

## РЕАКЦИЯ АГГЛЮТИНАЦИИ ПРИ КРАСНУХЕ КАРПОВЫХ РЫБ

Кандидат биологических наук Г. Д. Гончаров

Вопросы диагностики и еще более вопросы иммунологии при инфекционных заболеваниях рыб до сих пор мало разработаны, несмотря на их большое практическое значение. До настоящего времени мы не имеем объективного критерия в определении инфекционных болезней рыб и в своих заключениях основываемся нередко лишь на осмотре проявляющихся внешних симптомов, а между тем мы знаем, что инфекционный процесс может протекать и бессимптомно. Такое положение мы имеем, например, при краснухе карповых рыб, когда бактериологическое исследование ничего не дает.

В 1939 г., когда еще не была достаточно ясна природа возбудителя краснухи карпа и было много сторонников его бактериального происхождения, мною (1), в целях разработки диагностического метода, были проведены специальные серологические исследования этого заболевания независимо от работ Шеперклауса и Манна. В то время мои исследования показали, в противоположность работам немецких ученых, что реакция бактериальной агглютинации при краснухе не специфична, так как природа возбудителя этого заболевания не бактериальная.

Было установлено, что *Achromobacter punctatum ascitae* (принятый немецкой школой за возбудителя краснухи *Vauchwassersucht*) часто не агглютинируется (не склеивается) сывороткой заведомо больных краснухой рыб, а если и агглютинируется, то в большинстве случаев в меньшей степени, чем другие виды бактерий, например, флюоресценты. Вообще же при искусственной иммунизации бактериальными антигенами (*Achromobacter punctatum ascitae*, *Pseudomonas fluorescens liquefaciens* и др.) можно получить сравнительно высокий для холоднокровных титр агглютинации (до 1:10000), высокое накопление антител, зависящее от температуры среды. Образование антител в крови рыб известно и из литературных источников (5, 6, 8). Поэтому этот феномен иммунитета может быть использован в иммунологических и диагностических целях при инфекционных заболеваниях рыб, в частности при вирусных инфекциях. Однако, при вирусных инфекциях метод серологических исследований несколько усложняется из-за малых молекулярных размеров вируса, невидимого в обычный световой микроскоп.

Из работ Сергиева, Рязанцевой и Деминой (2, 3, 4) и Roberts'a (7) известно, что при таких вирусных инфекциях человека, как энцефалит, грипп, герпес, корь, серологическая диагностика с применением реакции агглютинации вполне возможна. В этих целях пользуются свойством вируса адсорбироваться на различных взвешенных частицах и, в частности, на бактериальных клетках, видимых в обычный микроскоп. Бактерии, нагруженные вирусом, агглютинируются при соединении с соответствующими антисыворотками. Roberts (7) отмечает высокую специфичность такой реакции с вирусом St. Luis энцефалита, причем он получал на

обезьянах ранний положительный ответ уже на второй день интрацеребрального заражения. В качестве адсорбента он применял культуру *Serratia marcescens*. Рязанцева и Демина получили хорошие по своей четкости результаты при диагностировании кори и гриппа. В качестве адсорбента ими была избрана наиболее агглютинабельная культура *Eberthella typhi*.

Таким образом, имея в виду упомянутые выше работы по серодиагностике вирусных инфекций человека, можно было ожидать успеха реакции агглютинации и при диагностике вирусных заболеваний рыб. Но, учитывая специфику биологического процесса у холоднокровных, следовало осторожно подойти к разрешению этого вопроса. Поэтому предварительно необходимо было избрать надежный адсорбент.

В качестве последнего избирались штаммы бактериальных культур, которые не давали бы спонтанной агглютинации. С этой целью нами были приготовлены антигены из бактериальных культур *Bacterium septicaemia ganarum*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas fluorescens liquefaciens* путем: 1) тепловой инактивации при температуре 60° в течение 45 мин. и 2) добавления формалина (0,4%). Бактериальная суспензия готовилась по стандарту (2 млрд.) после инактивации. Наиболее пригодной из указанных выше культур оказалась культура *Bact. septicaemia ganarum* (шт. 205), инактивированная теплом. Адсорбирование вируса краснухи на бактериальных клетках осуществлялось следующим образом.

Растиртый с песком материал, содержащий вирус, взвешивают в физиологическом растворе 0,65% NaCl из расчета 1:5. Взвесь центрифугируют 60 минут при 3000 об/мин. Центрифугировать следует очень тщательно, чтобы центрифугат был полностью освобожден от мельчайших обрывков и ткани, хотя при этом вирус, частично адсорбированный последними, переходит в осадок.

Центрифугат смешивают в равных количествах со свежеприготовленной бактериальной взвесью (инактивированная, 2 млрд. в 1 кубике) и энергично встряхивают при комнатной температуре в течение 10—15 минут, после чего смесь помещают в рефрижератор при температуре +2—(+3°). На следующий день, через 16—18 часов, смесь трехкратно центрифугируют для отмывания тканевой плазмы. Отмывают в физиологическом растворе, причем центрифугирование производят при том же числе оборотов в течение 45—50 мин. После отмывания осадок снова суспензируется в первоначальном объеме физиологического раствора. Приготовленную таким образом взвесь бактериальных клеток, нагруженных вирусом, употребляют в качестве антигена в реакции агглютинации.

Реакция агглютинации проводится капельным методом, так как объемы сывороток бывают нередко очень ограничены. Такой метод позволяет читать реакцию под микроскопом, в связи с чем, в случае остатка элементов ткани, исключаются возможные заблуждения в распознавании истинной агглютинации. Таким образом для этих целей необходимо иметь:

1. Пастеровские пипетки с оттянутыми капиллярами (просвет равного диаметра) и резиновым шлангом-мундштуком.
2. Стекла Максимова (большие толстые предметные стекла с большой лункой).
3. Физиологический раствор 0,65%-ный NaCl.
4. Бактериальный диагностикум на физиологическом растворе, как адсорбент.
5. Патологический материал (кожа), содержащий вирус.
6. Нормальный материал (кожа).
7. Анти-сыворотку.
8. Нормальную сыворотку.

Постановка реакции агглютинации капельным методом производится следующим образом. На стекла Максимова сперва наливают по каплям физиологический раствор: на первое стекло 9 капель и на следующие по одной капле. Затем, минуя первое стекло, вносят на каждое стекло по одной капле суспензии адсорбированного вируса. Наконец, в налитых каплях разводят сыворотку. К 9 каплям физиологического раствора добавляют одну каплю сыворотки и, после смешения ее с физиологиче-

ским раствором, путем трехкратного всасывания и выпускания через капилляр (без пузырьков воздуха!) и до определенной черты, две капли этого первого разведения вносят на второе стекло, затем две капли из второго на третье стекло и т. д. В результате получается разведенная сыворотка 1 : 10, 1 : 20 и т. д. в физиологическом растворе вместе с суспензией адсорбированного вируса.

Стекла Максимова ставят друг на друга столбиком при 4—7°, что предохраняет капли от высыхания, и реакция читается через 6, а затем через 18 часов под микроскопом при малом увеличении. Степень агглютинации регистрируется по четырехбальной системе.

Возможность применения реакции агглютинации бактерий, нагруженных вирусом краснухи, в целях диагностики вирусного заболевания холоднокровных, была подтверждена на заведомо здоровых и заведомо больных рыбах, взятых из известных в эпизоотологическом отношении рыбхозов (карп, орфа, серебрястый карась), приазовского лимана (сазан) и р. Северной Двины (стерлядь). Диагноз при помощи реакции агглютинации ставился либо по известной антивирусной сыворотке, либо по известному антигену, в зависимости от обстоятельств и состояния опытного материала. Кроме того, предварительно или параллельно ставилась реакция агглютинации для контроля в следующих комбинациях:

1. (V + 205) + ser. vir.
2. (N + 205) + ser. norm.
3. (V + 205) + ser. norm.
4. 205 + ser. vir.
5. (N + 205) + ser. vir.

где: (V + 205) — вирус, адсорбированный бактериями штамма № 205; (N + 205) — нормальный кожный материал, не содержащий вируса в смеси с бактериальной суспензией; ser. vir. — антивирусная сыворотка; ser. norm. — нормальная сыворотка.

Титр агглютинации доходил до 1 : 640 и больше, в то время как в контроле с нормальной сывороткой титр агглютинации равнялся 0 или доходил (в некоторых случаях) до 80. Таким образом была диагностирована краснуха у сазана в одном из приазовских лиманов, наблюдавшаяся летом 1947 г.

Реакция агглютинации протекала в присутствии известной антивирусной сыворотки, полученной от двух больных годовиков карпа и иммунизированной орфы, и неизвестного антигена испытуемого кожного геморрагического материала. Последний был привезен в лабораторию и хранился при температуре +15—20° в 50%-ном растворе глицерина с физиологическим раствором.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Гончаров Г. Д., Новые данные в этиологии краснухи карпа. Журнал «Рыбное хозяйство», № 12, 1940.
2. Рязанцева Н. Е. и Демина Н. А., Метод обнаружения вируса кори и противокоревых антител *in vitro*. 1946.
3. Рязанцева Н. Е. и Демина Н. А., Адсорбция гриппозных антител на микробах 1946.
4. Сергеев, Рязанцева Н. Е. и Демина Н. А., Реакция агглютинации вирусом нагруженных бактерий, ЖМЭИ, 3, 1945.
5. Pliszke. Untersuchungen ü. d. Agglutinine bei Karpfen. Cbt. f. Bact., Abt. 1 Bb. I 143, 1939.
6. Roberts a. Jones. Encephalis virus «Antibody» in sera of experimentally infected animals. Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med. № 1, 49, 1942.
7. Schäperclaus u. Mann. Untersuchungen ü. d. ansteckende Bauchwassersucht d. Karpfens und ihre Bekämpfung. I—V. Z. f. Fischerei, Bd. 37, 1939.