширина учетной полосы, характер пересекаемых местообитаний и число найденных животных. В снежный период по свежей пороше на маршруте фиксируются все пересчетные следы, отмечая расстояния и границы разных местообитаний. Некоторых ночных и сумеречных животных (заяц, шакал и т. п.) можно учитывать ночью в свете фар автомашины, движущейся по определенному маршруту. При этом расстояние записывают по спидометру и фиксируют смену местообитаний.

Норников, населяющих открытые ландшафты (степь, полупустыня, пустыня) учитывают на маршруте, отмечая число обитаемых нор или колоний, так, как это описано для мелких млекопитающих (см. соответствующий раздел настоящей инструкции).

Добывать средних и крупных млекопитающих можно с помощью различных самоловов — капканов, петель, живоловок разных конструкций. Ряд видов (крупные грызуны, представители копытных, хищных) добываются путем отстрела. Предварительно необходимо получить лицензии (разрешение) на право добычи животных в республиканском управлении охотничьего хозяйства. Желательно привлечь к этой работе опытного охотника или работника охотничьего хозяйства.

С добытых животных по возможности быстрее собирают эктопаразитов, а у подранков и только что отстрелянных берут кровь и органы для исследования.

Г. ПТИЦЫ

1) Учет

Орнитофауна большинства мест Советского Союза достаточно хорошо изучена и результаты отражены в сводках по различных территориям. Однако, для каждого конкретного места работы необходимо установить видовой состав,

сравнительное обилие птиц и их распределение по различных биотопам. Существенное дополнение к литературным данным могут дать опросные сведения. Но основу орнитологической работы на первом этапе исследования должны составлять специальные учеты видового состава и обилия птиц.

Большинство существующих методов учета птиц приблизительны. В идеальном случае они должны давать полное представление о количестве птиц того или иного вида. Но погода, густота растительности и, главным образом, опыт и навыки учетчика, влияют на процент учтенных птиц Сравнимости результатов из разных мест или за разные сезоны достигают только тогда, когда учеты порводятся по одной и той же методике по возможности одними и теми же людьми.

Наиболее распространен маршрутный метод учета птиц, имеющий несколько модификаций. Маршрут (или несколько маршрутов) закладывают так, чтобы охватить учетом все основные биотопы интерсующего района. Чаще всего маршрутный учет проводят пешие учетчики, но при подсчетах крупных хорошо заметных птиц, например, дневных хищников, применяют учеты с автомашины или даже из окна железнодорожного вагона. При учетах с движущегося транспорта записывается километраж по спидометру или по столбам (или время и средняя скорость движения), отмечается смена ландшафтов и биотопов и фиксируются все встречи птиц. Для пересчета количества птиц на площадь при всех способах учета надо знать ширину учетной ленты, т. е. пространства справа и слева от учетчика, на котором он хорошо замечает и определяет каждую птицу. При пешем визуальном учете в открытых местах ширина учетной ленты будет больше, чем в лесу или густом кустарнике. Примерную ширину ленты определяют заранее экспериментальным путем для каждого биотопа. Учетчик может также отмечать приблизительное расстояние до каждой учитываемой птицы. Существует деление птиц на 5 групп по дальности их обнаружения: в первую группу входят птицы, хорошо заметные издалека, в пятую — обнаруживаемые на близком расстоянии (Кузякин, 1961). За пределами установленной полосы птиц не учитывают. Выбранные заранее по крупномасштабной карте маршруты проходят или проезжают в часы наибольшей активности птиц.

Для определения обилия мелких, преимущественно воробьиных, птиц в период гнездования применяется маршрутный учет поющих самцов по голосу. Учет проводят в часы

активного пения птиц, начиная с рассвета в течение 2—3 часов. Учетчик медленно идет по маршруту и отмечает расстояние в каждом типе мест обитания по числу шагов (с дальнейшим пересчетом в метры). Параллельно записывается каждый поющий самец птицы определенного вида. Целесообразно наносить результаты учета на заранее приготовленную схему или план маршрута с указанием встречающихся типов мест обитания. Одного самца принимают за пару птиц. Ширину маршрутной ленты можно принять за 100 м — по 50 м справа и слева от учетчика. (Птицы, поющие за пределами стометровой полосы, не учитываются). Обилие выражают числом пар на га. Учет на каждом маршруте проводят не менее 4—6 раз за период гнездования. Модификацией этого метода является учет на пробных площадях размерами не менее 4 га (желательно 16—24 га). Площадь проходят челноком по параллельным линиям, отстоящим одна от другой на 100 м. При этом записывают и наносят на план площадки всех поющих самцов. Для проведения учетов по голосам нужен либо квалифицированный орнитолог, либо предварительное ознакомление учетчика с голосами птиц. Запись голосов птиц средней полосы Европейской части СССР выпущена в виде долгоиграющих пластинок. Они могут служить для тренировки будущих учетчиков. Кроме того, целесообразно провести несколько предварительных экскурсий по намеченной для работы территории.

Для общего ориентировочного выяснения массовых видов птиц, их распределения и примерной численности можно использовать результаты попутных записей встреч птиц с указанием даты, часа, вида, количества особей, их поведения и типа местообитаний, проведенных при любых экскурсиях по исследуемой местности. Учет встреч, отнесенных ко времени экскурсии (например, к 10 экскурсионным часам), может дать относительный материал, вполне пригодный для сравнения (Неронов, 1962).

Крупных охотничье-промысловых птиц можно учесть по размерам добычи их охотниками, а также анкетным или опросным методами с балльной оценкой обилия.

Относительные учеты обилия птиц, связанных с водоемами, можно вести закладывая пешие маршруты по берегу или на лодке по водоему, а также путем подсчета видимых в бинокль птиц с пункта, обеспечивающего хороший обзор на далекие расстояния. Можно проводить подсчеты стай или скоплений птиц на пролете, зимовках, в местах кормежки и т. д. В большой стае считают птиц в произвольно выбранной части (1/3, 1/5, 1/10) и перемножают полученный резуль-

тат на число частей. Лучше, если одну и ту же стаю считают самостоятельно несколько учетчиков, а затем сравнивают полученные результаты.

Колониально гнездящихся птиц можно учесть, установив количество колоний на определенной площади района исследований, их размер, число гнезд или их густоту на единицу площади колонии. Распределение и число гнездовых колоний можно выявить аэровизуально при облете территории на легком самолете на небольшой высоте. В колонии определяют среднее число птенцов в одном гнезде и высчитывают общее число птенцов на единицу площади и во всей колонии. Количество взрослых птиц равно удвоенному числу занятых гнезд. На небольших, доступных для обзора колониях полученные данные близки к абсолютным.

2) Добыча птиц

Наиболее распространена добыча птиц путем отстрела их во время экскурсий, путем подкарауливания, скрадывания или с применением охотничьих собак. Но отстрел является далеко не самым лучшим способом получения материала для вирусологических целей, хотя его и приходится применять в тех случаях, когда добыча другими способами невозможна. Наиболее полноценные материалы получаются от птиц, пойманных живыми.

Методы добычи живых птиц разработаны и применяются организациями, проводящими их кольцевание, с целью выяснения пролетных путей, мест гнездовья и т. д. Для мелких птиц можно применять различные западни, лучки, самоловы, капканы, слопцы, птичий клей.

Для отлова птиц применяются также сети разнообразной конструкции — паутинные, пушечные и др. Дель японской паутинной сети делается из тонкой темнокоричневой или черной нейлоновой нити. Размер ячеек зависит от величины птиц, подлежащих отлову. Размеры полотнища приблизительно 10—15 м на 2—4 м. Сеть закрепляется на вертикально воткнутых деревянных шестах или металлических разборных опорах (из вставляющихся друг в друга дюралевых трубок) в местах наибольшей концентрации или регулярных пролетов птиц. У поставленной сети должен постоянно дежурить наблюдатель (в укрытии, чтобы не спугнуть птиц), который немедленно извлекает из сети попавших птиц, т. к. запутавшиеся птицы быстро гибнут, а более сильные из них могут порвать сеть.

Перспективен метод добычи птиц с помощью так называемых «пушечных сетей». Этим способом можно отлавливать

те виды птиц, которые собираются на земле или у берега водоема стайками или большими скоплениями (например, дрозды, скворцы, голуби, утки, хищные птицы-падальники и некоторые другие) и которых можно привлечь к определенному месту искусственной подкормкой. В качестве ловчей сети используется любая рыболовная сеть с размером ячеек, не позволяющим проскочить сквозь нее отлавливаемой птице. Сеть по прямой линии аккуратно складывается у одного из краев ловчей площадки и нижний край ее прикрепляется к земле. Сзади нее вплотную и наклонно в сторону выброса (под углом около 30—45°) устанавливаются «пушки» или металлические трубки с зарядом пороха и воспламеняющим капсюлем в нижней глухой части пушки. В пушку, поверх порохового заряда, вводится плотный (ввиде поршня) метательный снаряд, к крючку которого привязывается тросик, прикрепленный к наружному краю сети. Достаточно трех «пушек», чтобы обеспечить накидывание на ловчую площадку сети средней длины (15—20 м). Неподалеку в укрытии прячется ловец, который в момент скопления птиц на площадке производит выстрел одновременно из всех трех пушек. Этим способом удается накрыть сетью почти всех собравшихся птиц.

Ценный материал дает отлов живых еще не летающих птенцов из гнезд. Особенно обильным может быть сбор птенцов в гнездовых колониях. У птенцов можно брать кровь небольшими порциями неоднократно в процессе их роста, оставляя их в гнездах и сопровождая эту работу кольцеванием. Умерщвлять для дальнейшей обработки можно птенцов с выраженными патологическими изменениями или подросших птенцов перед самым вылетом из гнезда.

Д. ХОЛОДНОКРОВНЫЕ ПОЗВОНОЧНЫЕ

В местностях, населенных холоднокровными позвоночными, некоторые их представители, главным образом, некоторые виды пресмыкающихся (Reptilia) могут быть прокормителями переносчиков арбовирусов и промежуточными звеньями в круговороте инфекции. Поэтому нередко возникает необходимость охарактеризовать населения этих животных, их связь с эктопаразитами и собрать образцы для лабораторного исследования.

Видовой состав пресмыкающихся устанавливают по соответствующим литературным источникам и путем определения всех добытых животных.

Учеты обилия и распределения рептилий лучше всего проводить весной в период спаривания и повышенной активности, т. к. в это время больше шансов обнаружить максимальное количество особей обоих полов, а материалы, полученные из разных мест, сравнимы между собой Учет ведется на маршруте в часы наибольшей активности Длина и ширина маршрута зависят от местных условий в слабо покрытых растительностью полупустынных и пустынных местностях ширина учетной полосы достигает 8—10 м, а в заросших травой и кустарниками участках сокращается до 2 м. Длина маршрута должна составлять несколько километров. Обилие выражается числом особей на 1 км маршрута. Ночные виды (например, гекконов) учитывают на маршруте с помощью яркого фонаря, подсчитывая число встреченных особей в узкой, хорошо освещаемой полосе.

Добычу живых пресмыкающихся проводят либо во время учета, либо на специальных экскурсиях в период активности этих животных, отлавливая их руками, сачком или петлей из конского волоса. Пойманное животное опускают в полотняный мешочек, снабдив его этикеткой. При отлове змей и кусающихся ящериц следует соблюдать меры предосторожности, чтобы не допустить покусов ловцов и их помощников.

Е. ЛАБОРАТОРНАЯ ОБРАБОТКА ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ В ПОЛЕВЫХ УСЛОВИЯХ

Добытое животное возможно скорее помещают в мешочек, сшитый из плотной белой материи, чтобы сохранить всех эктопаразитов. (Если нет специальной необходимости в доставке в лабораторию живого животного, всех пойманных живыми зверьков умерщвляют непосредственно перед закладкой в мешочек, или прямо в нем). Каждое добытое животное снабжают этикеткой, которую опускают в мешочек (если предстоит длительная транспортировка) или привязывают снаружи так, чтобы видна была надпись, содержащая дату, час, место и способ добычи, название местообитания, вид (если он определен в поле). После этого по возможности быстрее добытые животные в мешочках доставляются для обработки в лабораторию.

Инструменты для паразитологической обработки эмалированные кюветы для очеса, жесткая щетинная щетка (для мелких зверьков можно использовать зубную щетку), маленький глазной пинцет, препаровальные иглы, колонковая кисточка, глазные ножницы для вырезания участков кожи

с паразитами, лупу 5х и 10х для определения групп эктопаразитов (можно использовать налобные лупы для увеличения поля зрения), мелкие стеклянные пробирки — «минутки», этикетки из плотной бумаги, карандаш, ручка и тушь, кусочки ваты для закупоривания пробирок, штатив для пробирок.

Обработка добытого животного начинается с присвоения ему очередного номера по единой нумерации позвоночных, которая используется при зоологической обработке, сборе эктопаразитов и вирусологическом исследовании образцов. Иногда нумерация дается отдельно для птиц и для млекопитающих На карточку (перфокарту) или в журнал под этим номером заносят сведения о добытом животном. Указывают 1 Номер животного; 2. Вид; 3. Пол; 4. Возраст; 5 Дату и время добычи; 6. Способ добычи (если отловлен серийными самоловами, то номер линии ловушек или площадки и номер ловушки); 7. Место добычи (республика, область, район, географический пункт); 8. Стация, биотоп или местообитание, которые обычно определяют по растительной формации, с указанием некоторых специфических особенностей места добычи, а если разработана типология мест обитания или биоценозов — то индекс типа.

Обработка начинается со сбора эктопаразитов. Для этого животное осторожно выкладывают из мешочка в кювету. Сначала пинцетом и влажной кисточкой собирают особенно подвижных членистоногих (например, блох). Затем осматривают, с применением лупы, вывернутый мешочек и собирают с него сползших с животного эктопаразитов; поверхность мешочка для гарантии полноты сбора очесывают щеточкой После этого проводят осмотр и очес животного. У пресмыкающихся тщательно просматривают покровы, особенно в складках на голове и у анального отверстия. При осмотре птиц пинцетом раздвигают перья на голове у клюва и ушей, на шее и брюхе; местами осторожно выщипывают перья для обнаружения присосавшихся клещей, затем очесывают жесткой щеткой над кюветой, собирают обнаруженных паразитов и затем внимательно осматривают, обращая особое внимание на голову, уши, лапы, и хвост, к которым часто присасываются личинки иксодовых клещей, а также ушные проходы и анальное отверстие, где нередко концентрируются личинки краснотелок. Для более полного сбора эктопаразитов со среднего млекопитающего можно снять шкуру и мехом наружу положить в мешочек. Через сутки следует проверить, не сползли ли на мешочек незамеченные прежде эктопаразиты. Крупных млекопитающих (главным образом, представителей копытных и хищных)

чаще всего приходится обрабатывать на месте добычи, где полный сбор эктопаразитов не всегда осуществим. С животного снимают всех замеченных эктопаразитов; основное внимание следует обратить на голову, уши, шею, брюхо, паховую и околоанальную области.

Собранных эктопаразитов раскладывают в пробирки раздельно по группам: иксодовые клещи (взрослые, нимфы, личинки), гамазовые клещи, краснотелковые клещи, блохи, вши, пухоеды; это облегчает их последующее определение. На этикетке, вложенной в пробирку, обязательно указывают номер животного, его вид, место и дату добычи, пробирку затыкают плотным ватным тампоном и помещают в банку с эктопаразитами данной группы. В карточке обработки позвоночного животного в соответствующих местах отмечается число собранных эктопаразитов по группам с пометкой, проведен полный или неполный осмотр и сбор, что необходимо знать при вычислении индексов обилия и встречаемости эктопаразитов.

После паразитологической обработки животных с этикетками по порядку номеров укладывают в кювету или на доску и вместе с карточками передают для дальнейшей обработки зоологам. Зоолог уточняет вид, взвешивает и измеряет зверьков, устанавливает пол и возраст (т. к. восприимчивость и роль в эпизоотиях разных возрастных групп различна) и проводит вскрытие для определения состояния генеративных органов и выявления патологических изменений внутренних органов. Все данные заносят в журналы или на карточки.

3. Сбор членистоногих

Кровососущие членистоногие осуществляют перенос арбовирусов в природных условиях между позвоночными, а в ряде случаев (иксодовые, аргасовые клещи) служат и резервуаром возбудителя.

А. КРОВОСОСУЩИЕ КЛЕЩИ (Arthropoda, Arachnoidea, Chelicerata)

1) Общие вопросы сбора и обработки материала

Сбор клещей из гнезд *. Гнезда помещают в плотные бязевые мешки (размером 20×30 см и больше), которые тща-

* **Примечание:** Методика сбора клещей с мелких животных уже описана в разделе «Лабораторная обработка позвоночных животных в полевых условиях» стр. 25—26.

тельно завязывают и снабжают этикеткой. На этикетке указывают хозяина гнезда, место сбора и дату. Разбирают гнезда в лаборатории вручную или при помощи термоэклектора. Последний представляет собой воронку (разной величины), в суженной части снабженную металлической сеткой с ячеями не более 1 мм. На металлическую сетку помещают субстрат гнезда, который освещают сверху электрической лампой. По мере высыхания субстрата членистоногие уходят в более глубокие слои, а затем через сетку проваливаются в конус воронки, к которому прикреплен сосуд для сбора клещей — чашка с водой, спиртом или влажная камера. Время отгона эклектором занимает от 2-х до 24-х часов; помимо электрического возможно применение солнечного света. При ручном способе разбора гнезда содержимое мешочка отдельными порциями перекладывают в кювету и тщательно перебирают пинцетом. Обнаруженных клещей кисточкой или пинцетом собирают в пробирки. Результаты разбора гнезда заносят в специальный журнал или на карточку.

Сбор клещей из нор. Для сбора эктопаразитов из нор применяют ленту из фланели. В зависимости от особенностей строения норы применяют двойную ленту, надетую на какой-нибудь каркас (палку, проволоку, резиновый шланг) или имеющую на конце груз. Ширина и длина ленты также определяются строением норы. Расстояние, на которое лента вводится в нору, зависит от близости к обследуемому норовому отверстию крутого поворота хода. Ленту вводят в нору на несколько секунд, затем вынимают на белую бумагу, клеенку или кювету и осматривают, собирая с нее клещей в пробирку. Повторяют это несколько раз до исчезновения клещей с ленты. Различные виды не одинаково активны в нападении. В холодную часть года или при работе с видами, плохо нападающими на ленту, эктопаразитов из входов нор собирают, выгребая рыхлую землю в кювету с помощью совка или скребка на длинной ручке. Собирать клещей с ленты, с бумаги или из земли в кювете нужно мягким пинцетом или кисточкой.

Обработка данных, полученных при учете эктопаразитов. При изучении численности членистоногих — эктопаразитов позвоночных животных принято пользоваться количественным учетом их на животных, в норах, гнездах, на почве, на растительности. В. Н. Беклемишевым (1961) уточнены понятия и термины, обозначающие количественные взаимоотношения эктопаразитов и хозяев. Эти термины общеприняты. Понятие *численность* обозначает общее число особей, составляющих популяцию. При изучении изменений численно-

сти популяции во времени на протяжении сезона, года или нескольких лет (сезонный ход численности, годовой, многолетний и др.) — применяют термин движение численности. Для выражения численности пользуются следующими показателями:

Индекс обилия вычисляют как среднее число эктопаразитов, приходящихся на единицу учета (на одного осмотренного зверька). Он характеризует численность тех или иных паразитов в изучаемом биоценозе и поэтому является основным показателем в экологии эктопаразитов. Вычисление индекса обилия производится для каждого вида в отдельности, но может быть определен и общий индекс для групп эктопаразитов (экологической, таксономической и др.). При определении индекса обилия учетной единицей может быть единица времени (учет иксодовых клещей на человеко-час, флаго-час и т. д.); единица площади в данном местообитании (например, учет на площадках в 100 кв. м для иксодовых клещей и др.), единица объема субстрата, единица, определяемая числом проведенных проб, операций учета (например, ловушко-суток). Единицей учета эктопаразитов служит особь хозяина, для эктопаразитов — нидиколов—гнездо или нора и т. д. Если единицей учета служит время или число проб, то эта величина, обилия является относительной. Если учетной единицей служит среднее число особей на единицу объема или поверхности среды, то эта величина обилия является абсолютной. При абсолютном учете позвоночных желательно одновременно проводить абсолютный учет численности их эктопаразитов.

Показатель прокормления. Помимо индексов обилия эктопаразитов на хозяине, применяется индекс обилия паразита на единицу учета хозяина. Вычисляют его перемножением индекса обилия клещей и индекса обилия мелких млекопитающих на 100 ловушко-суток или за 10 дней работы канавки, или на 1 км маршрута для птиц. С помощью показателя прокормления можно сравнивать значение отдельных видов или групп видов в прокормлении клещей в разные годы, в различных местах обитания.

Индекс встречаемости — число проб, в которых обнаружены особи данного вида, выраженное в процентах от общего числа исследованных проб. Встречаемость для эктопаразитов — это процент зараженных особей хозяина.

Индексом доминирования по обилию определяется удельное значение того или иного вида в соотношении с близкими видами. Он выражается в процентах и применяется одновременно с индексами обилия других видов

эктопаразитов. Применяется также индекс доминирования по встречаемости. Сумма индексов доминирования всех сравниваемых видов равна 100%.

Индекс приуроченности (индекс верности) вида или популяции выражает степень участия различных единиц среды в размещении данного вида и выражается в %%. Индекс общности видового состава является мерой сходства между биоценозами. Подробнее о сборе и обработке материалов по эктопаразитам написано в сборнике «Методы исследования природных очагов болезней человека» п/ред. П. А. Петрищевой и Н. Г. Олсуфьева, Медгиз, 1964 г.

2). Иксодовые клещи (Parasitiformes, Ixodidae)

Иксодовые клещи являются временными наружными паразитами позвоночных животных. Многие виды иксодовых клещей в половозрелой фазе развития активно нападают и присасываются к человеку; некоторые виды могут присасываться к человеку и в фазе личинки или нимфы.

Различают две жизненные формы: пастбищные подстерегающие (большинство видов) и гнездово-норовые (меньшее число видов) кровососы. В первом случае связи с прокормителем разнообразны. Соответственно типу питания они делятся на одно-, двух- и треххозяинных клещей. Это отличие определяется количеством животных, необходимых для завершения всего цикла развития от личинки до половозрелого клеща и местом линьки. Все гнездово-норовые клещи — треххозяинные, среди них имеются обитатели нор грызунов и птиц. Треххозяинные иксодовые клещи вероятно играют особо важную роль в циркуляции и в резервации арбовирусов. На территории СССР обнаружено 66 видов иксодовых клещей, относящихся к шести родам (Ixodes, Haemaphysalis, Hyalomma, Dermacentor, Rhipicephalus, Boophilus).

Иксодовые клещи распространены во всех ландшафтных зонах. Многие виды приурочены к определенным типам ландшафтов. Ареалы некоторых четко отграничены климатическими условиями.

Большинство пастбищных клещей пользуются широким кругом прокормителей из числа теплокровных животных; для половозрелых форм ими являются крупные млекопитающие (домашние и дикие), для личинок и нимф — мелкие позвоночные, а для некоторых видов клещей — и крупные домашние животные. Все процессы, за исключением питания, (кладка яиц, линька, зимовка) осуществляются у пастбищных клещей в поверхностном слое почвы и в подстилке. Для подстерегания прокормителей клещи взбираются в пе-

риод активности на траву и кустарники, где и ожидают контакта с хозяином или нападают на него с почвы. Лишь виды рода Hyalomma способны активно разыскивать объекты кровососания.

У норовых клещей круг прокормителей значительно уже и иногда сводится к одному виду животного. Весь цикл развития, а также подстерегание прокормителя, происходит в норе хозяина.

Продолжительность питания некоторых иксодовых клещей определяется следующими сроками: половозрелые клещи питаются в течение 6—12 суток, нимфы — 3—8, личинки — 2—5 суток, после чего сытые особи отпадают (в зависимости от вида — на пастбищах, в скотниках и т. д.). Каждая сытая самка откладывает по нескольку тысяч яиц. Продолжительность времени от полного насыщения до откладки яиц зависит от вида клещей и климатических условий.

а) Методика сбора клещей

В зависимости от характера обследуемой территории и экологических особенностей клещей применяют различные способы их сбора. На открытых участках клещей собирают на «волокушу», т. е. на отрез однотонной светлой ворсистой ткани (вафельное полотенце, фланель) 1,5—2 м длины. В швы противоположных узких сторон отреза вставляют две рейки. За одну из них берется сборщик и медленно волочит волокушу справа от себя по участку. Клещи, находящиеся на траве, цепляются за ткань, с которой их снимают мягким пинцетом в пробирку.

На участках с высокой травой, в густом лесу и т. д. клещей собирают на флаг из той же ткани размером 60 × 100 см. Флаг отличается от волокуши главным образом тем, что ткань прикрепляют к длинной (125—150 см) рукоятке только одной узкой стороной. Флагом, не допуская его скручивания, проглаживают травянистую и кустарниковую растительность справа и слева от себя (но не впереди и не сзади), снимая в пробирку прицепившихся клещей.

Наиболее эффективным способом для видов, активно отыскивающих хозяина, является сбор с наблюдателя. Для этой цели рекомендуется останавливаться на 10—15 мин. в различных местах обследуемого участка. Клещи устремляются к наблюдателю, нападая на ноги. Для этих видов возможно применение методики сбора с помощью углекислого газа (см. раздел «Аргасовые клещи»).

Эффективным приемом сбора некоторых видов клещей является сбор с домашних или диких животных. При сборе клещей со скота обращают особое внимание на ушные раковины, шею, грудь, подмышечные впадины, пахи, околоанальную область, вымя, основание хвоста. Это места наиболее частой локализации клещей. Клещей осторожно снимают мягким пинцетом или руками в резиновых перчатках, стараясь не повредить хоботок. Сбор клещей с диких животных описан в разделе «Лабораторная обработка добытых позвоночных животных». Клещей некоторых видов рода Hyalomma собирают на хозяйственной территории (с пола в скотниках, в щелях стен, дувалов, под кизяком), с растительности в местах прогона и стоянок скота. В некоторых случаях, например при низкой численности клещей, сбор иксодид возможен на живую приманку. Для этой цели животных предварительно освобождают от клещей, а затем выпускают на обследуемый участок; в конце дня их осматривают на присутствие клещей. Приманкой могут служить ежи, собаки, овцы, телята и мелкие лабораторные животные.

Гнездово-норовых паразитов собирают в гнездах их хозяев — позвоночных. Методика сбора описана выше.

б) Методика учета клещей

Для выяснения размещения половозрелых клещей по территории и биотопам, их учитывают на единицу пройденного пути, площади, времени. Применяя единую методику количественного учета клещей на большой территории и на стационарных участках, можно получить сравнимые показатели численности клещей во времени (по пятидневкам или по декадам) и в пространстве на разнохарактерных участках. На основании этих данных выявляется не только топография клещевых очагов, но и ход численности клещей по сезонам.

Для выяснения динамики численности клещей в различных биотопах, а также для определения сезонного и суточного ритма активности применяют учет на постоянных маршрутах. Маршрутные линии для установления численности клещей намечают во всех биотопах, характерных для данного района. Длина маршрута не менее 500 м, как правило 1 км, в отдельных случаях — больше. Число маршрутов зависит от разнообразия растительных формаций обследуемой местности. Клещей учитывают один раз в 7 дней в одни и те же часы суток (в часы максимальной активности клещей для данного места), принимая во внимание состояние погоды. Учет не следует проводить в дождливую погоду, при

обильной росе и при слишком ярком солнце. Клещей собирают на стандартную волокушу (флаг) и отдельно с учетчика; одежду учетчика и волокушу или флаг осматривают через каждые 10 м. Показателем численности служит количество клещей, пойманных на 1 флаго/км. Собранных с флагов в пробирки клещей используют для определения и вирусологических исследований. Необходимо отмечать время, затраченное на учет, чтобы эти данные можно было сопоставить с результатами учета клещей на флаго/час. Все участки, где производится учет численности клещей, должны быть описаны с указанием рельефа (склоны, понижения, днища логов и т. д.), состава древостоя, численного соотношения пород деревьев, их возраста, полноты насаждения, степени развития подроста и подлеска, травяного покрова, типа почвы, ее влажности.

в) Методика наблюдения за жизненных циклом клещей в естественных условиях

Для наблюдений за жизненным циклом иксодид З. М. Жмаевой разработан метод круглогодичного сохранения клещей в природных условиях. Этот способ применим как в лесу, так и в других ландшафтах (степи, пустыне). Для закладки клещей в почву применяют деревянные кольца, закрытые с обеих сторон капроном. Капрон закрепляется резиновыми обхватами. На стенке деревянного кольца выжигают порядковый номер; диаметр кольца 3,5—6 см, высота 1—4 см. Кольца можно размещать на различной глубине в любой стации. В каждое кольцо рекомендуется помещать по одной самке, десять нимф или не более 20 личинок. Закладку клещей следует производить один раз в пять или десять дней на протяжении всего весенне-летнего сезона. Проверяют их через такие же интервалы до осени или в течение всего года, в зависимости от климатических условий места и поставленной задачи

Для выяснения вертикального размещения клещей на растительности пользуются экраном. Экран представляет собой складную раму высотой в 2 м и шириной 75 см, обтянутую белой бязью. Бязь разграфлена поперечными полосами через 25 см. Вертикально поставленный экран протаскивают сквозь заросли травы и кустарник так, чтобы нижний край касался почвы. Через каждые 5—10 мин экран осматривают, собирают клещей в разные пробирки соответственно высоте их расположения, а затем подсчитывают.

г) Способы содержания и получения культур клещей в экспериментальных условиях

Сохранение собранных клещей живыми необходимо для вирусологических исследований, выведения культуры видов и др Собранных на маршруте клещей помещают в химические пробирки с плотной ватно-марлевой пробкой Внутрь пробирки кладут полоску гофрированной фильтровальной бумаги или травинку. В каждую пробирку вкладывают временную этикетку с указанием на ней пункта, даты, вида животного или формы сбора, типа участка. Такие пробирки используют только для доставки клещей в лабораторию, где их сразу же сортируют по видам, степени насыщения, подсчитывают, регистрируют в журнале и помещают в другие специальные пробирки или влажные камеры. Для приготовления одной из модификаций влажных камер крупные прокалиброванные стерилизованные опилки насыпают до 1/3—1/4 пробирки, поверх опилок кладут несколько кружочков фильтровальной бумаги. Пробирки увлажняют дистиллированной или кипяченой водой из тонкой пастеровской пипетки, опуская ее кончик до дна пробирки. Степень увлажнения пробирки зависит от влаголюбивости вида. Нельзя допускать избытка влаги Периодически, 1—2 раза в неделю, осматривают камеры с клещами и в случае необходимости увлажняют повторно. Кроме описанного, существуют и другие способы изготовления влажных камер с использованием крупного песка и плотных ватных тампонов (см. раздел «Гамазовые клещи»). Если содержать клещей при температуре +4°С, осмотры можно производить реже. Для сытых особей различных фаз клещей наиболее благоприятна температура +20—28°С в зависимости от вида клеща. Пробирки с клещами можно помещать в эксикатор, на дно которого кладут влажный песок или наливают воду. В этом случае отверстия пробирок затягивают мельничным газом. Такое хранение может на некоторый срок заменить влажные камеры.

Методика кормления клещей. В экспериментальных условиях клещей кормят на лабораторных животных: имаго и нимф — на кроликах и морских свинках, личинок — на хомяках и белых мышах. В полевых условиях клещей можно кормить на ежах. Каждое животное может быть использовано для повторного кормления на нем клещей только через несколько месяцев

Перед посадкой клещей животное (кролика, свинку, мышь) фиксируют спиной вверх и выстригают шерсть на спине На освобожденное от волос место наклеивают «колпачок»: в округлую рамку из белой бязи с шириной краев

до 1 см для белых мышей и до 5 см для кроликов вшивают частым краевым швом бязевый цилиндр, диаметром 1,5 см для белых мышей и до 7 см для кроликов. Рамку обильно смазывают клеем (загустевшим коллодиумом или клеем из фотопленки, растворенной в ацетоне) и накладывают на выстриженный участок спины. После того, как колпачок окончательно присохнет, внутрь его пускают клещей: взрослых не более 20 экземпляров обоего пола на кролика, 10 — на свинку, по 1—2 на белую мышь. Наклейку перевязывают в средней части и, загнув свободный конец, перевязывают еще раз. Чтобы предотвратить скусывание колпачка, на шею животного надевают круглый воротник — для кролика из жести с загнутыми краями диаметром 7—8 см, для свинок из твердого картона диаметром 5 см, для белых мышей из фотопленки диаметром 1,5 см. Воротник должен не сдавливать шею и не мешать зверьку есть, но не должен свободно проходить через голову при попытках снять его.

Ежедневно наблюдают за состоянием наклейки с питающимися клещами, подсчитывают отпавших сытых особей. Результаты записывают в журнал. Сытых клещей помещают в пробирки или влажные камеры (см. предыдущий раздел). В каждую камеру следует помещать по одной сытой самке, не более 50 сытых нимф и 200—300 сытых личинок. Внутрь вкладывают этикетку с обозначением порядкового номера, вида клеща, пункта его сбора, даты снятия с естественного прокормителя или с участка. Внизу этикетки указывают номер и вид лабораторного прокормителя и дату отпадения с него сытых клещей.

д) Подготовка клещей для вирусологического исследования

Определение зараженности клещей вирусами, риккетсиями или бактериями производят путем исследования суспензий из клещей или кормлением их на восприимчивых животных. Для суспензий берут в одну пробу от 10 до 50 клещей (одного вида, пола, с одного хозяина, из одного биотопа). Если сбор редкий (обнаружен редкий вид или по др. причинам), возможно приготовление суспензии из менее чем 10 клещей. При работе с многочисленным материалом необходимо постоянство клещей в пробе. Это даст возможность сравнивать данные, полученные из разных мест, стаций, в разное время или с разных хозяев. Все виды работы с клещами требуют знания их систематики.

е) Техника безопасности при работе с клещами

При сборах и исследованиях клещей необходимо принимать меры предосторожности. На участке следует работать в противоклещевом костюме, если же такого нет, то рубашка должна быть заправлена в брюки, на ногах должны быть сапоги или ботинки с носками, заправленными поверх брюк. При работе в поле и в лаборатории необходимо регулярно осматривать одежду и тело, чтобы предотвратить присасывание клещей. Разбирать пробы надо в кювете, края которой смазаны вазелином, или помещенной в другую кювету большего размера, наполненную водой. С основными приемами противоклещевой профилактики более подробно можно ознакомиться в соответствующих руководствах.

3) Аргасовые клещи (Ixodoidea, Argasidae)

Аргасовые клещи являются важным источником выделения арбовирусов. В аридных областях аргасовые клещи служат резервуаром ряда вирусов. В пределах нашей страны аргазиды распространены на юге Европейской части, на Кавказе и в Средней Азии. Некоторые виды аргасовых клещей экологически связаны с птицами.

Наиболее характерным убежищем для многих видов аргасовых клещей являются пещеры и норы крупных и мелких животных: дикобраза, лисы, волка, песчанок, сусликов, черепах, ежей, птиц и т. д. Клещи заселяют гроты, трещины в скалах, углубления под камнями. Некоторые виды в массе встречаются в хозяйственных постройках, помещениях для скота и птицы. Аргасовые клещи обитают в местах гнездования колониальных птиц, где их можно обнаружить в подстилке гнезд или в трещинах почвы под ними, а также в местах дневок летучих мышей (в пещерах, на чердаках, в дуплах).

Наибольший сбор клещей дают обитаемые норы. Из нор животных субстрат выгребают совком с длинной ручкой, рассыпают тонким слоем на белую клеенку или в кювету и просматривают. Можно просеивать субстрат через сито (с диаметром ячеи не менее 2 мм) и просматривать как просеянную, так и оставшуюся часть субстрата. Голодные клещи быстро начинают двигаться и их собирают пинцетом или пробиркой.

В больших пещерах аргасовых клещей можно собирать с помощью ловушек с живой приманкой (еж, овца, кролик, морская свинка) или на человека. Для этого расстилается белая простыня и на нее садится человек, обязательно

в противоклещевом костюме. Ползущих клещей собирают пробиркой или пинцетом.

Можно отлавливать клещей, привлекая их углекислым газом, который растекается из баллона по тонким резиновым трубочкам, заканчивающимся на поверхности почвы капиллярами (1 мм). В минуту выпускается 2 000 мл газа. Клещи наползают с площади диаметром 1,2—3,5 м. При сборе клещей для вирусологического исследования одним этим методом пользоваться недостаточно, т. к. разные виды клещей по разному привлекаются углекислым газом. При выявлении видового состава клещей на обследуемой территории необходимо сочетать различные методы, чтобы обеспечить наиболее полный сбор разных видов клещей. Аргасовых клещей собирают также в помещениях для скота и около них. Для этого осматривают углубления и трещины в стенах и полу, под штукатуркой, в пространствах между камнями, из которых сложены стены и дувалы. Живых аргасовых клещей содержат в колбочках Эрленмейера или в бактериологических пробирках, на дно которых помещают полоски фильтровальной бумаги, сложенные «гармошкой». Для определения аргасовых клещей можно использовать «Определитель членистоногих, вредящих здоровью человека» п/ред. *Беклемишева, Медгиз, 1958 г.*

4) Гамазовые клещи (Gamasoidea)

При изучении природных очагов основное внимание уделяют паразитическим видам гамазид, которых собирают с животных, из их нор и гнезд. В норах позвоночных животных основная масса гамазовых клещей сосредотачивается в подстилке гнездовой камеры, в ходах нор их почти не бывает. Гнезда птиц по видовому составу гамазид беднее, чем норы млекопитающих, но численность клещей в период гнездования может быть очень высокой.

Синантропных гамазид собирают в жилых помещениях и хозяйственных постройках, например, в курятниках, в щелях стен и пола, а также в гнездах голубей, воробьев, ласточек, в норах грызунов. При разборе гнездового материала можно пользоваться термоэклектором (см. раздел «Иксодовые клещи»). Из нор клещей собирают на фланелевую ленту или выбирают из субстрата при раскопке нор. С хозяев гамазид получают при очесе из шерсти, из оперения птиц и из-под чешуй рептилий. Клещей некоторых видов извлекают из дыхательных путей животных и из наружных слуховых проходов.

Для более полного выявления видового состава необходимо сочетать сборы клещей с животных и из нор и гнезд, т. к. степень приуроченности к гнезду и телу животного-хозяина у разных видов различна.

Для анализа сезонного хода численности и определения возрастного состава популяции необходимо периодически повторять сборы, т. к. гамазиды характеризуются быстрым размножением и могут давать кратковременную вспышку массового размножения.

Для содержания гамазовых клещей в лаборатории пользуются влажными камерами, предложенными А. Б. Ланге (1957) или Е. Н. Нельзиной (1951).

5) Краснотелковые клещи (Trombiculidae)

Взрослые краснотелки и нимфы — свободноживущие хищники, личинки — временные паразиты наземных позвоночных. Личинки краснотелок паразитируют на диких и домашних млекопитающих, птицах, рептилиях и амфибиях.

Личинки краснотелок на грызунах, насекомоядных и др. мелких млекопитающих локализуются группами в слуховом проходе, на ушах, голове, шее, животе, сосках, вокруг анального отверстия, на ногах. Для сбора краснотелок тщательно осматривают зверька, раздвигая шерсть пинцетом или препаровальной иглой. С мертвых грызунов личинок вырезают вместе с кожей хозяина. Желателен осмотр носовых полостей на наличие внутриполостных видов краснотелок. Полостные паразиты локализуются на слизистых оболочках носовых полостей у крыс и других грызунов. Краснотелки встречаются и на домашних животных. У них личинки распределяются на лицевой части головы (по краю век, на носу, реже на лбу и щеках), в ушных раковинах и на ногах. У птиц личинки прикрепляются на животе, груди, шее, ногах, веках, в ушах, вокруг анального отверстия на копчиковой железе. На ящерицах личинки прикрепляются на спине, хвосте, бедрах, в пахах, подмышками.

Для сбора личинок с поверхности почвы пользуются световыми ловушками. Световая ловушка в простейшем виде представляет собой металлический поднос размером 100 × 100 см с бортами высотой 7 см. В центре подноса сделано отверстие, в которое вставляют стеклянный цилиндр. Поднос ставят ввех дном и вдавливают в почву. Для сбора личинок расставляют несколько ловушек на 4—5 часов. Благодаря положительному фототаксису находящиеся под подносом личинки из темноты ползут к источнику света и концентрируются на стенках цилиндра.

Личинки некоторых видов краснотелок собираются большими группами на поверхности почвы и наползают на лежащие на земле предметы. Для сбора личинок этих видов пользуются квадратами черной промасленной ткани, черными пластмассовыми кругами, бакелитовыми или пластмассовыми пластинками различной величины, блюдцами т. д. Эти предметы кладут на почву и через некоторое время осматривают.

В качестве приманки для сбора личинок используют белых мышей и крыс, морских свинок, полевок. Животных помещают в маленькую клетку из металлической сетки и выставляют на исследуемый участок. Взрослых краснотелок и нимф собирают главным образом в верхнем слое почвы, в подстилке, гнилых пнях. Поиски взрослых клещей и нимф обычно ведут в тех местах, где на грызунах отмечена высокая численность личинок краснотелок. Исследование проб почвы на присутствие краснотелок производят разборкой вручную, с помощью эклектора и методом флотации (заливая теплой +30° водой образцы почвы, перемешивая и выбирая кисточкой всплывших краснотелок). Для определения краснотелок пользуются определителем, но лучше отправлять материал специалистам.

Б. КОМАРЫ (Culicidae)

Комары являются активными переносчиками многих арбовирусных инфекций. В настоящее время известно более 150 арбовирусов, выделенных из комаров. Восприимчивость комаров к арбовирусам определяется нижним порогом титра вируса в крови позвоночного, при котором заражается 50% переносчиков, а также числом заразившихся переносчиков, способных передать вирус позвоночному через укус. При определении значения видов комаров как переносчиков важно знать их способность к быстрому массовому размножению. Следовательно, для правильного понимания той роли, которую играют кровососущие комары в переносе вирусной инфекции, необходимо глубокое изучение их экологии. С этой целью определяют видовой состав комаров и численное соотношение видов, а также сезонный ход численности и суточную активность. Для выяснения циркуляции вируса в очаге необходимо установить круг позвоночных хозяев, на которых питаются комары.

Особенность экологии комаров состоит в том, что начальные фазы развития (яйцо, личинка, куколка) обитают в воде. Эпидемиологическое и эпизоотологическое значение имеет имаго — взрослая половозрелая фаза развития.

Для отлова и учета комаров используют ловушки разнообразной конструкции. При сборе комаров в разных биотопах сейчас широко применяют световые ловушки с различными источниками светового и ультрафиолетового излучения. Во многих зарубежных лабораториях применяется портативная световая ловушка. Она работает от 4 или 6-вольтовых мотоциклетных батарей, имеет небольшой вес и может быть с успехом использована в самых разнообразных условиях. В связи с тем, что разные виды комаров неодинаково привлекаются на свет, рекомендуется использовать эту ловушку в сочетании с источником углекислого газа (сухой лед). Это увеличивает количество и разнообразие видов пойманных комаров. Ловушка снабжена всасывающим устройством и крышкой, которая предохраняет ее от росы и дождя.

В нашей стране исследователи пользуются световыми ловушками, конструкции которых предложены Г. А. Мазохиным-Поршняковым (1958) и Д. Т. Жоголевым (1966). Корпус одной из таких ловушек состоит из жестяного цилиндра, диаметром 30 см и высотой 25 см. Над цилиндром укрепляется на стойках крышка, предохраняющая ловушку от дождя. К одной из стоек на кронштейне крепится горелка ПРК-4, которая помещается вертикально над центром цилиндра. Внутри корпуса ловушки заключен вентилятор настольного типа с резиновыми лопастями. Мощность его 75 ватт, количество оборотов — 1500 в мин. На нижний край корпуса при помощи резиновой тесьмы прикрепляется мешок из двойной марли, который служит приемником. Насекомые, привлеченные светом горелки, уносятся в приемник током воздуха. Ловушка устанавливается так, чтобы высота лампы над землей была 1,5 м. Установка ловушки на большой высоте снижает улов.

Световые ловушки являются удобным средством лова кровососущих двукрылых. В сочетании с другими методами сбора они позволяют быстро и наиболее полно выявлять состав и численное соотношение видов насекомых. Световые ловушки дают особенно хорошие сборы насекомых в южных районах, где преобладают кровососущие двукрылые с ярко выраженной сумеречной активностью.

Отлов, учет, а также определение предпочтения одних хозяев другим можно проводить, применяя ловушку с приманкой. Это может быть просто полог, под которым стоит клетка с животным, или для этой цели служит небольшой сарай, курятник, помещения для скота, в окна которого вставлены ловушки для комаров с живой приманкой или

всасывающим устройством. И, наконец, это могут быть ловушки с приманкой более простой конструкции, устроенные в виде верши, внутри которой помещается клетка с животными.

Примером таких ловушек может быть модель, предложенная Беллами, которая дала хорошие результаты при использовании ее в полевых условиях. Она представляет собой большую цилиндрическую коробку из жести с конусовидной перегородкой, ведущей внутрь от каждого конца Через боковую дверцу внутрь помещается животное-приманка. Ловушка подвешивается в горизонтальном положении. Конструкция может быть различной модификации, так чтобы допустить нападение комаров на животное-приманку или, наоборот, защитить его в маленьком отгороженном садке.

Ловушки с приманкой обладают большими избирательными свойствами, чем световые ловушки, и их удобно применять при выяснении пищевых предпочтений кровососов или для массового сбора определенных видов.

Другим примером ловушки с приманкой и всасывающим устройством может быть ловушка, представляющая собой усеченный конус из алюминия, в верхней части которого находится садок для комаров. Снизу помещается пропеллер, работающий от 6-ти вольтовой автомобильной батареи Внутри конуса находится садок с животным-приманкой. Мотор соединен с часовым механизмом, который включает его на 30 сек. с пятнадцатиминутным перерывом

Для учета и отлова комаров в природе можно использовать колокол Мончадского (1952) и колокол Березанцева (1952), а также полога, которые особенно необходимы при отлове комаров из труднодоступных мест, таких как трещины в камнях, пещеры, норы животных и т. д.

Из ловушек и пологов комаров собирают эксгаустером или пробиркой. В зарубежной практике для сборов насекомых на дневках и из ловушек пользуются механическим аспиратором. В. Г. Кузнецовым (1970) предложена модель аспирационного эксгаустера со сменными садками, склеенными из отмытой рентгеновской пленки. Этот эксгаустер прост в обращении. При сборах комары или другие насекомые мало повреждаются. В один садок можно собирать от 100 до 500 экземпляров. Если комаров надо сохранить живыми, то в один садок собирают 50—100 экземпляров.

При наблюдении за круглосуточной активностью комаров, сезонным ходом численности и обилием, выбирают контрольные участки и регулярно проводят на них наблюдения и учеты.

При статистической обработке собранного материала получают индекс обилия для каждого из выявленных видов комаров. При сборе световыми ловушками с приманкой индекс обилия выражается средним количеством насекомых, собранных за час работы ловушки. При сборе комаров пологами или колоколами Мончадского и Березанцева индекс обилия определяется средним количеством пойманных насекомых за время одного учета (5 мин).

На обследуемой территории необходимо проводить сборы личинок и куколок комаров, т. к. они дают наиболее полные данные о видовом составе, о сроках развития и типичных местах выплода.

Личинок и куколок комаров отлавливают и учитывают в местах выплода водяным сачком. Он состоит из обода (диаметром 20 см), мешка (глубина 25 см) и палки (длина 100 см). Мешок шьют из белой материи, хорошо пропускающей воду, или шелкового мельничного сита № 29—35. Мешок должен иметь цилиндрическую форму и закругленное дно. Для сбора личинок и куколок применяют также плоский марлевый сачок, ковшик и т. д. Из каждого водоема берут по 10 проб и более.

После сбора живых комаров помещают в садок, сшитый из марли или мельничного сита. Садки закрывают влажной тканью и ставят в прохладное место (особенно в южных районах), чтобы предотвратить гибель комаров. От собранных комаров отделяют напившихся самок и выдерживают их до полного переваривания крови. Остальных комаров анестизируют хлороформом или табачным дымом, помещают в стеклянные пробирки или пенициллиновые флаконы, которые закрывают резиновыми пробками. Место соединения стекла и пробки несколько раз обертывают лентой лейкопластыря. Пробы комаров снабжают этикеткой с указанием места и даты сбора. Собранных комаров помещают в термоконтейнер с сухим льдом или жидким азотом.

Дальнейшая обработка материала: определение комаров до вида и разбор их на партии по 50—100 экз. для вирусологического исследования — производится в лаборатории. Необходимо учесть, что разбирать комаров надо на охлажденной поверхности (лед или охлаждающий столик). Если есть возможность, то комаров до вида определяют при первичной обработке материала в полевых условиях. Для определения комаров используют определительные таблицы, например Гуцевич, Мончадский, Штакельберг. Комары. Сем. Culicidae, Л., Наука, 1970.

В. МОКРЕЦЫ (Heleidae)

К группе кровососущих мокрецов относятся три широко распространенных рода: Culicoides Latz, Leptoconops Skuse и Lasiohelea Kieff, а также два рода, имеющих ограниченное распространение — Parapterolosca из Африки и Austroconops из Австралии.

В природе убежищем для взрослых мокрецов служит растительность, норы, пещеры, помещения для скота. Кровососущие мокрецы нападают на людей, диких и домашних животных, на птиц. Некоторые виды могут пить кровь пресмыкающихся и земноводных. Строгой избирательности в выборе источника питания у мокрецов не наблюдается.

Основными условиями высокой активности нападения мокрецов являются подходящая температура и отсутствие ветра. При ветре более 2 м/сек полностью прекращается нападение мокрецов. Важным фактором активности мокрецов является свет. Наибольшее количество нападений мокрецов регистрируются в утренние и вечерние часы. В зависимости от видового состава и метеорологических условий бывает более выражен утренний или вечерний подъем активности. Некоторые виды Culicoides и все мокрецы рода Leptoconops нападают только в светлые часы суток.

В последнее время было установлено участие кровососущих мокрецов в распространении ряда арбовирусных инфекций домашних животных и человека. При сборе и учете кровососущих мокрецов в основном применяются те же методы, что и для сбора и учета комаров и москитов.

Г. МОСКИТЫ (Phlebotomidae)

Москиты — специфические переносчики некоторых групп арбовирусов. На территории нашей страны они встречаются в республиках Средней Азии, на юге Казахстана, на Кавказе, на юге Украины, в Крыму и в Молдавии. Местами обитания москитов являются норы, гнезда и другие убежища диких позвоночных животных. На хозяйственной территории москиты скапливаются на дневках в жилых помещениях и помещениях для скота.

Отлов и учет москитов можно проводить светорыми ловушками (см. раздел «Комары»), а также на освещенный белый экран. Отлов живых москитов из различных убежищ (пещеры, гроты, расщелины среди камней) производят с помощью пологов. Группу нор закрывают пологом или колоколом, внутри которого подвешивают фонарь. Диаметр

колокола 1,5—2 м и высота 1,8—2 м. Для сбора живых москитов из небольших нор используют ловушки различной конструкции. Одна из простейших ловушек представляет собой усеченный конус из картона. Конусом накрывают отверстие норы, а на узкий отрезанный его конец надевают садок из мельничного газа. Конусы расставляют перед заходом солнца и снимают через 2—3 часа (время вылета москитов из нор) или, выбрав из садков москитов, оставляют, если в задачи работы входит определение «москитопродукции» изолированной норы за более продолжительный период.

Отлов москитов из пологов и ловушек, на дневках, при сборе «на себя» производят стеклянными цилиндрическими москитоловками, эксагаустерами или пробирками. Для учетов москитов и определения видового состава (но не для вирусологических сборов!) пользуются липучками, т. е. листами пергаментной или полупергаментной бумаги, намазанной касторовым маслом. Липучки развешивают в местах дневок москитов или вставляют их в отверстия нор. Для определения москитов можно воспользоваться определителем П. П. Перфильева. Москиты (См. Phlebotomidae) М. — Л., Наука, 1960 г.

Д. ДОСТАВКА ПАРАЗИТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА В ВИРУСОЛОГИЧЕСКУЮ ЛАБОРАТОРИЮ

Собранный в очаге паразитологический материал доставляется в вирусологическую лабораторию для дальнейшего исследования. Клещей разбирают в полевой лаборатории по видам и пересаживают во влажные камеры, снабженные этикетками. Влажные камеры помещают в жестяной пенал с плотно закрывающейся крышкой. Место соединения крышки и пенала заклеивают лейкопластырем, чтобы предотвратить расползание клещей в том случае, если камеры разобьются. Пеналы с влажными камерами упаковывают в герметически закрывающиеся контейнеры. В такой упаковке можно перевозить живых клещей на большие расстояния.

Комары или другие кровососущие двукрылые доставляются в лабораторию в замороженном виде в термоконтейнерах с сухим льдом или жидким азотом. Также можно перевозить и партии голодных клещей. Пробирки или пенициллиновые флаконы с паразитологическим материалом упаковываются в бязевые мешочки или небольшие жестяные пеналы, на которых отмечается время и место сбора. Мешки или пеналы укладывают в двухслойные полиэтиленовые па-

кеты, чтобы изолировать их от углекислоты, и помещают их в термоконтейнеры. Необходимо строго следить за состоянием температурного режима в термоконтейнерах и как можно быстрее доставить материал в вирусологическую лабораторию, не допуская размораживания.

4. Подсадные животные

Использование высокочувствительных животных, как метод исследования очагов арбовирусных инфекций, описано в основном у зарубежных авторов. В тропических странах при интенсивном ходе эпизоотического процесса чувствительные к вирусной инфекции млекопитающие и птицы служат для выявления и исследования очагов в стационарных и полустационарных условиях.

В практике отечественных вирусологов в качестве подсадных животных использовались кролики, морские свинки, сирийские хомяки, домашние свиньи, белые мыши, цыплята и птенцы нескольких видов диких птиц. Опыт показывает, что при работе в природных очагах наиболее удобны белые мыши, сирийские хомяки, а для некоторых инфекций кролики и цыплята. Общие правила состоят в том, что в известных или предполагаемых очагах укусам комаров и других кровососущих членистоногих подвергаются чувствительные животные, ранее не имевшие кантакта с инфекцией. За последующим ходом заболевания следят с помощью вирусологических и серологических проб (см. раздел 5 настоящих «Методических рекомендаций»).

Виварии и питомники поставляют беременных самок белых мышей или сирийских хомяков, которые хорошо выдерживают одно-двухдневную транспортировку при соблюдении общих правил кормления и ухода. Сосунки, родившиеся в дороге, гибнут, и родивших самок приходится выбраковывать, но отход обычно не превышает 15—20%. Привезенных самок рассаживают по 1—3 в виварные клетки любой конструкции. При необходимости можно организовать спаривание белых мышей и хомяков на месте, обязательно в хорошо изолированном от кровососов помещения. Примерные сроки появления сосунков рассчитывают, исходя из продолжительности беременности — 21 день у мышей и 16—18 — у хомяков. Надежнее всего сочетать завоз больших партий беременных самок со спариванием некоторого количества зверьков на месте. Тогда для спаривания можно использовать самок, сосунки которых погибли в дороге.

Мышей для экспозиции лучше объединять в группы по 2—3 самки с одновозрастными сосунками в одной клетке, тогда гибель одной из самок не приводит к гибели всех мышат. Самок хомяков объединять почти не удается, они поедают детенышей иногда даже при переселении в другую клетку, так что их лучше рассадить в экспозиционные клетки за несколько дней до родов.

Для экспозиции в природных условиях подбирают или изготовляют специальные клетки. Они должны иметь сетчатые стенки, через которые комары, москиты и т. д. легко проникали бы внутрь. Дверцу удобнее делать сверху. В местах экспозиции необходимо иметь приспособление для затенения и защиты от дождя. Кроме того надо предусмотреть возможность подвешивать клетку, спасая ее от собак и наземных хищников. В клетке должно быть немного сена, стружек или опилок. Доступность сосунков для кровососущих членистоногих при этом почти не снижается, а выживают они гораздо лучше. Белых мышей, кроликов и морских свинок необходимо кормить ежедневно и следить, чтобы в клетках всегда была вода. Для хомяков можно сразу «зарядить» кормушку 3—4-х дневным запасом корма и сочных овощей. Если овощи не высохнут, зверьки не нуждаются в дополнительной подкормке все время экспозиции.

В местах, где предполагается наличие очагов нескольких инфекций (сочетанные очаги), надо работать с тремя-четырьмя различными видами подсадных животных, т. к. их чувствительность к разным арбовирусам может оказаться различной. Сосунки белых мышей и хомяков наиболее чувствительны к заражению первые 3—4 дня жизни. На этот срок их и выставляют в заранее подобранных местах. При этом места экспозиции не должны быть слишком далеко от помещения, где формируются экспозиционные группы. Наш опыт показал, что гибель сосунков от случайных причин при расстановке клеток недалеко от временного вивария составляет 30%, а при перевозке на 10 км — 41%, т. е. увеличивается более, чем на 10%. Прошедших экспозицию зверьков содержат в помещении недоступном для кровососущих членистоногих, иначе будет нарушена чистота эксперимента. Заболевших сосунков используют для выделения вируса. Следует обращать внимание даже на отстающих в росте молодых, т. к. это тоже может быть симптомом болезни. Внешне здоровых детенышей и экспонированных с ними самок выдерживают не менее 2-х недель (срок, необходимый для образования антител), а затем берут у них кровь для серологического исследования.

Крупных животных, таких как кролики и морские свинки, держат в открытых клетках или вольерах все время наблюдений, а кровь для вирусологического и серологического исследования берут с необходимой периодичностью, например, раз в 7 или 10 дней. Серологическое обследование подобных проб крови позволяют выявить динамику эпизоотического процесса. Помимо вышеперечисленных, можно использовать любых других хорошо размножающихся в лаборатории животных, чувствительных к заражению вирусами. Так, по-видимому пригодными могут оказаться разводимые в лабораториях большие и краснохвостые песчанки, другие виды хомяков, пеструшки и т. д. Для некоторых инфекций можно с успехом использовать инкубаторских цыплят, которых можно содержать как в вольерах, так и в небольших клетках.

В некоторых случаях в качестве подсадных используют молодых домашних животных, например, свиней при работе с японским энцефалитом. Здесь также исследование полученных с определенной периодичностью проб крови дает представление о ходе эпизоотического процесса.

5. Сбор материала для вирусологического и серологического исследования

Выделение вирусов производится из членистоногих-переносчиков и из материала, собранного от людей, домашних и диких позвоночных, обитающих в пределах обследуемой территории. Методы получения материала из разных источников имеют некоторые специфические особенности.

А. ОТ ЛЮДЕЙ

С целью выделения вируса от больных людей проводят сбор крови, спинно-мозговой жидкости, а у лихорадящих больных также и смывов из носоглотки. При этом материал следует брать как можно раньше, в самом начале заболевания, предпочтительнее в период высокой температуры. В случае летального исхода должен быть использован секционный материал — кусочки мозга (желательно обследовать каждый отдел мозга раздельно), печени, легких, селезенки, почек. У обследуемых больных кровь берут стерильно из локтевой вены в количестве 10—20 мл у взрослых и 5—10 мл у детей. Спинномозговая жидкость берется посредством спинномозговой пункции квалифицированным специалистом. Полученный материал помещают в пенициллиновые

или инсулиновые флаконы, этикетируют и ставят в контейнеры со льдом (термосы) для транспортировки в стационарную вирусологическую лабораторию (см. «Хранение и транспортировка материала»). Для серологического обследования кровь берут таким же способом Кровь из шприца со снятой иглой переносят в пробирку. Свернувшийся в пробирке через 15—20 мин. при комнатной температуре сгусток крови отделяют от стенок пастеровской пипеткой. Сгусток с некоторым количеством сыворотки может быть использован для вирусологического исследования. Для лучшего образования сгустков пробирки ставят в термостат с температурой 37°С на 30 мин, а затем оставляют на ночь при +4°С для отделения сыворотки. На следующий день сыворотку отсасывают стерильной пастеровской пипеткой, запаивают в ампулы или помещают в стерильные инсулиновые флаконы с резиновыми пробками, снабженные соответствующими этикетками. При недостатке времени допускается центрифугирование крови без предварительного отстаивания. При необходимости длительного хранения и повторных исследований сыворотки лучшим способом является замораживание при —20°С или лиофилизация. Поскольку повторное замораживание и оттаивание разрушает антитела, рекомендуется разлить сыворотку на несколько небольших порций для одноразового использования каждой из них.

Для диагностических целей исследуют парные сыворотки крови больных, взятой на 1—3 и 14—20 дни от начала болезни. Кровь направляют со следующими сопроводительными данными:

а) лечебное учреждение, направившее кровь;

б) фамилия, имя, возраст и профессия больного;

в) клинический диагноз, наличие лихорадки;

г) день болезни;

д) местность, где проживал или которую посетил больной в течение месяца до заболевания.

Парные сыворотки крови исследуют с антигенами вирусов, которые могут быть предположительными возбудителями заболевания. Ориентировочными данными являются клинический диагноз и эпидемиологическая ситуация в данной местности. Показателем перенесенного заболевания является прирост титра антител более, чем в 4 раза Следует отметить, что в диагностических целях наибольшее значение имеет реакция связывания комплемента.

Б. ОТ ДОМАШНИХ ЖИВОТНЫХ

В районе, подлежащем обследованию, следует связаться с местной ветеринарной службой, чтобы предварительно выяснить ряд вопросов о наличии, численности и состоянии здоровья домашнего скота и птиц. Получаются сведения: 1) о видовом составе домашних животных и возрастном составе их стад, 2) о распределении их по хозяйствам и населенным пунктам, 3) о наличии эпизоотий и единичных случаев заболеваний в разных пунктах, 4) о проводившихся вакцинациях и т. п. Работники ветеринарной службы могут оказать существенную помощь при взятии проб для вирусологического и серологического исследования.

При наличии заболеваний с подозрением на арбовирусную этиологию необходимо собрать материал для вирусологического исследования. У больных животных берут кровь шприцем стерильно из яремной вены (у свиней можно брать из передней полой вены) в количестве около 20 мл Небольшое количество крови (2 мл) можно взять из ушной или хвостовой вены. У павших животных берут кусочки тканей внутренних органов (мозг, печень, почки, селезенка, легкие).

Для серологического исследования собирают серии сывороток крови от животных из разных хозяйств и с территорий, различающихся по природным условиям. Методы сбора крови от животных аналогичны указанным для взятия проб от людей. В ряде случаев можно использовать материалы, собранные местными ветеринарами (в том числе сыворотку крови для серологических исследований).

В. ОТ ДИКИХ ПОЗВОНОЧНЫХ ЖИВОТНЫХ

При поисках арбовирусов в природе необходимо проведение вирусологических и серологических исследований материалов от диких позвоночных животных. Пробы крови для вирусологического и серологического исследования берут как правило, у животных, добытых живыми, или у только что отстреленных.

Крупных и средних млекопитающих на короткий период взятия пробы желательно усыплять с помощью эфира, CO_2 или специального усыпляющего заряда охотничьего ружья. В противном случае зверя крепко фиксирует в неподвижном состоянии группа помощников. Кровь берется шприцем из шейной яремной вены или из сердца в количестве 4 мл и более.

У мелких млекопитающих — грызунов, насекомоядных и летучих мышей — кровь берется из сердца. В случае, если

удалось получить не менее 2—4 мл крови, она обрабатывается и упаковывается так же, как и образцы от людей и более крупных животных. Если же крови получено очень мало (от 0,1 до 1,9 мл) можно рекомендовать пользоваться во время взятия пробы стандартным разбавителем. Последний составляется из 25% нормальной кроличьей сыворотки, 70% фосфатного буферного раствора pH 7,6—7,8, 1% пенициллина и 4% стрептомицина. Кровь, полученная в количестве 0,1—0,4 мл, смешивается с разбавителем в пропорции 1 4, а в количестве 0,5—1,9 мл — 1 : 1 и в дальнейшем с успехом поддается исследованию. Небольшое количество крови (0,1—0,2 мл) можно ежедневно брать у одной особи из орбитального синуса. Для этого у мелкого зверька нажатием большого пальца под глазом вызывается напряжение кровеносных сосудов (глаз несколько «вытаращивается»). Затем небольшой стерильной пипеткой производят разрыв капилляров в наружном углу глазницы, надавливая на косточку. При этом в пипетку набирается небольшое количество крови, разводимой 4 частями рабавителя.

У птиц крупного и среднего размера кровь можно брать из вены крыла, из шейной вены или из сердца, а у мелких воробьиных птиц — преимущественно из сердца. Малое количество крови тоже можно смешивать с разбавителем. Хорошим объектом для взятия крови служат подросшие птенцы перед вылетом их из гнезда (так называемые «слетки»).

У млекопитающих и птиц, погибших при взятии крови, у свежих, только что добытых, мертвых экземпляров или, что особенно важно, у особей с признаками заболевания, берут пробы из тканей внутренних органов (как и у трупов домашних животных). У крупных животных образцы органов можно брать и исследовать раздельно, а у мелких зверьков и птиц целесообразно подвергать исследованию смешанный пул из органов от одной особи.

У пресмыкающихся кровь берется преимущественно из сердца У змей его расположение обнаруживается по легкой пульсации в районе 1/4 общей длины тела от головы и нащупывается иглой шприца. У ящериц сердце находится слева сейчас же позади грудного пояса. У черепах сердце может быть прощупано иглой, введенной слева от шеи, или через отверстие, просверленное в пластроне. Кровь берут медленно, пока не наберется нужное количество или не прекратится ее поступление в шприц. При исследовании материалов от рептилий следует учесть, что эритроциты черепах

и змей токсичны для сосунков белых мышей и для тканевых культур. Токсичность не пропадает иногда даже после центрифугирования. Это может осложнить опыты по выделению и идентификации вируса.

6. Хранение и транспортировка материалов

Большая часть арбовирусов чувствительна к теплу и к колебаниям температуры, следовательно для сохранения материала очень важны быстрое охлаждение и постоянная температура. Поэтому, материалы, взятые для вирусологического исследования (кровь и кусочки органов), помещенные в стерильную посуду и этикетированные, сразу же замораживаются при низкой температуре (оптимальное — 70—120 градусов С). Такая температура достигается в специальных электрических холодильниках, а в полевых условиях при отсутствии холодильных установок может быть обеспечена в специальных тремоконтейнерах с сухим льдом (ТК-3), а еще лучше в термоконтейнерах с жидким азотом. Образцы помещают в металлические или пластмассовые пеналы и опускают в камеру контейнера или баллона. Здесь же образцы хранятся и транспортируются до стационарной вирусологической лаборатории, где исследуются или хранятся в электрохолодильниках. Одной заправки сухого льда хватает на неделю и более, а жидкого азота — на срок до одного месяца. При отсутствии указанных средств для сохранения образцов на небольшой срок могут быть использованы широкогорлые пищевые термосы со смесью льда и поваренной соли. И в самом крайнем случае пробы органов и тканей можно поместить в 20 объемов 50% глицерина в щелочном буфере при +4°С. Следует учитывать, что условием для успешного сохранения жизнеспособности вирусов является щелочная среда (pH 7,4—7,6). Лучшему сохранению вируса способствует также добавление сывороточного белка (2%) альбумина, 25% кроличьей сыворотки). При замораживании и хранении материалов на сухом льду следует учесть, что углекислота может повредить вирусу посредством изменения pH среды. Поэтому образцы надо помещать в герметическую упаковку, например, в плотно завязанные двухслойные полиэтиленовые пакеты.

Сыворотки крови, взятые для серологического исследования, сохраняются при температуре +4—6°С. Если транспортировка длится не более 1—2 дней, то допустимо содержание сывороток при температуре внешней среды.

При необходимости длительного хранения и повторных исследований взятых сывороток, лучшим способом является

замораживание при —20—50°С. При этом рекомендуется разлить сыворотки на несколько небольших порций для одноразового использования каждой из них без повторного замораживания и оттаивания.

7. Соблюдение правил безопасности при работе в очаге

При работе в поле, в природных очагах инфекции весь личный состав группы исследователей должен соблюдать необходимую технику безопасности, предусмотренную инструкцией о противоэпидемическом режиме работы утвержденной МЗ СССР 31/XII-1974 г. В районах, где возможна встреча с любой другой особо опасной инфекцией, необходимо также руководствоваться соответствующими инструкциями по технике безопасности при работе с этими возбудителями.

Для проведения сбора материала необходимо иметь разрешение Главного Санитарно-эпидемиологического Управления Министерства здравоохранения союзной республики, на территории которой проводятся исследования.

Исследователи, работающие в природных очагах арбовирусных инфекций, должны соблюдать меры по предупреждению покусов переносчиками и контактов с естественными хозяевами вирусов. В помещениях проводят мероприятия по дезинсекции и дератизации. Окна завешивают тюлевыми или марлевыми занавесками, предохраняющими от проникновения летающих кровососущих насекомых. Постели во время отдыха накрывают пологами. При работе в поле используют индивидуальные меры защиты, такие как репелленты, сетки Павловского, специальные защитные комбинезоны. Регулярно проводят осмотры и взаимоосмотры для снятия наползающих клещей. Перед выездом в поле заблаговременно проводится курс вакцинации сотрудников от инфекции, контакт с которой вероятен в районе исследований. В процессе лабораторной обработки материалов принимаются меры по предупреждению заражения от материала, собранного в природном очаге. При сборе органов больных животных для вирусологического исследования вскрытие их должно проводиться с соблюдением правил безопасности на специально оборудованном рабочем месте в двух халатах, маске, перчатках и защитных очках. Вскрытые трупы животных погружают на сутки в 10% раствор лизола, а затем сжигают. Инструменты и рабочее место дезинфицируют. Не следует работать с двумя или несколькими образцами подряд, не проводя дезинфекции, чтобы не допустить контаминации,

могущей исказить результаты исследования. Пробирки или камеры с живыми клещами помещают в специальные металлические контейнеры с гнездами и плотно закрывающейся крышкой, смазанной по краям вазелином. Контейнер ставится в кювету, края которой также смазаны вазелином, или в контейнер большого размера также с плотно закрывающейся крышкой, по краям смазанной вазелином Если же клещей и других членистоногих переносчиков не сохраняют в живом виде, то для транспортировки разобранный по видам и партиям материал, также как и органы животных, замораживают в контейнерах с сухим льдом или жидким азотом и в таком виде доставляют в стационарную вирусологическую лабораторию. Все манипуляции с материалом при заправке охлаждающим веществом и перекладывание контейнеров и пеналов призводится в защитной спецодежде с соблюдением правил безопасности. С целью предупреждения возможности разноса арбовирусов на новые территории и для профилактики контаминации категорически запрещается завозить в лаборатории арбовирусы, ранее не выделенные в данной местности.

8. Общие принципы вирусологического и серологического обследования собранного материала

Собранный для вирусологического и серологического исследования материал этикетируют (с указанием даты сбора и № пробы) и регистрируют в журнале с указанием подробных сведений о собранном материале (дата, место, способ, и условия сбора, вид, возраст и пол животного, перечень взятых органов и т. п.).

Во время проведения работы по выделению вирусов нельзя работать с музейными штаммами вирусов, чтобы избежать лабораторной контаминации собранного материала этими штаммами.

Для выделения вирусов используют 1—2 дневных сосунков белых мышей, т. к. они являютоя наиболее чувствительной системой практически ко всем арбовирусам. Мышей-сосунков заражают в мозг по 0,01 мл 10% суспензии исследуемого материала. В течение 3 недель за мышами ведут ежедневное наблюдение. Заболевших мышей вскрывают, используя их мозг для последующих пассажей Слепые пассажи проводить не следует, т. к. при этом повышается возможность выделения спонтанных мышиных вирусов. Выделенные штаммы вирусов после 1 пассажа подвергают лиофильной сушке, готовят иммунные сыворотки к ним и про-

водят их идентификацию с набором сывороток и вирусов, имеющихся в лаборатории, в реакциях связывания комплемента, торможения гемагглютинации и нейтрализации.

Для приготовления суспензии из тканей органов позвоночных их тщательно растирают пестиком с кварцевым песком в охлажденных фарфоровых ступках или измельчают в гомогенизаторе с охлаждением (для освобождения вируса из клеток). После этого добавляет 10-кратное количество буферного раствора Хенкса pH 7,4—7,6 с антибиотиками (по 100 единиц каномицина и тетрациклина на 1 мл) и 10—25% нормальной кроличьей сыворотки или 0,75—2% бычьего альбумина. Приготовленную суспензию центрифугируют при 4°С в течение 10 мин. при 1500—2000 оборотов в минуту. Надосадочную жидкость используют для заражения.

Членистоногих для вирусологического обследования сортируют по видам и подбирают в пулы (по половым и возрастным признакам). Эти операции нужно проводить при низкой температуре (не выше +4°). До приготовления суспензии членистоногих промывают один раз спиртом и 2—3 раза средой с антибиотиками (по 500—1000 ед. на 1 мл). В дальнейшем суспензию готовят также, как из тканей органов. На 50—200 комаров и 10—50 клещей (имаго) добавляют 2—4 мл буферного раствора pH 7,4—7,8 с антибиотиками и сывороткой.

Суспензии, использованные для заражения мышей-сосунков, замораживают при температуре не выше —70°С и сохраняют при этой температуре для реизоляции (повторного выделения). Реизоляция является подтверждением выделения вируса из исходного материала.

Серологическое исследование собранных сывороток проводят в реакциях связывания комплемента (в пямой и непрямой), торможения гемагглютинации, с имеющимся в лаборатории набором антигенов вируса. При оценке результатов серологической реакции следует учитывать значительные внутригрупповые связи ряда арбовирусов в РТГА, РСК, что вызывает в ряде случаев необходимость проверки результатов в реакции нейтрализации в культуре ткани или на мышах.

II. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА АРБОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

1. РЕАКЦИИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ И ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА) является ценным методом лабораторной диагностики арбовирусных инфекций и изучения иммуноструктуры населения природных очагов. Однако оценка результатов и сопоставимость данных отдельных исследователей возможны лишь при использовании единой методики постановки реакции. Кроме того, для получения достоверных результатов требуется точное техническое выполнение и тщательная подготовка всех ингредиентов реакции Рекомендуемый в настоящей инструкции метод в основном соответствует оригинальной технике Кларк и Казалса с внесением рациональных модификаций и дополнений, апробированных советскими и зарубежными специалистами.

А. ИНГРЕДИЕНТЫ РЕАКЦИИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ И ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Большинство известных арбовирусов обладает способностью агглютинировать эритроциты гусей. Феномен гемагглютинации проявляется в свободной от ингибиторов среде при определенном солевом составе и pH буферных растворов и при благоприятной температуре. Ингибиторы гемагглютинации имеют, в основном, липопротеиновую природу. Они содержатся в экстрактах органов животных и куриных эмбрионов, в сыворотках крови, образуются в результате метаболизма при размножении вирусов в тканевых культурах. Поэтому антигены и сыворотки в первую очередь должны быть избавлены от присутствия ингибиторов С учетом определенных требований подготавливают и другие ингредиенты реакции.

Основные и вспомогательные ингредиенты РГА и РТГА:

1. Антигены
2. Сыворотки
3. Эритроциты гусей
4. Боратный буферный раствор pH 9,0
5. Альбумино-боратный буферный раствор pH 9,0

6. Фосфатные буферные растворы pH 6,0 и 7,0
7. 25% взвесь каолина на боратном буферном растворе pH 9,0
8. Раствор Альзовера
9. Декстрозо-желатино-вероналовый буфер.

Для приготовления всех ингредиентов реакции необходимо применять только химически чистые реактивы (хч и чда). Измерение pH должно проводиться с помощью pH-метра (например ЛПУ-01)

1) Антигены

Источником получения гемагглютинирующих (ГА) антигенов являются органы и сыворотки крови зараженных мышей, инфицированные тканевые культуры Многие арбовирусы являются возбудителями опасных для человека заболеваний, поэтому в широкой практике могут использоваться лишь неинфекционные антигены. Пользование инфекционными антигенами таит и другую опасность — возможность занесения инфекции, ранее не свойственной данной местности, и создание нового природного очага. Для массовых серологических исследований удобны стандартные неинфекционные диагностикумы, которые обеспечивают однотипность условий реакции и полную безопасность работы

При отсутствии нужных для работы стандартных антигенов прибегают к приготовлению антигенов в лаборатории. В литературе описан ряд способов приготовления антигенов применительно к разным вирусам. Ниже будут приведены некоторые методы получения ГА антигенов из мозга новорожденных мышей

Все работы по изготовлению антигенов и постановка реакций с инфекционными антигенами должны проводиться при соблюдении режима работы с особоопасными инфекциями, предусмотренного соответствующими инструкциями.

а) Материал для получения антигенов

Мышей заражают в мозг по 0,02 мл вирусом в разведении 10^{-2}—10^{-3}. Возраст мышей для заражения подбирают в зависимости от их восприимчивости к вирусу и от длительности инкубационного периода инфекции. Обычно используют мышей 4—6-дневного возраста при инкубации 1—2 дня, 3—4-дневных — при инкубации 3—4 дня и 1—2-дневных при более длительном инкубационном периоде. Заболевших мышей обескровливают, разрезая ножницами грудную клетку. Затем извлекают мозг. Мозг для приготов-

ления антигена используют немедленно, а при необходимости хранения помещают при —70°С, например, в контейнеры с сухим льдом.

Из мозга сосунков мышей готовят 10 или 20% суспензию на боратном буферном растворе pH 9,0—9,3 (метод щелочной экстракции) или на растворе сахарозы (метод сахарозо-ацетоновой экстракции) Весь процесс приготовления антигенов должен проводиться на холоду. Растворы, реактивы и посуду для приготовления антигенов предварительно охлаждают и в течение всей работы держат на льду. Мозг растирают в фарфоровой ступке очень тщательно, чтобы получить как можно более тонкую взвесь. Заключительное центрифугирование антигена при 10 000 об/мин. также проводится с охлаждением.

б) Методы получения гемагглютинирующих антигенов

Щелочная экстракция. 10 или 20% суспензию мозга сосунков-мышей на боратном буферном растворе центрифугируют в течение 1 часа при 10 000 об/мин. Надосадочная жидкость является антигеном.

Обработка фреоном. 10% суспензию мозга сосунков мышей на боратном буферном растворе соединяют с равным объемом фреона 113 и встряхивают 10—15 минут. Для лучшего перемешивания можно использовать стеклянные бусы. Затем смесь центрифугируют в течение одного часа при 10 000 об/мин. Верхний слой надосадочной жидкости является антигеном.

Обработка протаминсульфатом. Протаминсульфатом дополнительно обрабатывают антиген, приготовленный методом щелочной экстракции. Раствор протаминсульфата готовят непосредственно перед употреблением на физиологическом растворе из расчета 50 мг/мл для 20% суспензии мозга и 25 мг/мл для 10% суспензии. К антигену добавляют раствор протаминсульфата соответствующей концентрации в количестве 0,1 объема, (т. е. на 9 мл суспензии добавляется 1 мл раствора протаминсульфата). Смесь помешивают на 30 минут в ледяную баню, периодически помешивают, а затем центрифугируют 15 минут при 2 500 об/мин. Прозрачная надосадочная жидкость является антигеном. Следует помнить, что протаминсульфат может вызывать неспецифическую гемагглютинацию, которая проявляется при pH 6,0—6,4 и 4°С.

Сахарозо-ацетоновая экстракция. Для работы используют только химически чистый ацетон. Ацетон более низкой степени чистоты следует перегонять при 56°С. Ацетон хра-

нят непременно в темной стеклянной посуде. Для приготовления антигена ацетон охлаждают до —15°С. Раствор сахарозы 8,5% (ГОСТ 5833-54) готовят непосредственно перед употреблением. pH этого раствора должен быть не ниже 7,0.

20% суспензию мозга сосунков мышей на 8,5% растворе сахарозы (на 1 мозг берется 0,4 мл раствора сахарозы) 3 раза обрабатывают ацетоном. 2 раза ацетона берут 20 объемов на 1 объем суспензии, а третий раз ацетона берут небольшое произвольное количество Каждый раз после обработки ацетоном смесь центрифугируют 10 минут при 1800 об/мин и надосадочную жидкость (ацетон) удаляют. Антиген содержится в осадке.

Обработку ацетоном производят следующим образом: первый раз в охлажденный ацетон при непрерывном перемешивании по каплям добавляют подготовленную суспензию. После тщательного встряхивания смесь центрифугируют и удаляют молочного цвета надосадочную жидкость (ацетон). Осадок имеет вид розоватой вязкой массы, плотно прилипшей к стеклу. Второй раз свежую порцию ацетона добавляют к осадку. Осадок следует разбить стеклянным или фарфоровым пестиком до образования равномерной взвеси. Экстракция ацетоном проводится в ледяной ванне в течение часа при периодическом помешивании. После центрифугирования ацетон удаляют. Третий раз к осадку добавляют свежую порцию ацетона в небольшом произвольном количестве. Если обработка проводилась в нескольких центрифужных стаканах, то следует собрать осадок в один центрифужный стакан, все обмыв небольшим количеством ацетона. Смесь хорошо перемешивают, центрифугируют, удаляют ацетон, а осадок высушивают под невысоким вакуумом до превращения осадка в сухой рассыпчатый порошок.

В связи с тем, что после обработки ацетоном антиген сохраняет инфекционные свойства, отсасываемый воздух пропускают через сосуд с дезинфицирующим раствором. Для растворения осадка добавляют боратный буферный раствор pH 9,0 до объема первоначальной суспензии мозга мышей. (0,4 мл раствора на 1 мозг сосунка). Взвешенный в боратном буферном растворе осадок оставляют на 18—20 часов при 4°С для экстракции, после чего центрифугируют на холоде в течение 1 часа при 10 000 об/мин. Антигеном является надосадочная жидкость.

2) Подготовка сывороток крови для РТГА

Обработка сывороток крови заключается в удалении ингибиторов гемагглютинации и нормальных агглютининов гусиных эритроцитов. Используют, в основном, два метода

удаления ингибиторов: адсорбцию каолином и экстракцию ацетоном. Оба способа дают практически одинаковые результаты при обработке сывороток крови людей, мышей, морских свинок, кроликов. При работе с сыворотками птиц и при исследовании трупной крови любого вида животных следует пользоваться ацетоновой экстракцией. Сыворотки крови для РТГА нельзя прогревать, т. к. в результате нагревания выявляются скрытые ингибиторы, к которым особенно чувствительны арбовирусы группы А. Обработку сывороток удобно проводить накануне опыта. Обработанные сыворотки обычно пригодны для использования в течение нескольких дней, если хранятся при температуре 2—4°С.

а) Адсорбция каолином

Цельную сыворотку разводят боратным буфером pH 9,0 в соотношении 1 объем сыворотки и 4 объема буфера (1 : 5) и добавляют равное количество 25% взвеси каолина. Смесь встряхивают в течение 20 минут при комнатной температуре, затем отделяют каолин центрифугированием 30 минут при 2 500 об/мин. Надосадочная жидкость представляет собой сыворотку в разведении 1 : 10, свободную от ингибиторов.

б) Экстракция ацетоном

Сыворотку разводят 1 : 10 физиологическим раствором и охлаждают в ледяной ванне. Затем добавляют охлажденный ацетон из расчета 12 объемов ацетона на 1 объем разведенной сыворотки. Экстракцию проводят в ледяной ванне 5 минут при периодическом встряхивании. Образовавшийся преципитат осаждают центрифугированием 5 минут при 2 500 об/мин., а ацетон удаляют. Обработку ацетоном подобным образом повторяют еще дважды, каждый раз используя свежую порцию ацетона в таком же объеме, что и в первый раз. Осадок высушивают с помощью слабого вакуума и растворяют боратным буфером pH 9,0 до исходного объема, эквивалентного разведению сыворотки 1 : 10. Если количество обрабатываемой сыворотки меньше, чем 0,2 мл, то такую сыворотку следует разводить на 0,4% растворе альбумина на физиологическом растворе. (на 1 объем сыворотки — 9 объемов 0,4% раствора альбумина на физиологическом растворе). В противном случае образуется слишком малое количество преципитата, что может привести к большой потере антител.

в) Удаление нормальных агглютининов гусиных эритроцитов

После удаления ингибиторов сыворотку охлаждают, затем на каждые 5 мл разведенной сыворотки добавляют

0,1 мл осадка гусиных эритроцитов. Адсорбция продолжается 20 минут в ледяной ванне при периодическом встряхивании. Эритроциты удаляют центрифугированием 10 минут при 1 500 об/мин.

3) Получение и подготовка эритроцитов

а) Взятие крови, обработка и хранение эритроцитов

Источником получения эритроцитов являются гуси-самцы, поскольку отмечено, что у самок в период яйцекладки поверхностные свойства эритроцитов и их способность агглютинироваться меняется. У гуся-самца из подкрыльцовой вены берут 8 мл крови в 10 мл шприц, содержащий 2 мл охлажденного раствора Альзовера. Кровь из шприца переносят в колбу с охлажденным раствором декстрозо-желатино-вероналового буфера (ДЖВБ), помещенную в лед. На 1 часть крови берут 2,5 части ДЖВБ. При переливании крови из шприца в колбу последнюю слегка встряхивают, чтобы перемешать кровь и антикоагулирующий раствор. Осаждают эритроциты центрифугированием и удаляют надосадочную жидкость. Эритроциты отмывают 3 раза ДЖВБ, объем которого должен быть в 3 раза больше исходного объема крови. Центрифугируют по 10—15 минут при 1 500—1 800 об/мин.

Чтобы получить осадок стандартной плотности, последнее центрифугирование проводят в малых конических центрифужных пробирках в течение 10 минут при 2 000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляют и из осадка готовят 10% суспензию в ДЖВБ. Взятие крови и отмывание эритроцитов, т. е. кратковременные манипуляции, можно проводить в обычной стеклянной посуде; хранение эритроцитов осуществляется в широкодонных колбах из нейтрального стекла, которые моют так же, как для химических работ. Колбы закрывают ватной или корковой пробкой. Толщина слоя суспензии не должна превышать 3 см. Из этой основной суспензии готовится взвесь эритроцитов в рабочем разведении.

Для микрометода в реакции используют 0,4% взвесь эритроцитов в фосфатном буфере соответствующего pH. Для этого на 10 мл фосфатного буфера заданного pH берут 0,4 мл 10% суспензии эритроцитов.

Для макрометода в реакции используют 0,25% взвесь эритроцитов в фосфатном буфере соответствующего pH, которую готовят также из 10% суспензии эритроцитов в ДЖВБ. В этом случае на 10 мл фосфатного буфера берут 0,25 мл основной 10% суспензии.

4) Буферные растворы

а) Боратный буферный раствор pH 9,0 (ББ)

Боратный буферный раствор pH 9,0 используют для разведения антигенов и сывороток. Для приготовления используют растворы NaCl, H_3BO_3 и NaOH. В таблице 1 дан перечень соединений, их ГОСТ-ов, указаны концентрации растворов и навески для этих составляющих растворов. Реактивы следует хранить в плотно закрытых стеклянных банках.

Таблица 1

Характеристики составляющих растворов боратного буфера

Концентрация растворов	Химическая формула	ГОСТ	Молекул. вес	Навеска в граммах для получения 1 л раствора
1,5 М	NaCl	4223-48	58,5	87,7
0,5 М	H_3BO_3	СТ27/1830	61,8	30,9
1,0 М	NaOH	4328-48	40,0	40,0

NaCl и NaOH легко растворяются в воде комнатной температуры, а борная кислота только в горячей воде, поэтому для получения 0,5 М раствора борной кислоты навеску (30,9 г) растворяют в 700 мл горячей дистиллированной воды. Затем раствор охлаждают до комнатной температуры и доводят объем раствора до 1 литра.

Чтобы получить ББ следует слить 80 мл 1,5 М NaCl, 100 мл 0,5 М H_3BO_3, 24 мл 1,0 М NaOH и довести дистиллированной водой общий объем до 1 литра.

Потенциометром измеряют pH полученного раствора и в случае надобности доводят кислым (H_3BO_3) или щелочным (NaOH) компонентом до pH 9,0. Хранят ББ при +4—+6°С.

б) 0,4% альбумино-боратный буферный раствор pH 9,0 (АББ)

Используют альбумин из бычьей крови фирмы Дифко фракция V или эквивалентный препарат. АББ готовят в два этапа. Сначала получают 4% раствор альбумина. Для этого навеску сухого альбумина (0,4 г альбумина на каждые 10 мл ББ) соединяют с ББ и тщательно перемешивают, осторожно пипетируя, чтобы не образовалась пена. Для полного растворения и стабилизации 4% раствор альбумина оставляют при 4°С на сутки. При растворении альбумина pH раствора

меняется в кислую сторону. Через 24 часа pH раствора измеряют потенциометром и доводят 1 М раствором NaOH до 9,0.

0,4% АББ получают при соединении 4% раствора альбумина pH 9,0 с ББ в соотношении 1 : 10 (1 часть 4% раствора альбумина и 9 частей ББ).

АББ должен иметь pH 9,0. Его хранят при 4°С. Раствор может использоваться до двух недель, если он остается прозрачным. Для более длительного хранения расфасованный небольшими порциями АББ замораживают при —20°С. Можно также стерилизовать АББ прогреванием на протяжении 3-х дней при 56°С по 30 минут. Помутнение свидетельствует о его непригодности.

в) Фосфатные буферные (ФБ) растворы

Фосфатные буферные растворы pH от 6,0 до 7,0 используют для приготовления взвеси гусиных эритроцитов. Показатели pH 6,0 и 7,0 этих растворов, как и растворов промежуточных pH, являются условными, т. к. достигают указанных значений pH только при соединении с равным объемом ББ. Для приготовления ФБ используют следующие составляющие их растворы, указанные в таблице 2.

Таблица 2

Характеристика составляющих растворов фосфатных буферов

Концентрация раствора	Химическая формула	ГОСТ	Молекул. вес	Навеска в граммах для получения 1 л раствора
0,5 М	$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	4172-48	358,0	179,0
1,0 М	$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	245-41	156,0	156,0
1,5 М	NaCl	4223-48	58,5	87,7

Чтобы получить ФБ pH 6,0, нужно соединить составляющие растворы в следующем соотношении: 100 мл 1,5 М NaCl, 32 мл 0,5 М Na_2HPO_4 и 184 мл 1 М NaH_2PO_4 и довести дистиллированной водой общий объем до 1 литра. Для получения ФБ pH 7,0 берут 100 мл 1,5 М NaCl, 240 мл 0,5 М Na_2HPO_4 и 80 мл 1 М NaH_2PO_4 и доводят дистиллированной водой общий объем до 1 литра.

pH растворов определяют потенциометром после соединения ФБ с ББ в равных количествах. При несоответствии pH приготовленного раствора его доводят кислым (NaH_2PO_4)

или щелочным (Na_2HPO_4) компонентом до необходимого уровня. ФБ промежуточных pH от 6,0 до 7,0 получают из ФБ pH 6,0 и 7,0, соединяя их в определенных соотношениях. В таблице дана схема приготовления ФБ с условными значениями pH от 6,0 до 7,0.

Таблица 3

Схема приготовления фосфатных буферов с pH от 6,0 до 7,0

ФБ требуемого pH	Исходные ФБ	
	pH 6,0	pH 7,0
6,0	10 частей	—
6,1	9 »	1 часть
6,2	8	2
6,3	7	3
6,4	6	4
6,5	5	5
6,6	4	6
6,7	3	7
6,8	2	8
6,9	1	9
7,0	—	10

Растворы хранят при температуре 4—6°С.

г) 25% взвесь каолина на боратном буферном растворе pH 9,0

К 100 мл ББ добавляют при постоянном помешивании 25,0 г каолина. Полученную массу фильтруют через двойной марлевый фильтр. Взвесь хранят при 4°С. Перед использованием суспензию тщательно взбалтывают.

д) Раствор Альзовера

Раствор Альзовера используют как антикоагулирующий раствор для взятия гусиных эритроцитов.

Чтобы получить раствор Альзовера, надо растворить в 500 мл дистиллированной воды ряд соединений в указанных в таблице 4 количествах.

Таблица 4

Перечень реактивов для раствора Альзовера

Наименование	Хим формула	ГОСТ	Навеска в граммах на 500 мл воды
Декстроза (глюкоза) безводная		6038-51	10,25
Лимонная кислота	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	3652-51	0,275
Лимоннокислый натрий 3-х замещенный	$C_6H_5O_7Na_3 \cdot H_2O$	3161-57	4,0
Поваренная соль	NaCl	4223-48	2,1

Раствор стерилизуют фильтрованием через фильтр Зейтца или автоклавированием 10 минут при 110°С. Хранят при 4—6°С.

е) Декстрозо-желатино-вероналовый буферный раствор (ДЖВБ)

ДЖВБ используют для отмывания и хранения эритроцитов. Для приготовления ДЖВБ используют следующие реактивы (см. табл. 5).

Таблица 5

Перечень реактивов для ДЖВБ

Наименование	Хим. формула	ГОСТ	Навеска в граммах на 1 л раствора
Веронал	$C_8O_3N_2H_{12}$	ФІХ-56	0,58
Веронал натрия (мединал)	$C_8O_3N_2H_{11}Na$	ФІХ-57	0,38
Хлористый кальций	$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	4141-48	0,036
Сернокислый магний	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4523-48	0,12
Хлористый натрий	NaCl	4223-48	8,5
Декстроза (глюкоза)		6038-51	10,0
Желатина	медицинская		0,6

В 250 мл дистиллированной воды, подогретой до 65°С, растворяют 0,58 г веронала и 0,6 г желатины. После полного растворения в указанном порядке добавить:

1) 0,38 г веронала натрия (мединал)
2) 0,036 г $CaCl \cdot 6H_2O$
3) 0,12 г $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

4) 8,5 г NaCl

5) 10,0 г глюкозы (декстрозы)

Полученный раствор доводят до 1 литра дистиллированной водой и стерилизуют в автоклаве 10 минут при 0,7 атм. pH приготовленного раствора должен быть 7,0—7,6.

Б. ТЕХНИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ

При массовых серологических исследованиях, проводимых макрометодом, расход антигенов и сывороток очень велик, поэтому на практике все большее применение находит метод капельных реакций.

Для постановки РГА и РТГА капельным методом пользуются пластинами и капельницами из микротитратора Такачи фирмы «Метримпэкс».

Реакцию гемагглютинации и реакцию торможения гемагглютинации капельным методом ставят на пластинах из органического стекла с углублениями, объем которых равен 0,2 мл. Для реакции следует использовать пластины с U-образным дном.

Принцип постановки РГА и РТГА капельным методом остается таким же, как при макрометоде. В отличие от макрометода, при котором разведения антигенов и сывороток можно готовить на боратном буфере pH 9,0, при капельном методе аналогичные разведения готовятся только на альбумино-боратном буферном растворе pH 9,0.

РТГА и РГА капельным методом ставят в объеме 4-х капель (0,1 мл). Объем одной капли равен 0,025 мл. При макрометоде реакцию ставят в объеме 0,8 мл (табл. 6).

Таблица 6

Дозировка компонентов РГА и РТГА

	Микрометод (в каплях)		Макрометод (в мл)	
	РГА	РГА	РТГА	РТГА
Антиген	2	1	0,4	0,2
Сыворотка		1		0,2
Эритроциты	2	2	0,4	0,4
Общий объем	4	4	0,8	0,8

1) Титрование антигенов в РГА

При работе со стандартными антигенами проверяют титр антигенов в РГА при нескольких показателях pH, близких к оптимальному. Если исследования ведут с неизвестным антигеном, то устанавливают его гемагглютинирующую активность при pH от 6,0 до 7,0. Обычно реакцию ставят при 37°С, однако, работая с новым антигеном, его изучают также при 20 и 4°С и выбирают оптимальную температуру.

Гемагглютинины арбовирусов сохраняются в щелочной среде, поэтому все разведения антигена делают на АББ. Феномен гемагглютинации проявляется при определенных для каждого вируса показателях pH, которые находятся в кислой зоне. Поэтому к разведениям антигена на АББ добавляют взвесь эритроцитов в кислом ФБ, чтобы в момент контакта эритроцитов с антигенами создалась оптимальная концентрация водородных ионов.

При микрометоде разведения антигенов с коэффициентом 2 готовят во вспомогательном ряду пробирок в объеме 0,2 мл. Для этого в ряд пробирок наливают АББ по 0,2 мл. Затем в первую пробирку вносят 0,2 мл антигена, перемешивают 16—18 раз и переносят в следующую пробирку 0,2 мл. Лучше для каждого разведения пользоваться отдельной пипеткой. Если антиген заведомо высокого титра, то его начинают титровать с разведениями 1 : 10 или 1 : 100. С помощью капельницы по 2 капли каждого разведения переносят в лунки на пластинах. Использование дилуторов дает менее точные разведения ингредиентов реакции, кроме того, дилуторы царапают лунки в пластинах, что ведет к быстрому износу прибора.

Титрование антигенов капельным методом проводят в 2-х параллельных рядах лунок. К каждому разведению антигена добавляют по 2 капли свежеприготовленной 0,4% взвеси гусиных эритроцитов в ФБ заданного pH.

При макрометоде также используют доски из органического стекла, но с объемом лунок 2 мл. Аналогичным способом готовят ряд двукратных разведений антигена в объеме 0,4 мл и к каждому разведению добавляют по 0,4 мл 0,25% взвеси гусиных эритроцитов. Отдельно ставят контроль эритроцитов без антигена. Пластины осторожно встряхивают для смешивания ингредиентов.

При отсутствии специфической реакции эритроциты, оседая, имеют вид компактного осадка. Полная гемагглютинация проявляется в виде однородной пленки эритроцитов, покрывающей дно лунки. При неполной гемагглютинации пленка сочетается с более плотным осадком эритроцитов.

Условные обозначения степени гемагглютинации:

4 и 3 — различная степень интенсивности гемагглютинации (однородная пленка эритроцитов, покрывающая дно лунки).

2 — частичная гемагглютинация (однородная пленка эритроцитов на дне лунки сочетается с более плотным осадком эритроцитов).

1 — следы гемагглютинации (следы однородной пленки эритроцитов на дне лунки в сочетании с плотным осадком эритроцитов)

0 — отсутствие гемагглютинации (осевшие эритроциты имеют вид компактного осадка).

Титром антигена считают его наивысшее разведение, обнаруживающее интенсивную гемагглютинацию (3—4). Пример определения титра антигена показан в таблице 7.

Таблица 7

Образец протокола РГА

pH	Разведения антигена								
	2	4	8	16	32	64	128	256	512
6,0	4	4	4	4	4	4	4	4	0
6,2	4	4	4	4	4	4	3	2	0

Титр антигена в данном примере 1 : 256 при pH 6,0. Это значит, что 2 капли или 0,4 мл разведения 1 : 256 содержат одну гемагглютинирующую единицу (АЕ).

2) Реакция торможения гемагглютинации

В РТГА титруют сыворотку в различных разведениях при постоянной дозе (8АЕ) антигена. Микрометодом реакцию ставят в объеме 4 капель при оптимальном для каждого антигена pH и температуре, соединяя по 1 капле антигена и сыворотки с 2 каплями 0,4% взвеси эритроцитов. При макрометоде соответственно соединяют антигены и сыворотки по 0,2 мл с 0,4 мл 0,25% взвеси эритроцитов. Реакция протекает в 2 этапа. Первый этап — соединение сывороток и антигенов и контакт при 4°С в течение 18—20 часов. Второй этап — добавление эритроцитов, экспозиция 30—40 минут при 37°С и чтение результатов. С антигенами, гемагглютинирующие свойства которых при 37°С значительно снижаются, второй этап реакции ставят при 20°С.

Таким образом, для постановки реакции требуется два дня.

При диагностических исследованиях сыворотку крови, взятую в остром и реконвалесцентном периоде, титруют в одном опыте, чтобы можно было с достоверностью сопоставить титр антител в обеих пробах. При изучении иммуноструктуры населения рекомендуется поставить ориентировочный опыт с сыворотками в разведении 1 : 10 (минимальное разведение сыворотки после обработки) и при положительных результатах исследовать в серийных разведениях.

а) Титрование рабочей дозы антигена

Рабочей дозой антигена в РТГА является 8 АЕ в одной капле. Антиген титруют в РГА как указано выше. Исходя из титра антигена, готовят разведение, содержащее 16 АЕ в 2-х каплях. При соединении с сывороткой в реакции участвуют 8 АЕ. При постановке макрометодом рабочее разведение антигена должно содержать 16 АЕ в 0,4 мл. После того, как будет приготовлено рабочее разведение антигена, проводят его контрольное титрование, чтобы убедиться в правильности выбранной дозы. Для этого из рабочей дозы делают 5—6 двукратных разведений во вспомогательном ряду пробирок, переносят по две капли на доски и добавляют эритроциты. Реакцию ставят в тех же условиях, как и титрование антигена. Если доза выбрана правильно, то гемагглютинация должна быть в 4-х лунках. При завышенной дозе — более, чем в 4-х, а при заниженной — менее, чем в 4-х. (см. табл. 8).

Таблица 8

Контрольное титрование рабочей дозы антигена

Предполагаемое число доз	Варианты опыта	Номера лунок						Фактическое число доз
		1	2	3	4	5	6	
16 АЕ	1	4	4	4	3	0	0	16 АЕ
	2	4	4	2	0	0	0	8 АЕ
	3	4	4	4	4	4	0	32 АЕ

Если приготовленное рабочее разведение антигена содержит больше 16 АЕ, например 32 АЕ, следует его развести. Если наоборот, содержит меньше 16 АЕ, то нужно добавить соответствующее количество антигена. В обоих случаях сле-

дует проверить правильность рабочей дозы. Рабочую дозу антигена контролируют повторно при учете результатов РТГА, чтобы знать истинное количество доз антигена в реакции.

б) Техника постановки РТГА

При микрометоде готовят вспомогательные разведения сыворотки на АББ с коэффициентом 2. Затем с помощью капельницы, начиная с большего разведения сывороток, переносят по 1 капле в ряд лунок на пластинах. К одной капле сыворотки каждого разведения добавляют по одной капле антигена в рабочей дозе.

При макрометоде в ряду лунок на пластинах готовят двукратные разведения сывороток на АББ или ББ в объеме 0,2 мл. При исследовании одной и той же сыворотки с несколькими антигенами удобнее и точнее готовить разведения сывороток во вспомогательном ряду пробирок, а потом перенести в лунки по 0,2 мл. К 0,2 мл сыворотки каждого разведения добавляют по 0,2 мл антигена в рабочей дозе.

Пластины осторожно встряхивают и ставят в рефрижератор при 4—6°С на 18—20 часов. На следующий день добавляют по 2 капли (микрометод) или по 0,4 мл (макрометод) свежеприготовленной взвеси эритроцитов на ФБ оптимального pH. После встряхивания пластины ставят в термостат при 37°С. Реакцию читают через 30—40 минут (табл. 9)

С целью исключения неспецифических реакций, ставят следующие контроли:

1. Контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию в 3-х лунках. К 2 каплям АББ добавляют 2 капли 0,4% взвеси гусиных эритроцитов при микрометоде, и к 0,4 мл АББ добавляют 0,4 мл 0,25% взвести гусиных эритроцитов при макрометоде.

2. Контроль на полноту удаления неспецифических гемагглютининов. К одной капле обработанной сыворотки добавляют одну каплю АББ и две капли 0,4% взвеси гусиных эритроцитов (микрометод), или к 0,2 мл обработанной сыворотки добавляют 0,2 мл АББ и 0,4 мл 0,25% взвеси эритроцитов (макрометод).

Если в этих двух видах контроля отмечается агглютинация, реакцию не учитывают.

3. Контроль рабочей дозы антигена (см. стр. 92).

4. Контроль специфичности антигена с гомологичной иммунной сывороткой.

Таблица 9

Образец протокола РТГА

Сыворотки	Разведения сывороток	Результат РТГА	Контроль сыворотки на отсутствие гемагглютининов
2-го дня	10	0	0
болезни	20	3	
	40	4	
	80	4	
	160	4	
15-го дня	10	0	0
болезни	20	0	
	40	0	
	80	0	
	160	0	
	320	3	
специфическая	40	0	0
иммунная	80	0	
	160	0	
	320	0	
	640	2	
	1280	4	

Контроль рабочей дозы антигена

							Контроль эритроцитов на спонтанную агглютинацию		
№ лунок	1	2	3	4	5	6	1	2	3
2-кратные разведения антигена	4	4	4	4	0	0	0	0	0

в) Оценка результатов реакции

Титром сыворотки считают ее наивысшее разведение, которое вызывает полную задержку гемагглютинации с 8 АЕ антигена Если оказалось, что в опыте было использовано 4 или 16 единиц, то такую реакцию тоже учитывают. Тогда

титр сыворотки пересчитывают применительно к 8 АЕ: в случае 16 АЕ увеличивая вдвое, в случае 4 АЕ уменьшая вдвое. Этот прием допускается, однако, нет абсолютной зависимости титра сыворотки от дозы антигена, поэтому реакцию лучше повторить. Результаты реакции считаются положительными, если сыворотка подавляет гемагглютинацию в разведение 1 : 20 и выше; сомнительными, если титр сыворотки 1 : 10. При массовых исследованиях, когда первоначально испытываются сыворотки в разведении 1 : 10, все положительные сыворотки далее титруют.

Одной из наиболее частых ошибок при оценке РТГА являются ложноположительные результаты, связанные с присутствием в сыворотках остаточных ингибиторов, несмотря на соответствующую обработку. К сожалению, надежного контроля на полноту удаления ингибиторов пока нет. Косвенным показателем является взаимодействие сывороток одновременно с несколькими антигенами разных групп арбовирусов. Особенно благоприятные условия проявления ингибиторов создаются при использовании в реакции меньше 8 АЕ. Во всех случаях, когда возникает предположение о неспецифической реакции, опыт следует повторить, заново обработав сыворотки. Хотя обработка каолином, как правило, является достаточной, в сомнительных случаях следует использовать обработку ацетоном.

В. ПРИЛОЖЕНИЕ

1) Реактивы

Название	ГОСТ	Производящая страна, фирма	Среднегодовая потребность для 1 лаб. в граммах и литрах
1	2	3	4
NaCl	4223-48	СССР	200 г
H_2BO_3	СТ 27/1830	СССР	200 г
NaOH	4328-48	СССР	100 г
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	4172-48	СССР	1000 г
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	245-41	СССР	1000 г
Декстроза (глюкоза) безводная	6038-51	СССР	250 г
Лимонная кислота $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	3652-51	СССР	50 г

1	2	3	4
Лимоннокислый натрий 3-х замещенный $C_6H_5O_7Na_3 \cdot H_2O$	3161-57	СССР	50 г
Веронал $C_8O_3N_2H_{12}$	ФІХ-56	СССР	20 г
Веронал натрия (мединал) $C_8O_3N_2H_{11}Na$	ФІХ-57	СССР	10 г
Хлористый кальций $CaCl_2 \cdot 6H_2O$	4141-48	СССР	10 г
Сернокислый магний $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	4523-48	СССР	5 г
Желатина	медицинская	СССР	50 г
Сахароза	5833-54	СССР	100 г
Каолин		СССР	250 г
Фреон *113*		СССР	2 л
Ацетон х/ч		СССР	100 л
Протамин сульфат		ЧССР, *Спофа*	2 г
Альбумин для вирусологических и серологических исследований		СССР, БелНИИЭМ	100 г

2) Оборудование

Название	Производящая страна, фирма
1. Центрифуга ЦЛР-1	СССР, Фрунзенский завод физических приборов
2. Лабораторный pH-метр ЛПУ-01	СССР, Завод измерительных приборов, г. Гомель.
3. Аппарат для встряхивания жидкости в сосудах	СССР, Опытный завод рентгеновского оборудования «Ренток», г. Киев.
4. Микротитратор (Такачи)	Венгрия, Метримпэкс.
5. Холодильник на —20°С	СССР
6. Термостат	СССР

2. МИКРОМЕТОД РЕАКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА С АРБОВИРУСАМИ

Реакция связывания комплемента (РСК) является наиболее универсальным методом серологических исследований. РСК применяется для определения антител в диагностиче-

ских исследованиях, для определения иммунологической структуры населения и для идентификации новых изолянтов арбовирусов.

В настоящей главе излагается модифицированный метод постановки РСК. Внесенные изменения заключаются в уменьшении объема ингредиентов реакции, изменении концентрации эритроцитов и рекомендации нового раствора для разведения ингредиентов реакции — трис-буфера, применение которого обосновано нами.

Для постановки РСК используют микротитратор Такачи фирмы «Метримпэкс», состоящий из панелей с лунками, капельниц и дилюторов.

А. ИНГРЕДИЕНТЫ РЕАКЦИИ

1) Антигены
2) Сыворотки
3) Комплемент
4) Гемолитическая сыворотка
5) Эритроциты барана
6) Солевые растворы:
   а) 0,01 М трис-буфер на физиологическом растворе;
   б) вероналовый буфер;
   в) физиологический раствор.

1) АНТИГЕНЫ

В РСК микрометодом используются любые антигены, пригодные вообще для данной реакции. Приготовление антигенов из мозга мышей производят теми же методами, что и приготовление гемагглютинирующих антигенов, а именно методом боратно-солевой, фреоновой или сахарозо-ацетоновой экстракции. Сахарозо-ацетоновые антигены наиболее специфичны, высоко активны и сохраняют эти свойства при 4°С в течение нескольких месяцев. Боратно-солевые и фреоновые можно использовать в течение только 2—3 дней с момента приготовления, т. к. при более длительном хранении они становятся антикомплементарными и дают больше неспецифических реакций.

Антигены из питательной жидкости зараженных тканевых культур можно использовать только в том случае, если эта жидкость не содержит сыворотки, а вирус прошел в тканевой культуре не менее 3-х пассажей. При выборе антигенов, приготовленных из различных органов животных или тканевых культур, следует принимать во внимание, с какими сыворот-

ками они будут исследоваться. Например, при использовании сыворотки кролика, иммунизированного инфицированным мышиным мозгом, антиген из мозговой ткани может давать неспецифические реакции за счет соединения антимозговых антител с мозговым антигеном.

Если в РСК используют стандартный лиофилизированный диагностикум, его следует растворить дистиллированной водой до объема, указанного на этикетке ампулы. Диагностикум растворяют за 20—24 часа до опыта. Разведенный препарат может быть использован в течение 1—2-х недель при условии сохранения специфической активности.

В зависимости от задачи опыта, антигены применяются в одном или нескольких разведениях. Обычно в исследованиях по титрованию сывороток антиген берут в 4—8-кратном титре.

2) Сыворотки

Для диагностических целей исследуют парные сыворотки крови больных, взятые на 1—3 и 14—20 дни от начала заболевания. Кровь берут стерильно в количестве 5—7 мл, отделяют от сгустка обычным способом в асептических условиях и хранят в нативном виде (без консерванта) при 4—6° до момента исследования. При необходимости длительного хранения и повторных исследований сыворотки замораживают при —50°С, или высушивают.

Для идентификации новых изолянтов используют сыворотки иммунизированных животных. Наилучшими являются сыворотки (или асцитные жидкости — ИАЖ) мышей, иммунизированных вируссодержащим мозгом мышей-сосунков, которые практически не содержат противомозговых антител. Перед опытом сыворотки разводят солевым раствором 1 : 8 или 1 · 10 и прогревают 20 мин. в водяной бане при определенной для каждого вида температуре: сыворотки морской свинки — 56°С, сыворотки человека — 58°, сыворотки крыс и мышей — 60°, сыворотки кролика и собаки — 65°С. Сыворотки исследуют в серии двухкратных разведений.

3) Комплемент

Комплементом служит свежая сыворотка морских свинок. Стерильным шприцом из сердца берут кровь и обычным способом получают сыворотку. Для сохранения активности комплемента его консервируют, добавляя 0,05 г сернокислого натрия и 0,04 г борной кислоты на 1,0 мл комплемента. Консервированный комплемент, хранящийся при 4°С, используют в течение месяца. Пригоден также лиофилизированный комплемент.

4) Гемолитическая сыворотка

Гемолитическая сыворотка употребляется в реакции в троекратном титре. Это значит, если на этикетке обозначен титр сыворотки 1 : 1200, то троекратный титр соответствует разведению 1 : 400 (0,1 мл гемолитической сыворотки и 39,9 мл солевого раствора).

5) Эритроциты

Продуцентами эритроцитов являются взрослые здоровые бараны. Кровь у барана берут из яремной вены в стерильную стеклянную банку с бусами и для дефибринирования встряхивают в течение 10—15 минут. Дефибринированную кровь фильтруют через 3—4 слоя марли, чем освобождают ее от сгустков фибрина. Затем эритроциты осаждают центрифугированием при 2 000 об/мин. в течение 10 минут и отмывают избыточным количеством солевого раствора не менее трех раз. Из осадка эритроцитов готовят 2% взвесь на солевом растворе, который используется в реакции.

6) Гемолитическая система

Гемолитическая система представляет собой смесь равных объемов гемолитической сыворотки в троекратном титре и 2% взвеси эритроцитов барана. Гемолитическую систему готовят за 15 минут до употребления в количестве, необходимом для реакции. Смесь сенсибилизируют в термостате 15 минут.

7) Солевые растворы

Разведение ингредиентов рекомендуется производить 0,01 М трис-буфером на физиологическом растворе, который наилучшим образом обеспечивает стабильность реакции. Могут быть также использованы вероналовый буфер или физиологический раствор.

а) Трис-буферный раствор — 0,01 М Tris (hydroxymethyl) aminomethane · HCl) в 0,85% NaCl. В 1 литре физиологического раствора растворяют 1,21 г триса, pH доводят 1 N соляной кислотой до 7,3—7,4.

б) Вероналовый буфер. Готовят концентрированный основной раствор. Для его приготовления берут 85,0 г NaCl, 5,75 г веронала, 3,75 г мединала (веронал натрия), 1,68 г $MgCl \cdot 6H_2O$, 0,28 г $CaCl_2$. Все компоненты растворяют в 500,0 мл дистиллированной воды, подогретой до 35—40°С, затем общий объем доводят до 2-х литров дистиллированной водой.

Основной концентрированный раствор стоек, он не требует стерилизации, т. к. высокое содержание солей препятствует бактериальному росту. Перед опытом один объем основного раствора соединяют с 4 объемами дистиллированной воды. pH рабочего буферного раствора должен быть 7,3—7,4.

в) **Физиологический раствор.** В 1 л дистиллированной воды растворяют 8,5 г хлористого натрия. pH раствора доводят 1 N NaOH до 7,3—7,4. Раствор готовят перед употреблением.

Избрав один из солевых растворов, следует пользоваться им на всех этапах реакции (отмывание и приготовление взвеси эритроцитов, разведения антигенов, сывороток и др.).

Б. ТЕХНИКА ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ

Постановку реакции начинают с титрования комплемента. В пробирках делают ряд последовательных разведений комплемента с коэффициентом 1,2, начиная с 1 : 10 (табл. 1).

Таблица 1

Схема разведений комплемента

№№ пробирок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Трис буфер в мл	5,4	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Комплемент в мл	0,6	в остальные пробирки последовательно переносят по 5,0 мл								
Разведения	1:10	1:12	1:14,4	1:17,2	1:20,3	1:24,9	1:29,8	1:35,8	1.42,9	1:51,5

В первую пробирку наливают 5,4 мл солевого раствора и 0,6 мл комплемента. В другие пробирки разливают по 1 мл солевого раствора и далее последовательно переносят по 5 мл разведенного комплемента из первой пробирки. Затем комплемент переносят по одной капле (0,025 мл) на панели мик-

ротитратора, начиная с наибольшего разведения, добавляют по 2 капли (0,05 мл) солевого раствора и по 2 капли гемолитической системы. Легким постукиванием по панели смешивают ингредиенты и панели помещают в термостат при 37°С. Через 15 минут повторно слегка встряхивают. Реакцию учитывают через 30 минут. Разведение комплемента, дающее полный гемолиз, считают титром комплемента. Комплемент с титром менее 1 : 24,9 использовать не рекомендуется.

Антигены и сыворотки (ИАЖ), участвующие в реакции, обладают способностью адсорбировать комплемент, поэтому в опыт комплемент берут с надбавкой по отношению к титру на 30—40%, это и считается рабочей дозой комплемента. Так, при титре комплемента 1 : 42,9 (пробирка № 9, табл. 1) рабочая доза соответствует разведению комплемента в 7-ой пробирке и равна 1 : 29,8. Способность неспецифически адсорбировать комплемент у разных компонентов реакции неодинакова, поэтому в опыт берут не только рабочую дозу, а еще одно или два возрастающих разведения комплемента. Таким образом, в нашем примере низшая, средняя и высшая дозы комплемента соответствуют разведениям в пробирках №№ 7, 6 и 5. Среди трех доз комплемента всегда найдется подходящая для всех компонентов реакции.

1) Титрование антител и антигенов

Реакция протекает в объеме 0,125 мл (5 капель). Все ингредиенты разливают в лунки по 1 капле, гемолитическую систему по 2 капли в следующей последовательности: ИАЖ, антигены, комплемент (табл. 2, 3). После контакта антигенов с сыворотками (ИАЖ) в течение 18—20 часов при 4°С во все лунки добавляют по 2 капли гемолитической системы и панели переносят в термостат (37°). Реакцию учитывают после полного гемолиза во всех контрольных лунках. Контролями являются: 1) контроль антигена (1 капля антигена, 1 капля солевого раствора, 1 капля комплемента и 2 капли гемолитической системы); 2) контроль сыворотки (1 капля сыворотки, 1 капля солевого раствора, 1 капля комплемента и 2 капли гемолитической системы). Желательно в каждой реакции проверять ее специфичность, вводя в опыт специфическую для антигена иммунную сыворотку или ИАЖ.

Таблица 2

Схема соединения ингредиентов

Сыворотки	№ лунок	Диагностикум	Комплемент 1 доза	Комплемент 2 доза	Комплемент 3 доза	Трис буфер	Температура	Гемолитическая система	Температура
Сыворотка острой	*1*	*1**	*1**					*2**	
стадии болезни	2	1		1*				2	
1 : 8 по 1 капле во	3	1			1*		+4°C	2	+37°C
все лунки	4		*1*			1*		*2*	
(1)	5			1		1		2	
	6				1	1		2	
Сыворотка *стадии*	1	1	1					2	
реконвалесценции	2	1		1				2	
1 : 8 по 1 капле	3	1			1		+4°C	2	+37°C
во все лунки	4		*1*			*1*		*2*	
(1)	5			1		1		2	
	6				1	1		2	
ИАЖ по 1 капле	1	1	1					2	
во все лунки	2	1		1				2	
1 : 40	3	1			1		+4°C	2	+37°C
(2)	4		1			1		2	
	5			1		1		2	
	6				1	1		2	
Контроль *диагно-*	1	1	1			1		2	
стикума	2	1		1		1	+4°C	2	+37°C
	3	1			1	1		2	

Примечание: 1) аналогичным образом разливают сыворотку в других разведениях (1 : 16, 1 : 32, 1 : 64, 1 : 128)

2) 4-х кратный титр при титре ИАЖ 1 : 160

* число капель

На табл. 3 представлен образец протокола титрования парных сывороток реконвалесцента с антигеном клещевого энцефалита (КЭ) В данном опыте результаты следует учитывать по средней дозе комплемента (24,9), так как в низшей дозе (29,8) оказалось недостаточное количество комплемента, что привело к задержке гемолиза в контрольных лунках, при избыточной дозе комплемента (20,8) титр сыворотки оказался заниженным.

Таблица 3

Образец протокола основного опыта

Сыворотки	Разведения сывороток (обратные величины)	Антиген КЭ в рабочем разведении			Контроль сывороток		
		доза комплемента					
		20,8	24,9	29,8	20,8	24,9	29,8
Сыворотка больного в остром периоде	4	4	4	4	0	0	2
	8	0	0	2	0	0	2
	16	0	0	2	0	0	+
	32	0	0	2	0	0	0
Сыворотка реконвалесцента	4	4	4	4	0	0	2
	8	4	4	4	0	0	2
	16	4	4	4	0	0	+
	32	2	4	4	0	0	0
	64	+	4	4	0	0	0
	128	0	0	4	0	0	0
Специфическая ИАЖ к КЭ	40	3	4	4	0	0	+
	80	2	4	4	0	0	+
Контроль антигена		0	0	2			

Обозначения как в таблице 2.

Таким образом, в исследуемых сыворотках обнаружены антитела в титрах 1 : 4 и 1 64

2) Изучение антигенных связей между вирусами в РСК

Выше был изложен стандартный опыт обнаружения антител в РСК При изучении антигенных связей между вирусами обычно используют метод шахматного титрования ингредиентов, т е изучения взаимодействия разных разведений антигенов с разными разведениями гомологичной и гетерологичных сывороток Допустим, следует изучить возможную идентичность вновь выделенного вируса Б с ранее выделенным вирусом А (см таблицу 4) Определяют наивысшее разведение антигенов с гомологичной и гетерологичной сывороткой, и наоборот, наивысшие разведения сывороток с гомологичными и гетерологичными антигенами Результаты оценивают по отношению между гомологичными (Гм) и гетерологичными (Гт) титрами

Таблица 4

Шахматное титрование антигенов А и Б и иммунных сывороток (ИАЖ) к ним

Антиген	Разведение антигена (обратные показатели)	Разведение сывороток (обратные показатели)											
		А						Б					
		10	20	40	80	160	320	10	20	40	80	160	320
А	10	4	4	4	4	4	0	4	4	4	4	0	0
	20	4	4	4	4	2	0	4	4	0	0	0	0
	40	4	4	4	4	0	0	4	4	0	0	0	0
	80	4	4	4	0	0	0	4	0	0	0	0	0
	160	4	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	320	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Б	10	4	4	4	0	0	0	4	4	4	4	4	3
	20	4	4	4	0	0	0	4	4	4	4	4	2
	40	4	4	0	0	0	0	4	4	4	4	4	2
	80	0	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	0
	160	0	0	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0
	320	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Результаты приведенного выше опыта можно резюмировать так:

Антиген	Титр Гм	Гт	Гт/Гм	Отношение Сыворотки	Титр Гм	Гт	Отношение Гт/Гм
А	160	80	1/2	А	160	40	1/4
Б	160	40	1/4	Б	320	80	1/4

Если соотношение равно единице, то изучаемые антигены идентичны. В данном примере вирусы А и Б не идентичны, но имеют общие антигены.

Ценность РСК для идентификации арбовирусов заключается в том, что она может быть использована как для гемагглютинирующих, так и не гемагглютинирующих вирусов.

В. ПРИЛОЖЕНИЕ

1) Реактивы

Название	Производящая страна, фирма	Среднегодовая потребность для 1 лаборатории
1. NaCl ч. д. а. ГОСТ 4223-48	СССР	200 г.
2. Трис	ФРГ, Serva	100 г
3. HCl концентрированная ч. ГОСТ 3118-41	СССР	30 г
4. NaOH ч. д. а. ГОСТ 4328-48	СССР	30 г
5. Веронал натрия (мединал) $C_8O_3N_2H_{11}Na$ ФИХ-57	СССР	100 г
6. Хлористый магний $MgCl_2$ ч. д. а. ГОСТ 4209-48	СССР	50 г
7. Хлористый кальций $CaCl_2$ ч. д. а. ГОСТ 4141-48	СССР	50 г
8. Комплемент сухой	СССР, Московский научно-исследов. институт вакцин и сывороток им. Мечникова	100 мл
9. Гемолитическая сыворотка сухая	СССР, Московский НИИ вакцин и сывороток им Мечникова	20 мл

2) Оборудование

1. Микротитратор Такачи, «Метримпэкс», Венгрия.

2. Лабораторный pH-метр ЛПУ-01, СССР, Завод измерительных приборов, г. Гомель.

3. ИНДИКАЦИЯ АРБОВИРУСОВ В СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗАХ КОМАРОВ МЕТОДОМ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Метод флуоресцирующих антител позволяет обнаружить специфический вирусный антиген в тканях при обработке их мечеными антителами. Получающийся комплекс антиген-антитело, несущий в себе флуоресцирующий краситель, становится видимым в ультрафиолетовых лучах люминесцентного микроскопа.

Описываемый ниже метод разработан на модели экспериментального заражения комаров Aedes aegypti вирусами венесуэльского энцефаломиелита лошадей и Синдбис. Метод пригоден для исследования других видов комаров, зараженных иными арбовирусами.

В естественных условиях комары инфицируются арбовирусами *в процессе кровососания. Миновав барьер желудочно*-кишечного тракта, вирус развивается сначала в стенках кишки, затем с гемолимфой переносится в другие органы, в том числе в слюнные железы. Передача инфекции укусом зараженного комара может осуществляться только при достаточной концентрации вируса в слюнных железах. Поэтому *обнаружение вируса в слюнных железах комаров* указывает на потенциальную возможность переносить инфекцию. Индикация вируса осуществляется в цельной слюнной железе, извлеченной из тела комара, без применения техники гистологических срезов. Метод рекомендуется использовать для изучения экспериментально зараженных комаров и комаров в природных очагах при высоком уровне инфицированности переносчиков. Для индикации арбовирусов в слюнных железах комаров применяется прямой метод иммунофлуоресценции с контрастированием неспецифического свечения.

А. ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

1) Люминесцентный микроскоп.
2) Стереоскопический бинокулярный микроскоп.
3) Меченые ФИТЦ иммунные специфические глобулины.
4) Бычий альбумин, меченый родамином сульфофторидом или сульфохлоридом, для контрастирования.
5) Фиксатор.
6) Физиологический раствор для отмывания препаратов.
7) Раствор глицерина для монтирования препарата.

8) Покровные и предметные стекла.

9) Препаровальные иглы.

10) Хлороформ или эфир.

1) **Люминесцентный микроскоп** (МЛ-2 или другой модели Ордена Ленина Ленинградского оптико-механического объединения). Источником света является ртутно-кварцевая лампа СВДШ-250-3. Для получения ультрафиолетового света на пути лучей ставят фильтры ФС-1-4, СС-15-2, БС 8-2 и запирающий фильтр. Используют объективы х10 и х40.

2) **Микроскоп МБС-1 или МБС-2** с объективом х2 и окуляром х12, используют для препарирования слюнных желез.

3) **Меченые ФИТЦ иммунные специфические глобулины к арбовирусам.** Источником иммунных глобулинов служит асцитная жидкость иммунизированных арбовирусами мышей. Метод получения иммунных асцитных жидкостей (ИАЖ) изложен в разработанной Институтом вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР МРТУ-42 и лабораторном регламенте № 310-69.

Выделение и окраска ФИТЦ иммунных глобулинов из асцита производится в соответствии с МРТУ-42 и лабораторным регламентом № 451-71, разработанным Институтом вирусологии им. Д. И. Ивановского и Институтом им. Н. Ф. Гамалеи АМН СССР. На этикетке препаратов, выпускаемых в лиофилизированном виде, в ампулах, указывается красящий титр.

4) **Бычий альбумин, меченый родамином сульфофторидом или сульфохлоридом,** производится в Институте микробиологии и эпидемиологии им. Н. Ф. Гамалеи. Препарат выпускается в сухом виде. Красящий титр указывается на этикетке.

5) **Фиксатор.** Фиксацию слюнных желез проводят химически чистым ацетоном.

6) **Физиологический раствор** готовят по обычной прописи: растворяют 85 г NaCl в литре дистиллированной воды.

7) **Раствор глицерина** для монтирования препарата состоит из 1 части глицерина и 10 частей физиологического раствора.

8) **Покровные и предметные стекла должны быть гладкими** без царапин и тщательно обезжирены.

9) **Препаровальные иглы** — используются энтомологические иглы № 1.

Б. ПОДГОТОВКА ОБЪЕКТА ИССЛЕДОВАНИЯ

1) Извлечение слюнных желез

Объектом исследования являются зараженные или предположительно зараженные комары. Слюнные железы находятся в передней вентральной части грудного отдела. Слюнная железа состоит из двух боковых долей и одной средней. Боковые доли имеют передний и задний отделы, которые связаны между собой суженным участком. Парные протоки слюнных желез соединяются в общий проток, который проходит в канал, лежащий в подглоточнике. Живых комаров анестезируют хлороформом, эфиром или табачным дымом; помещают на предметное стекло и под микроскопом (МБС-1 или МБС-2) при увеличении $2 \times 12{,}5$ вскрывают препаровальными иглами. Сначала отделяют ноги и голову. Голову надо отсекать быстрым и резким движением препаровальной иглы. Тело комара подвигается к краю капли физиологического раствора, нанесенного на предметное стекло. Одну иглу накладывают поперек груди комара в направлении от крыльев к коксам средней пары ног и слегка надавливают на нее, так, чтобы из среза шеи показались слюнные железы и начало пищевода с парными придатками, покрытые с боков слоем мышц. Вторую иглу вводят аккуратно под слой мышц и проводят ее в направлении от груди к спине. Выделенные слюнные железы переносят на другое предметное стекло в маленькую каплю физиологического раствора.

2) Фиксация слюнных желез

Физиологический раствор отсасывают с помощью кусочка фильтровальной бумаги. Затем на железу наносят 1—2 капли ацетона, чтобы закрепить ее на предметном стекле, а потом погружают в ацетон на 10 минут.

В. ОКРАСКА ПРЕПАРАТОВ

1) Подготовка ингредиентов для окраски препаратов

Меченый ФИТЦ иммунный специфический глобулин разводят до указанного на этикетке объема дистиллированной водой. Рабочее разведение, соответствующее 2—4-кратной концентрации по отношению к указанному красящему титру, готовят на физиологическом растворе. Например, при титре 1 : 32 рабочее разведение препарата 1 : 8 или 1 : 16.

Бычий альбумин, меченый родамином сульфофторидом или сульфохлоридом, также растворяют в дистиллированной воде и делают на физиологическом растворе рабочее разведение в 4-х-кратной по отношению к титру концентрации.

2) Окраска препаратов

После фиксации препараты слюнных желез высушивают на воздухе в течение 1 мин. и окрашивают смесью иммуноглобулина, меченого изотиоционатом флуоресцеина, и бычьего альбумина, меченого родамином сульфофторидом, взятых в равных количествах. Препараты слюнных желез с нанесенной на них окрашивающей смесью помещают во влажную камеру. В качестве влажной камеры используют эксикатор, а также чашки Петри или просто пластмассовую коробку, на дно которой кладут смоченную фильтровальную бумагу. Влажную камеру по месту соединения крышки и коробки лучше обклеить лентой лейкопластыря, чтобы предотвратить испарение влаги. В таком виде препараты помещают в холодильник (температура +4°С) на сутки. На другой день препараты слюнных желез отмывают от окрашивающей смеси физиологическим раствором. Промывать следует под слабой проточной струей большим объемом раствора, чтобы тщательно отмыть весь несвязанный с клетками краситель. Затем на препарат наносят 10% раствор глицерина, закрывают покровным стеклом и исследуют под микроскопом.

Сначала препарат просматривают под малым увеличением с объективом х10, а затем с объективом х40. Рекомендуется исследовать препараты тотчас после приготовления, т. к. они довольно быстро обесцвечиваются. Допускается хранение не более 2—3 дней во влажной камере в темноте.

3) Оценка результатов

Слюнные железы в контрольных препаратах, полученных из незараженных комаров, окрашиваются в желто-оранжевый цвет, а в препаратах слюнных желез зараженных комаров участки клеток, содержащие вирус, окрашиваются в яркий зеленый цвет. Вариации в окраске контрольных препаратов, а также участков слюнных желез, свободных от вируса, от светло-желтого до оранжевого зависят от качества родамина и от количества его в окрашивающей смеси. Характер и локализация свечения слюнных желез на разных этапах инфекции у комаров меняется.

В ранние сроки после заражения свечение отмечается в основном в дистальных частях боковых долей слюнных же-

лез. Свечение охватывает стенки клеток и железа имеет ячеистый вид. В этот период идет активное проникновение вируса в железу и его размножение. При дальнейшем размножении и накоплении вируса в клетках слюнной железы на более поздних сроках инфекции начинает светиться содержимое клетки. В этот момент свечение имеет вид кольца или «гранулы», что зависит от количества вирусного антигена в клетке. Размножившийся в дистальных частях боковых долей слюнной железы вирус постепенно перемещается и накапливается в передних отделах боковых долей в виде «гранул». Иногда имеет место сочетание свечения клеточной стромы и «гранул».

Настоящие «Методические рекомендации» разработаны сотрудниками отдела арбовирусов и экологии арбовирусов Института вирусологии им. Д. И. Ивановского АМН СССР проф. С. Я. Гайдамович, проф. Д. К. Львовым, ст. научн. сотр. В. Л. Громашевским, Г. А. Клисенко, Е. Э. Мельниковой, Л. П. Никифоровым, В. Р. Обуховой, Г. А. Сидоровой, мл. научн. сотр. Т. В. Кирющенко, Н. В. Хуторецкой.

С утверждением настоящих «Методических рекомендаций по лабораторным и полевым исследованиям арбовирусов» считать утратившими силу: «Временную инструкцию по сбору и исследованию материалов для выявления арбовирусов в природе» и «Временную инструкцию по лабораторной диагностике арбовирусных инфекций и изучению иммуноструктуры населения методом реакции торможения гемагглютинации», утвержденные 30 августа 1968 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Стр.

Полевые исследования 5

1. Выбор мест для проведения исследования и ключевых участков для сбора материала 6
   - А. Оценка природных условий 7
   - Б. Сбор эпидемиологических сведений 9
2. Сбор позвоночных животных 12
   - А. Мелкие млекопитающие 12
     - 1) Методы отлова и учета 12
     - 2) Абсолютный учет численности 16
   - Б. Летучие мыши 18
   - В. Средние и крупные млекопитающие 18
   - Г. Птицы 19
     - 1) Учет 19
     - 2) Добыча птиц 22
   - Д. Холоднокровные позвоночные 23
   - Е. Лабораторная обработка позвоночных в полевых условиях 24
3. Сбор членистоногих 26
   - А. Кровососущие клещи 26
     - 1) Общие вопросы сбора и обработки материала . . 26
     - 2) Иксодовые клещи 29
       - а) Методика сбора клещей 30
       - б) Методика учета клещей 31
       - в) Методика наблюдения за жизненным циклом клещей в естественных условиях 32
       - г) Способы содержания и получения культур клещей в экспериментальных условиях 33
       - д) Подготовка клещей для вирусологических исследований 34
       - е) Техника безопасности при работе с клещами . . 35

Стр.

3) Аргасовые клещи 35
4) Гамазовые клещи 36
5) Краснотелковые клещи 37
Б. Комары 38
В. Мокрецы 42
Г. Москиты 42
Д. Доставка паразитологического материала в вирусологическую лабораторию 43
4. Подсадные животные 44
5. Сбор материала для вирусологического и серологического исследования 46
А От людей 46
Б От домашних животных 48
В. От диких позвоночных животных 48
6. Хранение и транспортировка материалов 50
7. Соблюдение правил безопасности при работе в очаге . . 51
8. Общие принципы вирусологического и серологического обследования собранного материала 52

Лабораторная диагностика арбовирусных инфекций 54

1. Реакции гемагглютинации и торможения гемагглютинации 54
А Ингредиенты реакций гемагглютинации и торможения гемагглютинации 54
1) Антигены 55
а) Материал для получения антигенов 55
б) Методы получения гемагглютинирующих антигенов 56
2) Подготовка сывороток крови для РТГА 57
а) Адсорбция каолином 58
б) Экстракция ацетоном 58
в) Удаление нормальных агглютининов гусиных эритроцитов 58
3) Получение и подготовка эритроцитов 59
а) Взятие крови, обработка и хранение эритроцитов 59
4) Буферные растворы 60
а) Боратный буферный раствор pH 9,0 . . . 60
б) 0,4% альбумино-боратный буферный раствор pH 9,0 60
в) Фосфатные буферные растворы 61
г) 25% взвесь каолина на боратном буферном растворе pH 9,0 62
д) Раствор Альзовера 62
е) Декстрозо-желатино-вероналовый буферный раствор 63

Стр.
Б. Техника постановки реакции 65
1) Титрование антигенов в РГА 66
2) Реакция торможения гемагглютинации 66
а) Титрование рабочей дозы антигена 67
б) Техника постановки РТГА 68
в) Оценка результатов реакции 69
В. Приложение 70
1) Реактивы 70
2) Оборудование 71
2. Микрометод реакции связывания комплемента с арбовирусами 71
А. Ингредиенты реакции 72
1) Антигены 72
2) Сыворотки 73
3) Комплемент 73
4) Гемолитическая сыворотка 74
5) Эритроциты 74
6) Гемолитическая система 74
7) Солевые растворы 74
а) Трис-буферный раствор 74
б) Вероналовый буфер 74
в) Физиологический раствор 75
Б. Техника постановки реакции 75
1) Титрование антител и антигенов 76
2) Изучение антигенных связей между вирусами в РСК 79
В. Приложение 80
1) Реактивы 80
2) Оборудование 80
3. Индикация арбовирусов в слюнных железах комаров методом иммунофлуоресценции 81
А. Оборудование и материалы 81
Б. Подготовка объекта исследования 83
1) Извлечение слюнных желез 83
2) Фиксация слюнных желез 83
В. Окраска препаратов 83
1) Подготовка ингредиентов для окраски препаратов 83
2) Окраска препаратов 84
3) Оценка результатов 84

gost.e-ecolog.ru

...4/XI-1975 г. Зак. 1643 Тир. 700

Типография Министерства здравоохранения СССР