

576  
B 898

АКАДЕМИЯ НАУК КАЗАХСКОЙ ССР  
ОБЪЕДИНЕННЫЙ УЧЕНЫЙ СОВЕТ ИНСТИТУТОВ ЗООЛОГИИ  
И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ

---

в правах рукописи

У. Д. ВУСТИНА

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА  
ТОКСОПЛАЗМОЗА ЖИВОТНЫХ

(03.106 - паразитология)

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Алма-Ата - 1970

111088

16.89  
В 838  
Работа выполнена в лаборатории токсоплазмоза Института зоологии АН КазССР.

Научный руководитель - профессор И.Г.Галузо.

Официальные оппоненты:

1. Доктор биологических наук С.К.Сванбаев.
2. Кандидат медицинских наук С.И.Коновалова.

Ведущее предприятие - Институт краевой патологии Министерства здравоохранения КазССР.

Автореферат разослан " 9 " *сентября* 1970 г.

Защита диссертации состоится " " *октября* 1970 г.

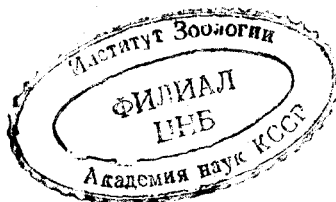
на заседании Объединенного Ученого Совета Институты зоологии и экспериментальной биологии Академии наук Казахской ССР.

Диссертация изложена на 284 страницах машинописи. В ней приведены 30 таблиц и 8 рисунков. Список использованной литературы содержит 277 названий, в том числе 92 отечественных и 185 иностранных работ.

Отзывы с заверенной подписью просим направлять по адресу:  
Алма-Ата, пр. Абая, 38. Институт экспериментальной биологии.

Ученый секретарь Совета,  
доктор биологических наук,  
профессор

А.М.Муразмадиев



## Введение

Токсоплазмоз — паразитарное заболевание человека и животных. Несмотря на значительные успехи в изучении токсоплазмоза, ветеринарная практика не располагает достаточно надежными и радикальными специфическими методами предупреждения и лечения этой болезни. Основное место в комплексе противотоксоплазмозных мероприятий занимает диагностика, но она является далеко несовершенной.

Диагностика токсоплазмоза животных, особенно при поисковых исследованиях, представляет немалые трудности. Они вызваны тем, что в природе имеет место заражение животных токсоплазмами как вирулентных, так и авирулентных штаммов (Галузо, 1965, 1969; Lainaon 1957 и др.). Первые вызывают у многих животных острое течение заболевания, клиника которого полиморфна, в то время как вторые образуют цисты в организме и приводят к латентной инфекции. Существующие методы диагностики не обеспечивают дифференциального определения носительства авирулентных и вирулентных форм и стадий клинической реакции у зараженного животного. В связи с этим ставится задача изыскать удовлетворяющие научный поиск и практические нужды методы лабораторной диагностики токсоплазмоза животных.

В практике для диагностики токсоплазмоза человека с успехом применяются реакция связывания комплемента (РСК) и реакция Сибина-Фельдмана (РСФ). Первая широко используется в СССР, вторая — больше в США и западно-европейских странах. Серологические исследования животных по этим реакциям проводились медиками с целью установления эпидситуации, в ветеринарной же практике они не применялись. В настоящее время разрабатывается ряд новых для диагностики токсоплазмоза серологических тестов: реакция непрямой гемагглютинации (РНГ), метод люминесцирующих антител (МЛА), реакция преципитации (РП), реакция агглютинации (РА), реакция флоккуляции (РФ) и др., которые проходят опробование и пока не могут быть рекомендованы для ве-

теринарной практики.

Мы поставили перед собой следующие задачи:

1. Приготовить токсоплазменные антигены из токсоплазм, выделенных от разных видов животных, и дать им серологическую характеристику;
2. Изучить диагностическую ценность РСК с токсоплазменным антигеном на сыворотках спонтанно и экспериментально зараженных животных различных видов;
3. Дать сравнительную оценку серологическим тестам (РСК, РСФ, РНГ и ММА), чтобы рекомендовать их для лабораторной диагностики токсоплазмоза различных видов животных.

## С О Б С Т В Е Н Н Ы Е И С С Л Е Д О В А Н И Я

### Глава I. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Мы изучали антигены, полученные из токсоплазм, выделенных от различных видов животных. Изготовлены 50 серий рабочего антигена в лабораторных условиях, преимущественно из токсоплазм штамма "ВН", которые испытаны на 29587 сыворотках от животных, и 41 серия экспериментального антигена из токсоплазм разных штаммов, полученных от животных (28 серии изготовлены в лабораторных и 18 серий в производственных условиях), которые испытаны на 419 сыворотках человека, спонтанно и экспериментально зараженных животных.

Далее была изучена диагностическая ценность РСК, РСФ, РНГ и ММА на сыворотках крови от 88 видов спонтанно и экспериментально зараженных животных (табл. I) и дана им сравнительная оценка.

Все сыворотки, изученные по РСФ, РНГ и ММА, параллельно проверялись по РСК, часть сывороток исследовалась одновременно по четырём реакциям.

По РСК исследованы 272

экспериментально зара-

Таблица I

## Количество исследованных сывороток крови различных животных по серологическим реакциям

№№ п.п.	Группы животных	Кол-во видов живот- ных	Р е а к ц и и								: В с е г о	
			РСК		РСФ		МЛА		РНГ		СЗ	ЗЗ
			СЗ	ЗЗ	СЗ	ЗЗ	СЗ	ЗЗ	СЗ	ЗЗ		
1.	С.-х. животные	7	12764	1584	78	195	122	67	141	221	13105	2067
2.	Дикие копытные	7	144	323	9	25	5	7	19	18	177	373
3.	Домашние плотоядные	2	1686	105	72	29	63	18	86	22	1907	174
4.	Дикие плотоядные	7	118	8	8	4	8	1	8	1	142	14
5.	Ферменные животные	4	3231	-	26	-	-	-	-	-	3257	-
6.	Домашние птицы	4	1046	166	84	69	56	18	40	14	1226	267
7.	Дикие птицы	16	50	31	13	15	9	-	9	-	81	46
8.	Насекомоядные	4	285	10	22	-	9	-	9	-	325	10
9.	Защитообразные	4	398	-	11	-	11	-	11	-	431	-
10.	Грызуны	27	1422	2	34	-	34	-	34	-	1524	2
11.	Лабораторные животные	5	1160	2526	135	171	81	65	79	62	1455	2824
12.	Рептилии	1	-	180	-	-	-	-	-	-	-	180
Итого:		88	22304	4935	492	508	398	176	436	388	23630	5957

Примечание: СЗ - на спонтанную зараженность  
ЗЗ - у экспериментально зараженных животных

29587

ленных животных различных видов, за которыми сотрудниками лаборатории велись наблюдения в динамике болезненного процесса. По РСК в различных сочетаниях с РСФ, РНГ и МДА проверено 732 животных на спонтанную зараженность и 252 экспериментально зараженных животных, сыворотка которых исследовалась многократно. Дано сравнение методики РСК при длительном (в холодильнике  $+4^{\circ}\text{C}$ ) и обычном (в термостате  $+37^{\circ}\text{C}$ ) связывании на основе исчисления 222 сывороток от зараженных животных.

Для заражения животных и для изготовления экспериментальных серий антигена были использованы 40 штаммов токсоплазм, большинство из которых выделены в нашей лаборатории от различных видов животных. Сыворотки для исследования и данные о возрастном, половом составе и других особенностях животных были любезно нам предоставлены сотрудниками нашей лаборатории: В.И.Голосовым (копытные), Е.М.Кузовкиным (свиньи), С.М.Пак (птицы), А.В.Левит (грызуны), В.Ф.Новинской (плодоядные и ферменные).

РСК мы ставили по типу классической реакции Борде Жангу в процессе длительного связывания. С целью увеличения чувствительности теста применительно к исследованию сывороток различных видов животных, мы произвели некоторое уточнение отдельных этапов ее постановки и усовершенствовали приготовление токсоплазменного антигена. РСК ставили в объеме 1 мл. Исследуемая сыворотка инкубировалась в водяной бане в течение 30 минут у крупного рогатого скота, бычков и свиной при температуре  $57^{\circ}$ ; овец, коз -  $59^{\circ}$ ; лошадей -  $58-59^{\circ}$ ; ослов, мулов -  $64^{\circ}$ ; собак, кошек и других хищных -  $65^{\circ}$ ; кроликов и яиц -  $65^{\circ}$ ; морских свинок -  $56^{\circ}$ ; крыс и мышей -  $60^{\circ}$  и у птиц при  $58-60^{\circ}\text{C}$ . В день постановки РСК предварительно проводили титрование комплемента в присутствии антигена и нормальной сыворотки крови того вида животного, сыворотку которого необходимо было ис-

следовать. Основное разведение комплемента 1:20, интервал при титровании 0,01, надбавку комплемента для главного опыта допускали 20-50% (в зависимости от вида животных). РСК ставили методом длительного связывания.

РСФ ставили по предложенному Сэбиным и Фельдманом (Sabin, Feldman, 1948) методу с модификацией Тальхаммера (Thalhammer, 1965)

За основу постановки РНГ мы брали метод Джекбса и Лунде (Jacobs, Lunde, 1957) с учетом некоторых модификаций Уминского (Uminski, 1964). Использовали антиген собственного изготовления, который пригоден для теста без потери рабочего титра в течение 2-3 месяцев и антиген, изготовленный по методу Джекбса-Лунде. Перед постановкой РНГ для каждой серии антигена определяли оптимальную сенсibiliзирующую дозу, за рабочий титр принимали 2 единицы.

МДА проводили по Уэллеру и Кунсу (Weller, Coons, 1954) с помощью непрямого метода и с применением комплемента по Гольдвассеру и Шепарду (Goldwasser, Scherard, 1959). Люминесцирующие сыворотки получали из Института эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалея АМН СССР. Просмотр препаратов производили при помощи люминесцентного микроскопа МД-2.

## ГЛАВА II. АНТИГЕНЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ ШТАММОВ ТОКСО- ПЛАЗМ, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЖИВОТНЫХ

Приготовление антигена в лабораторных условиях. Токсоплазменный антиген готовили для РСК и РНГ следующим образом: белым мышам вводили внутривенно по 0,2 мл (1:20) экссудата от белых мышей, зараженных токсоплазмами определенного штамма. На 3-4 день этих мышей забивали, шприцем отсасывали экссудат и выливали в предварительно завешанные стерильные центрифужные пробирки, затем в шприц набирали по 0,5 мл физиологи-

ческого раствора, промывали им брюшную полость мышей и выливали его туда же. Эксудат проверяли на наличие токсоплазм и посторонней микрофлоры путем микроскопирования мазка, окрашенного по Романовскому-Гимва. В одном мл эксудата должно быть не менее 20 млн. паразитов. Далее пробирки с эксудатом центрифугировали 30 мин. при 3000 об.мин., надосадочную жидкость удаляли, сырой осадок взвешивали, в пробирки добавляли дистиллированную воду в количестве равном половине надосадочной жидкости, полученную взвесь гомогенизировали в микроизмельчителе в течение 15 мин. и оставляли в холодильнике на двое суток, периодически взбалтывая. Полученную суспензию пятикратно замораживали и оттаивали в ледяной углекислоте при температуре  $-50^{\circ}\text{C}$ , затем заливали эфиром из расчета 1:3 (1 часть суспензии, 2 части эфира), смесь в банке с бусами встряхивали в шуттель-аппарате в течение 2 часов, переливали в колбу с притертой пробкой и оставляли в холодильнике на сутки. На второй день в колбе образуются три слоя: верхний эфирный, средний тканевой и нижний водный, последний отсасывали и центрифугировали при 8000 об.мин. Надосадочную жидкость сливали и добавляли к ней дистиллированную воду, крепкий раствор хлористого натрия и фенола из расчета 1:100 к сырому осадку из такого расчета, чтобы антиген содержал 0,85% NaCl и 0,25% фенола. Один мл основного маточного разведения антигена содержал 0,1 мг общего азота по Кельдалю. Каждую серию антигена затем титровали дважды по квадратной схеме с тремя сыворотками различной активности.

Для проверки чувствительности антигена, приготовленного лабораторным методом, мы провели ряд параллельных исследований с антигенами, изготовленными производственным методом в ИЭМ им. Гамалея и в Одесском НИИИЭ им. Мечникова (соответственно 240 и 51 сывороткам, полученных от зараженных животных различных видов). Процент



совпадения положительных и отрицательных результатов был 82 и 82,3 процент расхождения - 18 (43 сыворотки) и 17,65 (9 сывороток) выражался за счет положительных сывороток в низких титрах по РСК с лабораторным антигеном и отрицательных результатов со сравнимаемыми. Параллельно с лабораторным и московским антигенами было исследовано 54 сыворотки от человека. Совпадение результатов отмечено в 96,8%, расхождение - 3,7 (2 сыворотки), которые с первым антигеном были положительными, со вторым - отрицательными.

### Серологическая характеристика антигенов

I серия: Серологическая характеристика антигенов, приготовленных лабораторным методом из токсоплазм вирулентных штаммов. Нами изготовлены 23 серии антигена из токсоплазм 22 вирулентных штаммов, выделенных от различных видов животных и одного штамма от человека. Условия приготовления всех антигенов были совершенно одинаковыми и работа проходила в следующем порядке. Все испытуемые антигены были одновременно протитрованы с двумя гипериммунными сыворотками. В качестве контроля был взят тканевой антиген, приготовленный из селезенки здоровых белых мышей (1:500), антиген производства ИЭМ им. Гамалеи и антиген, используемый нами в ежедневной лабораторной практике.

Параллельно изучены все испытуемые и вышеупомянутые контрольные антигены с 20 различными сыворотками в разведении последних 1:5, полученными от животных, зараженных токсоплазмами вирулентных и авирулентных штаммов, и с пятью иммунными сыворотками от животных в разведении 1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80. Титрование антигенов и результаты двух опытов показали, что антигены, приготовленные из штаммов токсоплазм, выделенных от различных видов животных, идентичны по своей активности и не уступают антигену из токсоплазм

~~ИЗДАНИЕ~~ ИЭН<sup>1</sup>, приготовленному как по нашему методу, так и аналоговому производству ИЭМ им. Гамалеи АМН СССР.

Выявлялась антигенная идентичность авирулентных форм токсоплазм с вирулентными, т.е. нужно было определить вырабатывают ли животные, зараженные токсоплазмами авирулентных штаммов, антитела, которые могут быть выявлены в РСК с антигенами, приготовленными из токсоплазм различных вирулентных штаммов. Опыт ставился с сыворотками крови от 20 кроликов, зараженных внутривенно в дозе 2,0 мл суспензии головного мозга мышей, инфицированных токсоплазмами различных авирулентных штаммов. Сыворотки от зараженных животных исследовались одновременно с 23 испытуемыми и контрольными антигенами в динамике болезненного процесса. Самый короткий срок постановки РСК после заражения - 7 дней и самый большой - 2 года, в пределах этого времени РСК ставилась II раз (исследовано 96 сывороток). РСК с антигенами и сыворотками кроликов дали положительные показания, титр антител которых выявлялся спустя неделю после заражения и достигал своего максимума (1:640) спустя 1-1,5 месяца после заражения. Тканевой антиген во всех опытах дал отрицательные показания.

2 серия: Серологическая характеристика антигенов, приготовленных производственным методом из токсоплазм вирулентных и авирулентных штаммов <sup>х)</sup>. Приготовлено 18 антигенов из токсоплазм 14 вирулентных и 4 авирулентных штаммов, выделенных от различных видов животных и человека, при совершенно одинаковых производственных условиях. В качестве контроля использовали антигены из вирулентного штамма "ИЭН" (из Института зоологии АН КазССР, Одесского завода биопрепаратов НИИВЭ им. И.И.Мечникова и из ИЭМ им. Н.Ф.Гамалеи).

Испытуемые и контрольные антигены были протитрованы одновре-

х) Работа выполнена в соавторстве: И.Г.Галузо, А.М.Кривкова, М.Е.Бокова из Института зоологии АН КазССР; Н.И.Севастьянова, А.Е.Григорашенко, М.Е.Мельник и Д.С.Богданки из Одесского НИИВЭ.

менно с 14 положительными сыворотками различной активности. Антигены, изготовленные из авирулентных штаммов, проверялись в низких титрах (1:2, 1:4), и только с сыворотками высоких титров антител они дали положительные результаты. Антигены из вирулентных штаммов при проверке на вышеперечисленных сыворотках обладали высокой активностью и давали примерно идентичные результаты.

Кроме того, все антигены проверены на 284 сыворотках, в том числе, на естественную зараженность от человека - 78, от животных - 124 и от экспериментально зараженных животных - 82. Результаты исследований показали, что штаммы токсоплазм, выделенные от различных видов животных, идентичны между собой и родственны токсоплазмам человека.

### ГЛАВА III. СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ТОКСОПЛАЗМОЗА У РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ ЖИВОТНЫХ

РСК при исследовании сывороток крови спонтанно зараженных животных. У различных видов животных при спонтанном токсоплазмозоносительстве, РСК с антигеном, приготовленным в лабораторных условиях, выявила в сыворотках токсоплазменные антитела в значительном проценте, у представителей почти всех 87 видов животных (табл.2). Отсутствие антител в сыворотках некоторых видов, видимо, объясняется малым количеством обследованных животных. Титры положительных сывороток для большинства животных были 1:5, 1:10, редко 1:20 - 1:40, у кроликов и плотоядных 1:360 (предел).

Приведенные данные свидетельствуют, что пораженность токсоплазмами отдельных групп животных довольно высокая. РСК с антигеном собственного изготовления является хорошим тестом для определения зараженности при массовом исследовании животных на токсоплазмоз.

При параллельном исследовании сывороток крови крупного рогато-

Таблица 2

Результаты исследования животных на спонтанную  
зараженность токсоплазмами по РСК

№ п/п	Животные	Кол-во иссле- дован- ных голов	Положительные результаты	
			абсол. число	% ± м
I. Сельскохозяйственные животные (7 видов)	12764	2882	22,5 ± 0,3	
2. Дикие копытные (7 видов)	144	36	25 ± 3,6	
3. Домашние плотоядные (2 вида)	1686	566	33,5 ± 1,1	
4. Дикие плотоядные (7 видов)	118	25	21,1 ± 3,7	
5. Ферменные животные (4 вида)	3231	911	28,1 ± 0,8	
6. Домашняя птица (4 вида)	1046	194	18,5 ± 1,2	
7. Дикая птица (16 видов)	50	7	14 ± 4,8	
8. Насекомоядные (4 вида)	285	15	5,2 ± 1,3	
9. Зайцеобразные (4 вида)	398	135	33,9 ± 2,3	
10. Грызуны (27 видов)	1422	354	24,8 ± 1,1	
11. Лабораторные животные (5 ви- дов)	1160	236	20,3 ± 1,3	
Итого: (87 видов)	22304	5361	24,0 ± 0,28	

тё скота, свиней, зайцев-песчанников с двумя антигенами (токсоплазменным и бруцеллезным) перекрестные реакции между ними отсутствовали. Белые мыши, зараженные энцефалитозоон, дали отрицательные результаты с токсоплазменным антигеном. Все это свидетельствует о специфичности РСК при токсоплазмозе. В пользу специфичности РСК также говорит тот факт, что штаммы токсоплазм в нашей лаборатории были выделены от овец, свиней, собак, кошек, лисиц, песцов, сусликов, кролика, кур и уток, сыворотки крови которых имели положительные результаты по РСК.

Молодые животные в возрасте 0,5-2 года (крупный рогатый скот, овцы и свиньи) дали наивысший процент положительно реагирующих, по сравнению с другими возрастными группами. У дикого кабана, домашних и диких плотоядных, зайцев-русаков, зайцев-песчаников, сусликов-песчаников с возрастом процент положительно реагирующих увеличивается. Самки всех возрастных групп животных дают несколько больший процент реагирующих, чем самцы, что объясняется их физиологическими особенностями.

У свиней с низкой упитанностью процент положительно реагирующих был выше ( $32 \pm 5,5$ ), чем со средней и выше средней ( $14 \pm 3,3$ ). Не выявлено особых различий по РСК у породных групп свиней.

Несколько различными были показания РСК у животных, находящихся в различных естественно географических зонах. Так процент положительно реагирующих у зайцев-русаков и сусликов-песчаников, добытых в пойме р.Урала, был гораздо выше ( $40,9 \pm 10,4$ ;  $45,4 \pm 15,0$ ), чем в пустыне ( $21,2 \pm 7,1$ ;  $18,8 \pm 2,6$ ).

Показания РСК в зависимости от сезона прослежены в сыворотках свиней, летучих мышей и зайцев-русаков. Зараженность свиней в весенне-летний период составляла 50,1%, осенью 34,8%; у зайцев-русаков процент положительно реагирующих распределялся по разному: осенью - 27,2, зимой -  $30 \pm 4,1$ , летом -  $29,1 \pm 6,1$ . Большой процент зараженности получен при исследовании сыворотки крови рыжей вечерницы в зимних колониях ( $5,8 \pm 1,9$  по сравнению с летними 3,7).

Все это позволяет сделать вывод о высокой ценности РСК для изучения эпизоотологической ситуации и изучения природных очагов токсоплазмоза.

РСК при исследовании сывороток крови экспериментально  
зараженных животных

Нами изучалась специфичность и чувствительность РСК при исследовании

довании сывороток крови экспериментально зараженных токсоплазмами вирулентных и авирулентных штаммов животных в динамике инвазионного процесса.

Изучались сыворотки сельскохозяйственных животных от крупного рогатого скота (9), овец (12), коз (12), свиней (25), лошадей (2), ослов (2) и от верблюдов (1), до опыта отрицательно реагирующих по РСК. После заражения животные исследовались ежедневно в течение 15 дней, затем через 7-10 дней в течение одного года и, далее, через месяц до конца наблюдения. Установлено, что при любом способе заражения различными штаммами в организме животных образуются комплекссвязывающие антитела. Появление антител, высота титра и длительность их сохранения зависела от быстроты развития болезненного процесса.

Данные о времени появления антител в зависимости от способа инфицирования представлены на табл. 3, из которой видно, что при заражении животных токсоплазмами авирулентных штаммов в большинстве случаев появление антител у них запаздывало по сравнению с животными, зараженными вирулентными штаммами. Высота титров независимо от вирулентности штаммов, спустя 15-45 дней после заражения достигала своего предела - 1:5-1:640, удерживаясь на таком уровне до 80 дней. Надо отметить, что при внутрибрюшинном, внутримышечном и подкожном способе введения заразного начала титры антител по РСК были выше, чем при заражении животных на слизистую влагалища или на слизистую глаза.

Длительность выявления антител в крови животных также была различной. Например, при заражении коров вирулентным штаммом антитела в одном случае исчезли из крови на 147 день, в другом они определялись до двух лет (не предел). То же можно сказать о сыворотках крови других видов животных. В большинстве случаев у инфициро-

Таблица 3

Сроки выявления антител по РСК у животных в зависимости от способов заражения токсоплазмами вирулентных и авирулентных штаммов (в днях)

№ п/п	Животные	С п о с о б ы з а р а ж е н и я								
		вну-три-ши-ный	вну-три-шеч-ный	под-кож-ный	на-ока-рифи-циро-кожу	на-рет-ов	на-вс-тул-вла-гали-ща	на-тра-сли-вс-дёр-ный	на-сли-вс-дёр-ный	
1.	Крупный рогатый скот	- 16	6-21 5							
2.	Овцы	5-12 6	12	12	10 8		- 35			
3.	Козы	- 7-23	10 7-23		9-14	15	14	-	9	9
4.	Свиньи	- 17-30	5	6		10		8	7-8	10-13
5.	Лошади		7					16		
6.	Ослы				14					
7.	Верблюды			11						
8.	Сибирские козероги				7	7	6	7	6	
9.	Архары	7	7							
10.	Дикий кабан		6							
11.	Урсал		6							
12.	Сайгаки	- 9	- 9							
13.	Собаки	12	11-19							
14.	Медведь		8							
15.	Кролики	7	7 7-10	7						

Примечание: В числителе - при вирулентных штаммах  
 В знаменателе - при авирулентных  
 - не исследовались

ванных животных титр антител к концу года после заражения был низким, т.е. не превышал 1:5; у одних животных он исчезал, у других выявлялся на таком уровне в течение 2-3 лет (срок наблюдения).

При многократном заражении (до 13 раз) внутриназально лошади и внутрибрюшинно осла титр антител повышался у них до 1:640 (предел).

Изучались сыворотки, полученные в процессе заболевания от диких копытных: 3 сайгаков, 7 сибирских козерогов, 2 архаров и от 1 уреала. Сайгаки оказались очень чувствительными, при заражении токсоплазмами вирулентных штаммов они гибли на 18-23 день. Комплемент-связывающие антитела появились на 9 день, к моменту гибели титр их повысился до 1:10. Сыворотка от остальных видов копытных, зараженных токсоплазмами различных вирулентных штаммов, в РСК давала положительные показания в титрах от 1:5 до 1:160 при длительности сохранения антител от нескольких месяцев до 3,5 лет (срок наблюдения).

Исследовались сыворотки от 14 собак, в том числе от восьми собак, инокулированных подкожно, сыворотка исследовалась через 7-10 дней после заражения. Антитела выявлялись на 11-19 день, к 1,5 месяцам титр 1:5 - 1:160, к шести месяцам в сыворотке от 5 животных они перестали определяться. Остальные собаки при однократном обследовании дали положительные результаты.

В сыворотке от медведя, инфицированного подкожно токсоплазмами вирулентного штамма, антитела появились на 8 день, через две недели титр 1:20, к 3,5 месяцам 1:80.

При изучении РСК с сыворотками крови домашней птицы оказалось, что при любом способе заражения реакция обладала неполной воспроизводимостью результатов. При исследовании по РСК сывороток от неоднократно зараженных птиц в течение 32 дней не удавалось выявить у них антитела. Только у некоторых птиц спустя два месяца после заражения появились антитела в титре 1:5 на два, три креста, Исключение со-



ставляют голуби, у которых при любом способе заражения с 23 дни и до 5 месяцев в РСК определялись антитела в титре 1:5, 1:10.

С сыворотками искусственно зараженных ежей и летучих мышей в большинстве случаев получен положительный результат по РСК в титрах 1:5.

Изучались сыворотки от лабораторных животных: 74 кроликов, 35 морских свинок и 6 белых крыс. У 33 кроликов, зараженных токсоплазмами различных авирулентных штаммов внутривнутрино и подкожно, антитела появились, как правило, на 7-10 день. Титр их к концу второго месяца достигал своего максимума (1:640). Длительность наличия антител выявилась до трех лет (срок наблюдения) в довольно высоких титрах (1:40, 1:80). Среди 24 кроликов, зараженных внутримышечно и подкожно вирулентными штаммами, большинство погибали на 7-13 день. У сохранившихся животных антитела появлялись на 7 день, к концу 1-1,5 месяцев достигали своего максимума (1:640) и сохранялись с небольшим понижением до 5 месяцев (срок наблюдения). При неоднократном заражении токсоплазмами вирулентных штаммов 17 кроликов титр у них не превышал 1:320 в течение месяца.

При систематическом исследовании сывороток от 30 многократно зараженных внутримышечно морских свинок токсоплазмами вирулентных штаммов установлено, что антитела появились у них на 6-7 день, к концу месяца титр достигал 1:160, при повторных заражениях он не превышал 1:320. При исследовании сывороток от 5 морских свинок, зараженных токсоплазмами авирулентных штаммов, антитела в их сыворотках обнаруживались в течение двух лет после заражения. Крысы, зараженные токсоплазмами вирулентных штаммов, реагировали положительно по РСК на 7-12 день после заражения и в течение восьми месяцев реакция оставалась положительной.

В сыворотках крови от 20 черепах, начиная с 5 и до 300 дня

после заражения, во всех случаях получены отрицательные результаты.

На основе изложенных данных, можно считать, что РСК является чувствительным методом при исследовании различных видов животных, о чем говорит довольно высокий процент положительно реагирующих. Кроме того, этот метод является специфичным, на что указывает увеличение титра токсоплазменных антител в динамике болезненного процесса, выделение штаммов токсоплазм от положительно реагирующих и отсутствие перекрестных реакций между токсоплазменным, бруцеллезным и другими антигенами. Показания РСК зависят от зараженности животных, а последняя от возраста, пола, упитанности, а также от биотопа, сезона и содержания их. Колебание процента зараженности животных в зависимости от указанных факторов также говорит в пользу специфичности РСК с токсоплазменным антигеном, приготовленным в лабораторных условиях. Наименьшая чувствительность РСК отмечена при исследовании сывороток птиц. Этот метод совершенно не пригоден для исследования сывороток черепах.

#### ГЛАВА IV. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РАЗЛИЧНЫХ СЕРОЛОГИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ТОКСОПЛАЗМОЗА ЖИВОТНЫХ

Специфичность и чувствительность реакции с красителем (РСФ), реакции люминесцирующих антител (МЛА) и реакции непрямой гемагглютинации (РНГ) проверены нами при исследовании сывороток крови от спонтанно и экспериментально зараженных животных токсоплазмами штаммов различной вирулентности. Для контроля и сравнения применяли реакцию связывания комплемента (РСК).

Всего в сравнении с РСК по трем тестам: РСФ, РНГ и МЛА изучены 2348 сывороток, в том числе 1326 - от спонтанно и 1022 - от экспериментально зараженных домашних и диких животных (табл.4).

При сравнении наиболее широко используемых диагностических

Таблица 4

## Результаты сравнительного изучения иммунологических тестов при токсоплазмозе животных

Сравнимые тесты	Кол-во исследованных сывороток	% $\pm$ m положительных результатов по РСК	% $\pm$ m положительных результатов по сравняемому тесту	% $\pm$ m совпадений	Несовпадения	
					% $\pm$ m положительных результатов по РСК и отрицательных по сравняемому тесту	% $\pm$ m положительных результатов по сравняемому тесту и отрицательных по РСК

## При спонтанном заражении

РСК и РСФ	492	12,2 $\pm$ 1,4	16,8 $\pm$ 1,6	92,1 $\pm$ 1,2	1,4 $\pm$ 0,5	6,5 $\pm$ 1,1
РСК и РИГ	436	13,7 $\pm$ 1,6	13,9 $\pm$ 1,6	89,9 $\pm$ 1,4	5,3 $\pm$ 1,0	5,7 $\pm$ 1,1
РСК и МЛА	398	9,5 $\pm$ 1,4	14,5 $\pm$ 1,7	89,9 $\pm$ 1,5	2,5 $\pm$ 0,7	7,5 $\pm$ 1,3

## При экспериментальном заражении

РСК и РСФ	508	75,4 $\pm$ 1,9	90,9 $\pm$ 1,2	83,7 $\pm$ 1,6	0,3 $\pm$ 0,24	16 $\pm$ 1,5
РСК и РИГ	338	69,5 $\pm$ 2,7	74,5 $\pm$ 2,3	79,6 $\pm$ 2,1	8,9 $\pm$ 1,5	11,5 $\pm$ 1,7
РСК и МЛА	176	55,1 $\pm$ 3,7	82,3 $\pm$ 2,8	70,5 $\pm$ 3,4	1,1 $\pm$ 0,7	28,4 $\pm$ 3,3

тестов РСК и РСФ от естественно (492) и экспериментально зараженных животных (508), положительные результаты по РСК получены в  $12,2 \pm 1,4\%$ ,  $75,4 \pm 1,9\%$  случаев, по РСФ -  $16,8 \pm 1,6\%$ ,  $90,9 \pm 1,2\%$ . Совпадение результатов составило  $92,1 \pm 1,2\%$  и  $83,7 \pm 1,6\%$ . Основные несовпадения отмечались за счет положительной РСФ при отрицательной РСК ( $6,5 \pm 1,1\%$  и  $16 \pm 1,5\%$ ). В случаях положительных результатов по обеим реакциям титры антител по РСФ превышали таковые по РСК в среднем более, чем в 10 раз.

При сравнении РСК и РНГ (436 и 338 сывороток) положительные результаты по РСК получены в  $13,7 \pm 1,6\%$  и  $69,5 \pm 2,7\%$ , по РНГ -  $13,9 \pm 1,6\%$  и  $74,5 \pm 2,3\%$ . Результаты совпали в  $89 \pm 1,4\%$  и  $79,6 \pm 2,1\%$  случаев. Несовпадения результатов при положительной РСК отрицательная РНГ и обратно соотношения приблизительно одинаковые, соответственно  $5,3 \pm 1,0\%$ ,  $5,7 \pm 1,1\%$  и  $8,9 \pm 1,5\%$ ,  $11,5 \pm 1,7\%$ . Мы не могли установить какой-либо закономерности в титрах, в одних сыворотках титры антител по РНГ в 2-10 раз превышали таковые по сравнению с РСК, в других, наоборот, они были ниже.

При сравнении РСК и МЛА (398 и 176 сывороток), комплементсвязывающие антитела выявлены в  $9,5 \pm 1,4\%$  и  $55,1 \pm 3,7\%$  случаев, МЛА дала положительные результаты  $14,5 \pm 1,7\%$  и  $82,3 \pm 2,8\%$ . Совпадение результатов по этим реакциям наблюдалось в  $89,9 \pm 1,5\%$  и  $70,5 \pm 3,4\%$  случаев. Отмеченные несовпадения наблюдались в основном за счет отрицательных результатов по РСК и положительных по МЛА ( $7,5 \pm 1,3\%$  и  $28,4 \pm 3,3\%$ ). По чувствительности МЛА приближается к РСФ.

Одновременно по РСК, РСФ, РНГ и МЛА изучено 395 сывороток крови от естественно и экспериментально зараженных животных. Положительные результаты получены по РСК в  $23,2 \pm 2,1\%$ , по РСФ -  $40 \pm 2,4\%$ , по МЛА -  $37,2 \pm 2,4\%$ , по РНГ -  $27 \pm 2,3\%$ , результаты совпадали в  $76 \pm 2,1\%$  случаев. Основные несовпадения отмечались за счет положительной

РСФ и МЛА при отрицательной РСК и РНГ.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что все изучаемые иммунологические тесты оказались специфичными для диагностики токсоплазмоза у животных, зараженных как токсоплазмами вирулентных, так и авирулентных штаммов, однако их чувствительность неодинакова, так как этими тестами выявляются разнородные антитела и в разное время от момента заражения. Самой чувствительной оказалась РСФ. По чувствительности к ней приближается МЛА. По этим реакциям получен значительно больший процент положительных результатов в сравнении с РСК.

Несколько более чувствительной по сравнению с РСК оказалась и РНГ. Однако, следует отметить, что РНГ часто дает неспецифические показания, при малейших нарушениях условий. При постановке этой реакции необходимо строго следить за качеством ингредиентов, правильностью приготовления буферных растворов, качеством танина и антигена, от чего зависят их оптимальные рабочие дозы, необходимые для обработки эритроцитов. Большое количество ингредиентов, входящих в реакцию, и строгие условия их использования при слабой стабильности несколько ограничивают возможности применения этой реакции в широкой практике. Ценность РНГ возрастает при возможности производства стандартных ингредиентов или их заменителей.

В противоположность РНГ, МЛА оказался более простым в техническом отношении методом. Результаты по нему, как правило, хорошо воспроизводятся. МЛА заслуживает внимания и внедрения в практику. Его недостаток - малая пропускная способность, по сравнению с РСК. То же надо сказать о РСФ.

Применение широкого комплекса реакций иммунитета в клинике должно оказать неоценимую услугу для диагностики заболевания и оценки качества лечения. В широкой эпизоотологической практике из

всех серологических реакций, указывающих на заражение животных токсоплазмой, наиболее приемлемыми оказались РСК и МЛА.

## ВЫВОДЫ

1. Приготовленный нами токсоплазменный антиген был испытан по реакции связывания комплемента на большом числе сывороток крови от естественно и экспериментально зараженных животных и показал высокие антигенные свойства и строгую специфичность.

2. Антигены из токсоплазм вирулентных и авирулентных штаммов, выделенных от различных животных, серологически идентичны как между собой, так и с антигенами, приготовленными из штаммов, выделенных от человека.

3. Реакция связывания комплемента при исследовании на спонтанную зараженность сывороток крови от 87 видов домашних и диких животных показала высокую чувствительность и специфичность.

4. При изучении реакции связывания комплемента с сыворотками, поступающими для исследования в динамике инвазивного процесса от различных видов животных (кроме черепах), зараженных токсоплазмами вирулентных и авирулентных штаммов, установлено, что в их организме образуются комплементсвязывающие антитела, которые нарастают по мере развития болезненного процесса, зависящего от реактивности организма, а также от дозы использованного в опыте штамма.

5. Реакция связывания комплемента менее чувствительна в работе с сыворотками домашних и диких птиц и совершенно неприемлема при исследовании сывороток от экспериментально зараженных рептилий.

6. При исследовании по реакции связывания комплемента сывороток крови от различных животных наилучший результат был получен при длительном связывании на холоде и инактивации сывороток крови в течение 30 мин. при разных температурах для каждого вида (у крупного

рогатого скота, буйволов, свиней - при  $57^{\circ}$ , овец, коз - при  $59^{\circ}$ , лошадей -  $58-59^{\circ}$ , ослов, мулов -  $64^{\circ}$ , собак, кошек, лисиц и зайцев -  $65^{\circ}$ , морских свинок, крыс и мышей -  $60^{\circ}$  и у птиц -  $58-60^{\circ}\text{C}$ ).

7. Сыворотки взрослых собак, волков, корсаков, лисиц, сусликов, кроликов и др. обладают сильными антикомплементарными свойствами, что требует перед постановкой главного опыта титрование комплемента в присутствии антигена и исследуемой сыворотки и увеличения комплемента для главного опыта индивидуально для каждого вида животного.

8. Применяемая нами методика проведения реакции связывания комплемента полностью себя оправдала, и мы рекомендуем использовать ее в практике диагностики токсоплазмоза животных.

9. Реакция с красителем (РСФ) выявляет антитела раньше и в большем проценте положительно реагирующих сывороток, титр которых, особенно у искусственно зараженных животных, в несколько раз выше титра по РСК. Длительность выявления антител по РСФ продолжительнее, чем по РСК. Совпадение результатов этих двух реакций у различных видов животных колеблется от 80-90% (несовпадения наблюдаются за счет положительных результатов по РСФ при отрицательных по РСК).

10. Метод люминесцирующих антител (МЛА) по своим количественным и качественным показаниям в динамике инфекционного процесса сходен с реакцией с красителем (РСФ).

11. Реакция непрямой гемагглютинации (РНГ) в опытах с сыворотками от млекопитающих показала достаточную специфичность и высокую чувствительность. По сравнению с РСК она выявляет большее число положительно реагирующих при титрах, в два-четыре раза превосходящих титры РСК (особенно у зараженных животных).

12. Сравнительные исследования сывороток крови по РСК, РСФ, РНГ и МЛА, в различных сочетаниях, от естественно и эксперименталь-

но зараженных животных токсоплазмами вирулентных и авирулентных штаммов показало, что все указанные тесты специфичны и в несколько различной степени чувствительны. РСФ и МЛА выявляют антитела раньше и фиксируют их в крови зараженных животных дольше, чем РСК и РНГ. Отсюда, в сомнительных случаях целесообразно параллельно исследовать сыворотки одновременно по РСК, РСФ, РНГ и МЛА.

IV. В работе изложена использованная нами методика приготовления антигена для серологической диагностики токсоплазмоза животных и дано описание методов постановки РСК, РСФ, РНГ и МЛА, которыми мы пользовались в своих работах.

Работы, опубликованные по материалам диссертации:

1. Токсоплазмоз сельскохозяйственных животных и птиц Восточного Казахстана по результатам РСК. В кн.: Паразиты сельскохозяйственных животных Казахстана. Алма-Ата, 1963, стр. 181-185 (в соавт. с А.В.Левит).

2. Выделение штаммов токсоплазмы от грызунов. Труды Института зоологии АН КазССР. Алма-Ата, 1963, т. 19, стр. 43-44 (в соавт. с А.В.Левит).

3. Токсоплазмоз серебристо-черных лисид и песцов в Уральском и Алма-Атинском питомниках. В сб.: Паразиты с.-х. животных Казахстана. Алма-Ата, 1963, т. 2, стр. 200-204 (в соавт. с А.В.Левит).

4. Новый токсоплазмоподобный организм у лабораторных белых мышей. Труды Института зоологии АН КазССР. Алма-Ата, 1964, т. 22, стр. 34-43 (в соавт. с А.В.Левит и Л.Н.Губенко).

5. Реакция связывания complemента (РСК). В кн.: Токсоплазмоз животных. Алма-Ата, 1965, стр. 362-369 (в соавт. с З.И.Горбуновой).

6. Токсоплазмоз грызунов. В кн.: Токсоплазмоз животных. Алма-Ата, 1965, стр. 238-273 (в соавт. с А.В.Левит и Л.Н.Губенко).

7. Токсоплазмоз зайцеобразных. В кн.: Токсоплазмоз животных.



Алма-Ата, 1965, стр. 224-237 (в соавт. с А.В.Левит и Л.Н.Губенко).

8. Токсоплазмоз поймидотермных позвоночных. В кн.: Токсоплазмоз животных. Алма-Ата, 1965, стр. 309-320 (в соавт. с А.В.Левит и Л.Н.Губенко).

9. Токсоплазмоз насекомых. В кн.: Токсоплазмоз животных. Алма-Ата, 1965, стр. 213-217 (в соавт. с А.В.Левит и Л.Н.Губенко).

10. Токсоплазмоз ферменных пушных зверей. В кн.: Токсоплазмоз животных. Алма-Ата, 1965, стр. 176-182 (в соавт. с А.В.Левит и Л.Н.Губенко).

11. Серологическая диагностика токсоплазмоза животных. В кн.: Проблемы токсоплазмоза животных. Алма-Ата, 1966, стр. 30-32.

12. Сравнительная оценка некоторых методов серологической диагностики токсоплазмоза животных. В кн.: Материалы первой научной конференции молодых ученых АН КазССР. Алма-Ата, 1968, стр. 304-305.

13. Антигенная структура и иммуногенные свойства токсоплазм, выделенных от различных видов животных. В сб.: Успехи протозоологии. Л-д, 1969, стр. 247 (в соавт. с С.И.Коноваловой и Е.М.Кузовкиным).

14. Особенности серологических реакций при токсоплазмозе кроликов. Тезисы докладов УП Всесоюзной конференции по природной очаговости болезней и общим вопросам паразитологии животных. Алма-Ата - Самарканд, 1969, стр. 14-17 (в соавт. с Л.А.Высоковой).

15. Сравнительное изучение серологических тестов в диагностике токсоплазмоза животных. Тезисы докладов УП Всесоюзной конференции по природной очаговости болезней и общим вопросам паразитологии животных. Алма-Ата-Самарканд, 1969, стр. 31-33 (в соавт. с С.И.Коноваловой и Л.В.Тобольской).

16. Серологическая характеристика штаммов токсоплазм, выделенных от животных. В сб.: Вопросы природной очаговости болезней. Алма-Ата, 1970, вып. 3, стр. 37-48 (в соавт. с И.Г.Галузо, Н.И.Севастья-

овой, А.Е.Григоращенко и др.).

Материалы диссертации доложены:

- 1) На паразитологическом совещании Института зоологии АН КазССР (г. Алма-Ата, 1961 г.).
- 2) На У конференции по природной очаговости болезней и вопросам паразитологии республик Средней Азии и Казахстана (г. Фрунзе, 1962 г., в соавт.).
- 3) На Всесоюзной конференции по токсоплазмозу животных (г. Алма-Ата, 1966 г.).
- 4) На III Международном конгрессе протозоологов (г. Ленинград, 1969 г., в соавт.).
- 5) На УП Всесоюзной конференции по природной очаговости болезней и общим вопросам паразитологии животных (г. Самарканд, 1969 г.)

