

**ПОСТАНОВЛЕНИЕ МИНИСТЕРСТВА СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И
ПРОДОВОЛЬСТВИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ,
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

13 марта 2001 г. N 9/15

**ОБ УТВЕРЖДЕНИИ НОРМАТИВНЫХ ПРАВОВЫХ АКТОВ ПО БОРЬБЕ
С ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

На основании статей 17 и 18 Закона Республики Беларусь "О ветеринарном деле" (Ведамасці Вярхоўнага Савета Рэспублікі Беларусь, 1995 г., N 4) и в целях недопущения заноса на территорию Республики Беларусь губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь и Министерство здравоохранения Республики Беларусь ПОСТАНОВЛЯЮТ:

1. Утвердить прилагаемые Инструкцию по мерам профилактики и борьбы с губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота и Инструкцию по диагностике губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота.

2. Не применять на территории Республики Беларусь Временные методические указания по патогистологической диагностике прогрессирующей губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота, утвержденные Главным управлением ветеринарии Государственной комиссии Совета Министров СССР по продовольствию и закупкам 7 июня 1990 г., Временную инструкцию по предотвращению заноса губкообразной энцефалопатии на территорию СССР и мерам борьбы и профилактики этой болезни, утвержденную Главным управлением ветеринарии Государственной комиссии Совета Министров СССР по продовольствию и закупкам 22 октября 1990 г.

3. Настоящее постановление вступает в силу с момента включения в Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь.

Министр сельского хозяйства и
продовольствия Республики Беларусь

М.И.РУСЫЙ

Министр здравоохранения
Республики Беларусь

И.Б.ЗЕЛЕНКЕВИЧ

УТВЕРЖДЕНО
Постановление
Министерства сельского
хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь и
Министерства здравоохранения
Республики Беларусь
13.03.2001 N 9/15

ИНСТРУКЦИЯ ПО МЕРАМ ПРОФИЛАКТИКИ И БОРЬБЫ С ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Глава 1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Инструкция по мерам профилактики и борьбы с губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота (далее - Инструкция) разработана на основании статей 17 и 18 Закона Республики Беларусь от 2 декабря 1994 г. N 3423-ХІІ "О ветеринарном деле" (Ведамасці Вярхоўнага Савета Рэспублікі Беларусь, 1995 г., N 4, ст. 11) и в целях недопущения заноса на территорию Республики Беларусь губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота.

2. Настоящая Инструкция устанавливает основные положения по диагностике, мерам борьбы и предотвращению заноса на территорию Республики Беларусь губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота.

3. Настоящая Инструкция является обязательной для юридических лиц независимо от формы собственности, крестьянских (фермерских) хозяйств и физических лиц.

Глава 2. ХАРАКТЕРИСТИКА ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

4. Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота (бешенство коров, бычьей спонгиозная энцефалопатия, "бешеная корова") - медленно развивающаяся болезнь с поражением центральной нервной системы, относящаяся к прионным (медленным) инфекциям или группе трансмиссивных губкообразных энцефалопатий млекопитающих, характеризующаяся длительным (до 2,5 - 8) лет инкубационным периодом, развитием диффузной дистрофической энцефалопатии головного и спинного мозга и 100-процентным летальным исходом.

5. Возбудитель болезни - прион, агрегированный в скрепи-ассоциированные фибриллы, устойчивый к действию обычных химических и физических факторов, применяемых в ветеринарии. Инактивация приона осуществляется при температуре 133 град. С 20 минут при давлении 3 атмосферы.

6. Основным фактором передачи возбудителя инфекции является корм, содержащий прионы от больных животных. Источником губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота явилась мясо-костная мука, полученная после переработки пораженных скрепи овец <*>.

<*> Прионные (губкообразные) энцефалопатии были зарегистрированы у различных видов млекопитающих (кошек, норок, мулов, оленей, лосей, антилоп).

7. Возможность передачи прионных инфекций от животных человеку пока не доказана. Однако установлена взаимосвязь с возникновением губкообразной энцефалопатии у людей (болезнь Крейнцфельдта-Якоба), потреблявших продукты животного происхождения от крупного рогатого скота, пораженного губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота.

Глава 3. ДИАГНОСТИКА ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

8. Диагностические исследования на губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота проводятся в соответствии с Инструкцией по диагностике губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота, утверждаемой Министерством сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь и Министерством здравоохранения Республики Беларусь (далее - Инструкция по диагностике губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота).

9. Диагностика губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота основывается на комплексном анализе эпизоотологических, клинических, патологоанатомических, патологогистологических, бактериологических и вирусологических дифференциальных исследований.

Глава 4. МЕРОПРИЯТИЯ ПО ПРЕДОТВРАЩЕНИЮ ЗАНОСА ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА НА ТЕРРИТОРИЮ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

10. Юридическим лицам независимо от формы собственности, крестьянским (фермерским) хозяйствам и физическим лицам запрещаются без согласования с Главным управлением ветеринарии с Государственной ветеринарной инспекцией Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь закупка, ввоз (ввод) крупного рогатого скота, а также спермы, эмбрионов, мяса говядины, мясопродуктов и другой продукции и сырья животного происхождения, произведенных в странах, неблагополучных по губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота, используемых в животноводстве, пищевой промышленности, медицинской, парфюмерной и косметологической практике, в соответствии с Ветеринарно-санитарными правилами осуществления импорта в Республику Беларусь грузов животного происхождения и кормов для животных, утвержденными постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь от 15 августа 2000 г. N 16 "Об утверждении Ветеринарно-санитарных правил осуществления импорта в Республику Беларусь грузов животного происхождения и кормов для животных" (Национальный реестр правовых актов Республики Беларусь, 2000 г., N 91, 8/4161).

11. Животные, ввезенные из зарубежных стран независимо от эпизоотической ситуации по прионным инфекциям, и полученное от них потомство содержатся отдельной группой с обязательным контролем клинического состояния в течение не менее 24 месяцев.

12. Строго соблюдать действующие ветеринарно-санитарные правила для животноводческих помещений по принципу "пусто-занято" <*> с обязательной их дезинфекцией.

<*> "Пусто-занято" - технологический прием выращивания животных, обуславливающий их содержание группами в отдельных помещениях (боксах) на протяжении всего цикла выращивания; после перевода животных и полного освобождения помещения (бокса) проводят его ремонт и дезинфекцию на протяжении 5 дней, после чего цикл выращивания животных повторяют.

13. При наличии павших животных с подозрением на губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота проводятся следующие мероприятия:

13.1. труп животного доставляют на скотомогильник или на специально подготовленную, удаленную от фермы территорию;

13.2. отделяют голову по сочленению затылочной кости и атланта, упаковывают в двойной целлофановый пакет и немедленно доставляют в областную или республиканскую ветеринарную лабораторию (не позже 6 - 8 часов после падежа). Общее вскрытие не производится;

13.3. участок грунта, загрязненный кровью, выкапывают на глубину не менее 30 - 40 см и на расстояние 10 - 15 см (в зависимости от состояния грунта), упаковывают в целлофановый мешок и вывозят на место утилизации;

13.4. труп животного помещают в забетонированную яму Беккари глубиной не менее 3 метров или засыпают хлорной известью. Наиболее эффективным способом утилизации трупов является их сжигание;

13.5. при необходимости вынужденного или диагностического убоя подозрительных в заболевании губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота коров направляют на мясокомбинат, обязательно согласовывая график поставки и убоя этих животных только на санитарной бойне;

13.6. перед отправкой на мясокомбинат такие животные дополнительно бонитируются ушными бирками. В ветеринарном свидетельстве указывается причина диагностического убоя, а в гуртовой ведомости - номера животных. В случае вынужденного убоя в хозяйстве голова животного направляется в областную ветеринарную лабораторию согласно подпункту 13.2 настоящей Инструкции;

13.7. внутренние органы и шкуру закапывают в землю в соответствии с подпунктами 13.3 и 13.4 настоящей Инструкции; тушу хранят в холодильной камере до получения результатов диагностических исследований.

Глава 5. МЕРОПРИЯТИЯ ПО ОЗДОРОВЛЕНИЮ ХОЗЯЙСТВ (ФЕРМ), НЕБЛАГОПОЛУЧНЫХ ПО ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

14. При установлении диагноза на губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота в хозяйстве (ферме) по представлению Государственного ветеринарного инспектора района (области) решением местных исполнительных и распорядительных органов они объявляются неблагополучными и вводится карантин.

15. По условиям карантина запрещаются:

- продажа или ввод нового поголовья в неблагополучный пункт;
- перегруппировка животных без разрешения ветеринарного специалиста хозяйства;
- совместный выпас животных из неблагополучных по губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота и благополучных ферм, в том числе личного сектора, на одних пастбищах;

- вывоз фуража (сена, соломы, комбикормов и прочих кормов), к которым больные животные имели доступ. Такие корма разрешается использовать только другим видам животных (лошадям, свиньям), а при невозможности - утилизировать или сжигать.

16. Племенная работа проводится по принципу "замкнутого цикла" <*>, не допуская перевода приплода и коров на благополучные фермы.

<*> "Замкнутый цикл" - технологический прием племенной работы, обуславливающий ее проведение в условиях одного хозяйства или фермы.

17. Животных, имевших контакт с больными губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота коровами, и их потомство изолируют, дополнительно проводят бонитировку ушными бирками (ошейниками) и ведут клиническое наблюдение в течение 24 месяцев. Вывоз этих животных и их потомства допускается только на мясокомбинат.

Оптимальным методом удаления животных из стада является одномоментная сдача на мясокомбинат.

18. Навоз подвергают биотермическому обезвреживанию в течение не менее 2 лет, при этом верхние слои штабеля (бурта) обрабатывают 5-процентным раствором гипохлорида кальция, хлорамина или другими хлорсодержащими препаратами.

19. В период карантина производится только искусственное осеменение коров спермой от быков государственных племенных предприятий или из благополучных по губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота хозяйств.

20. Оздоровленными от губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота считаются хозяйства (фермы), в которых в течение 2 лет подряд не отмечалось случаев клинического проявления болезни.

21. После снятия карантина на губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота запрещается продажа или межхозяйственный обмен скота в течение 2 лет.

Глава 6. ПРАВИЛА РАБОТЫ С ПАТОЛОГИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ В ВЕТЕРИНАРНЫХ ЛАБОРАТОРИЯХ

22. Прием патологического материала (головы) от подозрительных по заболеванию на губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота коров проводят в отдельном помещении.

23. Распиливание головы и изъятие головного мозга производятся в соответствии с Инструкцией по диагностике губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота на столе с металлическим покрытием.

24. В первую очередь проводятся исследования по дифференциальной диагностике губкообразной энцефалопатии от инфекционного ринотрахеита, злокачественной катаральной горячки, бешенства, листериоза, болезни Ауески, отравления мочевиной, фосфорорганическими, хлорорганическими и ртутьсодержащими соединениями.

25. После извлечения мозга необходимо его зафиксировать в 15 - 20-процентном растворе нейтрального (или буферного) раствора формалина в соответствии с Инструкцией по диагностике губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота.

26. При получении отрицательных результатов на указанные в пункте 24 настоящей Инструкции болезни зафиксированный головной мозг направляется в Республиканское унитарное предприятие "Белорусский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского" с сопроводительным документом и результатом лабораторных исследований по исключению вирусных и бактериальных инфекций и отравлений.

27. Голову сжигают или засыпают хлорной известью и отвозят на скотомогильник (яма Беккари).

Глава 7. ПРАВИЛА РАБОТЫ С ПОДОЗРИТЕЛЬНЫМИ В ЗАБОЛЕВАНИИ И БОЛЬНЫМИ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИЕЙ ЖИВОТНЫМИ НА МЯСОПЕРЕРАБАТЫВАЮЩИХ ПРЕДПРИЯТИЯХ И МОЛОЧНЫХ ЗАВОДАХ

28. Ветеринарная служба мясокомбинатов при приемке подозрительных в заболевании губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота животных помещает их в отдельный, предварительно очищенный загон.

29. Убой подозрительных в заболевании губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота животных производится на санитарной бойне.

30. Партия крови от одновременного убоя здоровых и подозрительных в заболевании губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота животных подлежит утилизации.

31. Головной мозг после разуба головы на гильотине извлекается целиком, упаковывается в полиэтиленовые пакеты, в которые укладываются этикетки (из плотной бумаги) с указанием наименования хозяйства и инвентарного номера животного.

Патологический материал направляется экстренно в областную ветеринарную лабораторию (не позже 6 - 8 часов после убоя).

32. Туши от подозрительных в заболевании или из неблагополучных по губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота животных переводятся в отдельную холодильную (морозильную) камеру до получения результатов диагностических исследований с обязательным их биркованием.

33. Внутренние органы, желудок, кишечник, головы животных из неблагополучного хозяйства (фермы) или подозрительных по заболеванию губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота направляются на техническую переработку путем глубокого автоклавирования при температуре не ниже 133 град. С, давлении в 3 атмосферы и экспозиции не менее 60 минут.

34. Партии кровяной и мясо-костной муки, полученной от подозрительных в заболевании и больных губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота животных, реализуются только в свиноводческие или птицеводческие комплексы, не допуская поступления их в овцеводческие и животноводческие хозяйства.

35. При получении положительного диагноза туши больных губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота животных направляются на техническую утилизацию.

36. Мясо от контактировавших с больными губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота животных направляют на обезвреживание путем проварки кусками массой не более 2 кг, толщиной до 8 см в открытых или закрытых котлах в течение не менее 3 часов в соответствии с подпунктом 11.3.1 Правил ветеринарного осмотра убойных животных и ветеринарно-санитарной экспертизы мяса и мясных продуктов, утвержденных Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 27 декабря 1983 г.

37. Допускается использование мяса от клинически здоровых, но контактировавших с больными губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота животных на производство консервов с соблюдением требований соответствующих нормативов.

38. Шкуры от животных из неблагополучных по губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота хозяйств (ферм) обрабатывают в соответствии с пунктами 19 и 20 Указаний по ветеринарно-санитарной обработке заготавливаемого кожевенного и мехового сырья, утвержденных Главным управлением животноводства и ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР в редакции от 27 июля 1965 г.

39. Запрещается убой животных, больных или из неблагополучных по губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота хозяйств, на убойных пунктах (площадках), не имеющих вышеуказанных технологических требований по переработке скота.

40. Молоко из неблагополучных по губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота хозяйств (ферм) стерилизуют непосредственно в хозяйстве острым паром (проваркой) в течение не менее 30 минут и направляют на откормочные и свиноводческие комплексы.

41. На всех этапах технологического процесса по переработке сырья (загоны, кровесборные желоба и емкости, оборудованные помещения, транспорт) подлежат тщательной очистке и последующей дезинфекции 5-процентным раствором гипохлорида кальция или хлорамина.

Глава 8. ПРАВИЛА БЕЗОПАСНОСТИ СПЕЦИАЛИСТОВ И ОБСЛУЖИВАЮЩЕГО ПЕРСОНАЛА ПРИ РАБОТЕ С БОЛЬНЫМИ ИЛИ ПОДОЗРИТЕЛЬНЫМИ В ЗАБОЛЕВАНИИ ПРИОННЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ ЖИВОТНЫМИ

42. Уход за животными в неблагополучных по губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота хозяйствах (фермах), приемку такого скота на мясоперерабатывающие предприятия, убой или вскрытие, уборку и дезинфекцию

помещений, оборудования, инструментов осуществлять только в спецодежде (халате, резиновых сапогах, шапочке, фартуке, нарукавниках, анатомических перчатках).

43. Спецодежду (халаты, белье, шапочки, косынки) обезвреживают погружением на 24 часа в 0,5-процентный раствор гипохлорида кальция или хлорамина с последующим кипячением в течение 30 минут.

44. Обувь (резиновые сапоги), фартуки, нарукавники, анатомические перчатки и инструменты погружают в 5-процентный раствор гипохлорида кальция или хлорамина на 24 часа.

45. При попадании инфицированного материала на кожу это место рекомендуется обработать 3 - 5 минут 3 - 6-процентным раствором перекиси водорода или 3 минуты тампоном с вышеуказанными дезинфицирующими жидкостями с последующей тщательной промывкой (струей воды с мылом) и с последующей обработкой спиртом.

46. При загрязнении слизистых оболочек рот следует прополоскать 0,5-процентным раствором соляной кислоты или перманганата калия (1:1000), глаза промыть 1% раствором борной кислоты или перманганата калия (1:1000), закапать по 1 - 2 капли 1% раствора азотнокислого серебра. В нос закапывают 1 - 2 капли 1% раствора протаргола.

УТВЕРЖДЕНО
Постановление
Министерства сельского
хозяйства и продовольствия
Республики Беларусь и
Министерства здравоохранения
Республики Беларусь
13.03.2001 N 9/15

ИНСТРУКЦИЯ ПО ДИАГНОСТИКЕ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Глава 1. ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

1. Инструкция по диагностике губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота разработана на основании статей 17 и 18 Закона Республики Беларусь от 2 декабря 1994 г. N 3423-ХП "О ветеринарном деле" (Ведамасці Вярхоўнага Савета Рэспублікі Беларусь, 1995 г., N 4, ст. 11) и в целях недопущения заноса на территорию Республики Беларусь губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота.

2. Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота (бешенство коров, бычьего спонгиозная энцефалопатия) - медленно развивающаяся болезнь с поражением центральной нервной системы, относящаяся к прионным (медленным) инфекциям или группе трансмиссивных губкообразных энцефалопатий млекопитающих. Это медленно протекающие инфекции, при которых макроорганизм не отвечает иммунологической реакцией. К ним относятся скрепи овец, энцефалопатия норок, энцефалопатия кошек, хроническая изнуряющая болезнь мулов, оленей и лосей, энцефалопатия экзотических копытных животных (антилопы и других), а также болезнь Крейтцфельда-Якоба, куру, летальная семейная бессонница, синдром Герстмана-Штрейслера-Шейнкера у человека. Для спонгиозных энцефалопатий характерно, что возбудитель их может первоначально реплицироваться, не вызывая гибели чувствительных клеток. При этом патологические изменения проявляются поздно и только в центральной нервной системе, но не сопровождаются воспалительной реакцией. Каждая из энцефалопатий имеет сходное

прогрессирующее клиническое течение с неизбежным летальным исходом и сходные гистопатологические изменения (вакуолизация нейронов, пролиферация и гипертрофия астроглии без признаков воспалительной реакции, которая обычно встречается при других инфекциях).

3. Особенности возбудителей спонгиозных энцефалопатий человека и животных являются их очень малые размеры, имеющие молекулярную массу 28 - 30 килодальтон (далее - KD), и высокая устойчивость к химическим и физическим факторам. В ткани мозга и селезенке белки PrP²⁷⁻³² KD, полимеризуясь, образуют специфичные фибриллы, получившие название скрепи-ассоциированные фибриллы (далее - САФ). При очистке *in vitro* (в пробирочных условиях) белки PrP²⁷⁻³² KD образуют прионовые палочки. Выявление этих структур возможно при проведении диагностических исследований. Возбудитель представлен только белком без нуклеиновой кислоты и поэтому выдерживает кипячение, многократное замораживание и оттаивание, не гибнет в течение 30 минут при 115 град. С, в течение 1 часа при 90 град. С, не полностью инактивируется при 100 град. С, когда освобожден от стабилизирующих белков, но инактивируется автоклавированием (18 минут при 134 - 138 град. С или при том же режиме 6 циклов по 3 минуты). Возбудители выдерживают несколько месяцев воздействие 12-процентного формалина и рН от 2 до 10,5. В 20-процентном растворе формалина инфекционность не утрачивается 18 часов при 37 град. С. В замороженном состоянии агенты сохраняются годами, при комнатной температуре - несколько месяцев. Прионы резистентны к ультрафиолетовой радиации. 90-процентный водный раствор фенола, однако, 8 М раствор мочевины и 0,01 М раствор периодата калия существенно снижают их активность.

4. Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота появилась в результате скармливания крупному рогатому скоту мясо-костной муки, полученной при переработке туш овец, пораженных скрепи.

Глава 2. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИЗНАКИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

5. Инкубационный период при губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота составляет от 3 до 8 лет. Первые симптомы обычно появляются в возрасте от 4 до 5 лет, постепенно усиливаясь в течение 1 - 4 месяцев. Продолжительность заболевания варьирует от 2 недель до 1 года и более. У животных, пораженных этим заболеванием, отмечают симптомы общего и неврологического характера.

6. Неврологические симптомы бывают трех типов.

6.1. У животных наблюдаются изменения в поведении, чаще всего сходные со страхом, нервозностью, особенно при входе в помещение и выходе из него, агрессивность (попытки к нападению или появление свирепости), скрежет зубами, беспокойство, боязливость, стремление отделиться от стада, возбудимость, дрожание отдельных участков тела (мышц нижнего отдела шеи и плечевой области, губ, зеркальца, век, ушей) или всего тела, нераспознавание препятствий, пугливость при загоне через узкие проходы, лягание при нормальном обращении (молочный скот), частые движения ушами, облизывание носа, почесывание головы ногой, но без выраженного зуда, как при скрепи овец. В некоторых случаях при пальпировании пояснично-крестцового отдела наблюдается "эффект хруста", движение губ и вытягивание шеи.

6.2. Двигательные расстройства: нарушение координации движений, внезапные быстрые сокращения отдельных мышц или их групп, избыточная подвижность, утрата нормальной походки, рысистые движения, скольжение, загребание передними ногами, подкашивание задних ног при быстром повороте, поднятый хвост и падения, спина дугообразно изогнута, при движении, наоборот, позвоночник вогнут, хвост поднят. Нарушения становятся заметнее при напряжении или быстрой ходьбе и, наконец, могут привести к тому, что животное постоянно лежит и не может встать.

6.3. Изменение чувствительности, которая проявляется в различных видах, но чаще всего речь идет о гиперчувствительности при прикосновении, действии шума и света.

Кроме этих признаков, изменяется общее состояние животных, они худеют, снижаются удои, аппетит сохраняется, но животные с трудом поедают корм.

Указанные выше симптомы могут наблюдаться в разных сочетаниях с различной степенью выраженности. Повышения температуры не отмечают. Болезнь всегда прогрессирует и заканчивается летально. Клинические признаки могут вызвать подозрение на болезнь, но для постановки окончательного диагноза на губкообразную энцефалопатию необходимо подтверждение предварительного диагноза другими методами, в первую очередь гистологическим методом.

Глава 3. ПАТОЛОГОАНАТОМИЧЕСКИЕ И ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ

7. При вскрытии животных обнаруживают двусторонние симметричные дегенеративные изменения в сером веществе стволовой части мозга, в нейроглии - вакуоли яйцевидной или округлой формы, реже - менее правильной формы с неотчетливыми отверстиями по краям. Появляются также перикарион нейронов и некоторые стволовые ядра (особенно дорсальные ядра блуждающего нерва), отмечают сетчатость. Вестибулярные ядра и красное ядро также часто содержат крупные, отчетливо различимые единичные или множественные цитоплазматические вакуоли.

8. Характерные изменения отмечают при гистологическом исследовании. При этом выявляются двусторонние симметричные дегенеративные изменения в некоторых участках серого вещества ствола головного мозга. В нейропиле отмечается умеренное количество дискретно овоидных вакуолей или микрополостей. Нейрональные перикарионы и асконны ядер ствола мозга содержат крупные, хорошо ограниченные внутрицитоплазматические вакуоли, которые бывают единичными или множественными, иногда явно растягивая сому клеток, образуя нейроны с узкой полоской цитоплазмы. Содержимое вакуолей не окрашивается и остается прозрачным при окраске на гликоген в парафиновых срезах и на липиды в криосрезах. Сходные изменения отмечают при скрепи овец, болезни Крейнцфельдта-Якоба человека и других губкообразных энцефалопатиях человека и животных.

Глава 4. ЭПИЗООТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

9. Причиной возникновения эпизоотии губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота явилась мясо-костная мука, содержащая белки больных жвачных животных. Имеется риск для телят, родившихся от больных коров в течение 3 лет после прекращения скормливания мясо-костной муки.

10. Чувствительность к заражению животных губкообразной энцефалопатией в значительной степени зависит от индивидуальной предрасположенности к возбудителю. Вероятность заболевания теленка, родившегося от пораженной коровы, намного выше, чем у теленка, родившегося от здоровой коровы. Из-за длительного инкубационного периода сложилась такая ситуация, при которой находившийся в кормах возбудитель мог в течение 3 - 8 лет инфицировать восприимчивую субпопуляцию крупного рогатого скота, вызывая губкообразную энцефалопатию без проявления клинических признаков.

Глава 5. ДИАГНОСТИКА ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

11. Установление диагноза на губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота включает:

- 11.1. изучение клинических признаков;
- 11.2. изучение эпизоотологической ситуации;
- 11.3. проведение патогистологических исследований;
- 11.4. проведение электронно-микроскопического исследования;
- 11.5. проведение иммунохимических исследований (иммуноблоттинг);
- 11.6. проведение биопробы на лабораторных животных.

12. Для диагностических исследований в специализированную лабораторию по изучению губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота посылают:

мозг крупного рогатого скота после исследования на бешенство, другие вирусные инфекции и отравления после неподтверждения диагноза;

мозг крупного рогатого скота из мясокомбинатов (0,01% от забитых животных старше 3 лет).

Глава 6. ПОРЯДОК ОТБОРА ПРОБ МОЗГА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

13. Диагностика губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота проводится только после гибели или вынужденного убоя животных. В этой связи важным условием являются правильный отбор проб, их фиксация, транспортировка и хранение.

14. Патологический материал (головной мозг) берут от животных с клиническими признаками поражения центральной нервной системы. При этом головной мозг для гистологических, электронно-микроскопических и иммунохимических исследований необходимо брать у животных сразу после их убоя или гибели до наступления лизиса тканей или размножения другой сопутствующей микрофлоры.

15. Для извлечения мозга у крупного рогатого скота необходим инструментарий согласно приложению 1.

16. Животных с клиническими признаками губкообразной энцефалопатии умерщвляют различными способами: введением избыточной дозы барбитурата - раствором барбитала (2 - 3 г на 15 - 20 мл воды), внутримышечным введением раствора гемоспоридина (1 - 2 г на 15 - 20 мл воды), 20 - 30 мл 25-процентного раствора сернокислой магнезии транстаракально в область сердца.

17. Голову отделяют от шеи по атланта-затылочному сочленению. Труп животного сбрасывают в забетонированную яму Беккари глубиной не менее 3 метров и засыпают хлорной известью. Наиболее эффективным способом утилизации трупов является их сжигание. Отделенную от трупа голову упаковывают в металлическую пленку, помещают в металлический контейнер, желательно со льдом, транспортируют при температуре +2 - 15 град. С в ветеринарную лабораторию или специализированную лабораторию по изучению губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота.

18. Голова должна быть доставлена в исследовательскую лабораторию в течение 12 - 36 часов, поскольку в результате размножения микроорганизмов в тканях мозга или автолиза мозг становится непригодным для гистологического исследования. Замороженный при транспортировке или при хранении в холодильнике головной мозг также непригоден для проведения анализа, так как в результате замораживания возникают артефакты, мешающие диагностике. При длительной транспортировке или в жаркую погоду целесообразно в контейнер положить лед.

19. Сразу после доставки в исследовательскую лабораторию с дорсальной части головы крупного рогатого скота удаляют кожу. Имеется два способа извлечения головного мозга из черепной коробки.

При первом способе голову зажимают в тиски, а при втором проводят ручную фиксацию на столе на листе бумаги, который кладется для предотвращения скольжения.

После фиксации осторожно, чтобы не повредить мозг, согласно приложению 2 распиливают лобную кость с помощью анатомической пилы (разрез 1). Затем производят надрезы лобной кости с каждой стороны от точек, находящихся на оси глазных ям, продлевая их каудально до наружных слуховых проходов. Продлевают эти разрезы каудально до большого затылочного отверстия также осторожно, чтобы исключить повреждение мозга (разрез 2). Делают сагитальный разрез посередине лобной и затылочной костей до большого затылочного отверстия (разрез 3). Затем разделяют и удаляют распиленные левую и правую части черепной коробки. Рассекают и снимают твердую мозговую оболочку. Затем необходимо перевернуть голову, чтобы под действием силы тяжести мозг отделился от основания черепа. Продолжить работу, продвигаясь от каудального надреза вперед; для перерезания нервов вентральной стороны черепа использовать скальпель. После извлечения мозга фиксацию проводят путем несплошных разрезов мозга на пластины или мозг целиком помещают в фиксирующий раствор следующего состава: однозамещенный фосфат натрия, моногидрат ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) - 4,0 г; двузамещенный фосфат натрия, безводный (Na_2HPO_4) - 6,5 г; формалин (40% HCHO) - 100,0 мл; дистиллированная вода - 900,0 мл. После растворения солей в воде добавляют формалин и размешивают, при этом pH раствора должен быть нейтральным, около 7,0.

20. Фиксацию мозга осуществляют следующим образом.

Учитывая особенность проявления губкообразной энцефалопатии (отечность и расплавление нейроглии), фиксация мозга должна быть экстренная и жесткая, позволяющая исключить артефакты и обеспечить максимально достоверную диагностику.

20.1. Для фиксации головного мозга путем использования несплошных поперечных разрезов на извлеченном головном мозге необходимо сделать несплошные поперечные разрезы в виде пластин толщиной 5 - 8 мм (схема участков головного мозга и его разрезов согласно приложениям 3 и 4). Более толстые пластины делать нельзя, так как формалин проникает и фиксирует ткани только на толщину не более 8 мм. Между пластинами ткани проложить гигроскопический материал (вату, марлю, фильтровальную бумагу).

Для фиксации головного мозга, разрезанного на продольные полосы, рекомендуется использовать 15 - 20-процентный раствор нейтрального формалина (150 - 200 мл формалина и 800 - 850 мл воды, параформа - соответственно в 2,5 раза меньше). Срок фиксации - 3 - 4 суток. Также можно проводить фиксацию мозга в растворе, предусмотренном пунктом 18 настоящей Инструкции.

20.2. Для фиксации головного мозга его целиком помещают в фиксирующий раствор в соответствии с пунктом 19 настоящей Инструкции.

20.3. Зафиксированный мозг помещают в ударопрочную емкость, при этом объем фиксирующего раствора должен быть в 10 раз больше объема мозга. В таком виде материал должен храниться не менее 2 недель, после чего его необходимо доставить в лабораторию вирусных и прионных инфекций крупного рогатого скота Республиканского унитарного предприятия "Белорусский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского".

Глава 7. ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА

21. Сущность метода заключается в микроскопическом определении степени выраженности и характера изменений в головном мозге животных, пораженных губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота.

22. Аппаратура, материалы и инструменты, используемые для гистологической обработки и окраски тканей, - согласно приложению 5.

23. Патологогистологическую обработку материала проводят в следующей последовательности.

23.1. Взятие материала. Взятие материала от животных производят из фиксированного мозга в соответствии с пунктами 18 и 19 настоящей Инструкции. Вырезают кусочки

зафиксированных тканей мозга в виде пластинок не толще 0,5 - 1 см из различных участков органа.

23.2. Фиксация материала. Патологический материал обязательно должен быть этикетирован и зафиксирован немедленно и непосредственно после взятия (но не позднее 12 часов). Категорически запрещается патологический материал замораживать.

23.3. Уплотнение материала. Уплотнение материала проводят при помощи прозрачных сред (целлоидина, парафина).

Уплотнение материала проводят в основном путем заливки в прозрачные среды (парафин, целлоидин). Для заливки материала в парафин необходимы: спирты (50, 60, 70, 80, 90, 100 град.), 100-градусный хлороформ, хлороформ, хлороформ-парафин и парафин (2 - 3 порции).

Разведение спиртов проводят согласно приложению 6 к настоящей Инструкции.

Абсолютный (100 град.) спирт приготавливают путем добавления к 96 град. спирту безводного медного купороса (порошок серовато-белого цвета). Применяя для этой цели кристаллический медный купорос ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$), его необходимо предварительно обезводить путем медленного прокаливания (на электроплитке, газе). Этот процесс ведут в фарфоровой ступке при постоянном помешивании во избежание образования трудно разбиваемых комков фарфоровой и стеклянной палочкой - нельзя металлической или пластмассовой. Прокаливание длится 2 - 3 часа до получения порошка белого цвета, но не серого. Прокаленный купорос гигроскопичен, поэтому его хранят в банке или склянке с притертой пробкой. После охлаждения он пригоден к работе.

Процесс прокаливания медного купороса нужно вести в вытяжном шкафу, а при отсутствии последнего пользоваться ватно-марлевыми повязками.

В банку или склянку наливают необходимое количество спирта, затем добавляют обезвоженный медный купорос из расчета 10 - 15 процентов к объему спирта в течение 1 - 2 суток, периодически энергично встряхивают. Белый цвет порошка переходит в голубой вследствие поглощения купоросом воды. Этот процесс повторяют несколько раз до тех пор, пока после внесения спирта порошок не приобретет синее окрашивание, каждый раз сливая спирт в чистую посуду. Готовый абсолютный спирт переливают в чистую сухую емкость, после чего он годен к работе.

Парафин поступает, как правило, гомогенизированный. Для придания ему пластичности в расплавленный парафин рекомендуется добавлять пчелиный воск до 5 процентов, что облегчает получение качественных и тонких срезов.

Кусочки мозга толщиной 0,5 см выдерживают в каждом из реагентов по 3 - 4 часа, при использовании автомата для гистологической обработки тканей типа АТ-4 или АТ-5; затем - в хлороформ-парафине 2 - 3 часа при температуре 37 град. С; парафине I и II - по 45 - 60 минут при температуре 58 - 60 град. С. После этого заливают в формочки (чашки Петри) новую порцию парафина и помещают в него кусочки.

После появления достаточно плотной пленки застывшего парафина формочки с кусочками мозга погружают в емкость с холодной водой для равномерного охлаждения и уплотнения.

Не рекомендуется ставить формочки в холодильник, так как при очень быстром охлаждении нарушается структура парафина, который получается крошковатым и плотным. При соблюдении приведенных условий парафин после заливки представляет однородную массу. Наличие пузырей воздуха, молочно-белых зернистых участков свидетельствует о недостаточном удалении промежуточных сред или неравномерном охлаждении. Если проведено неудовлетворительное обезвоживание или заливка охлажденным парафином и кусочки материала будут вылуциваться из парафина, необходимо освободить кусочки от парафина и залить их вторично (начиная со спирт-хлороформа).

При отсутствии аппаратов АТ-4 или АТ-5 применяется сокращенная схема заливки - спирт 50 град., 75 град., 96 град., 100 град. и так далее с экспозицией в каждом по 6 - 12 часов, что приводит к удлинению срока обработки до 3 - 5 суток.

В последующем вырезают прямоугольные блоки, оставляя вокруг кусочка слой парафина шириной 1 - 1,5 мм. Для наклеивания блоки кладут на деревянный кубик и вдвигают между ними горячий шпатель. Дополнительно оплавливают по краям этим же шпателем. Блоки должны соответствовать колодкам и не выступать за их края. Деревянные кубики готовят из твердых пород дерева (березы, бука), можно из паркетных дощечек.

Достоинством метода заливки в парафин является относительная быстрота, возможность изготовления тонких (2 - 3 мкм) серийных срезов, а недостатком - некоторое уменьшение объема материала и необходимость воздействия на материал относительно высокой температуры.

Метод заливки патологического материала в целлоидин из-за его дефицита, длительности и трудоемкости в практических условиях используется редко.

23.4. Изготовление срезов (микротомирование):

При изготовлении срезов следует правильно использовать микротомные ножи, которые выпускают трех марок: "а" - из мягкой стали для целлоидиновых блоков (плосковогнутые), "б" - из более твердой стали для резки целлоидиновых и парафиновых блоков (имеет форму прямоугольного треугольника), "в" - из самой твердой стали для изготовления парафиновых и замороженных срезов (форма равнобедренного треугольника).

Марка стали обычно указывается на обутке ножа.

23.5. Парафиновые срезы готовят следующим образом:

23.5.1. парафиновый блок (на колодке) зажимают в объектодержатель микротом перпендикулярно ножу;

23.5.2. при помощи рукояток переместить рамки объектодержателя так, чтобы поверхность блока была горизонтальной ножу;

23.5.3. укрепить микротомный нож в поперечном положении, чтобы нож и края блока были параллельны;

23.5.4. установить микровинт на деление 20 - 30 микрон, подвести блок до легкого соприкосновения с ножом и закрепить, произвести грубую зачистку блока, чтобы обнаружилась ткань кусочка, краем ножа;

23.5.5. объектодержатель слегка сдвинуть, поставить нож ближе к середине;

23.5.6. подвести объектодержатель с блоком до легкого соприкосновения с ножом, закрепить его;

23.5.7. изготовить гистосрез.

Качество срезов зависит от величины и плотности объекта, твердости парафина, окружающей температуры и других факторов. Поэтому в одних случаях срезы получаются при быстром толчкообразном, в других, наоборот, при медленном и равномерном движении ножа. При изготовлении парафиновых срезов возможны дефекты согласно приложению 7 к настоящей Инструкции;

23.5.8. полученные срезы при помощи мягкой кисточки (слегка смоченной водой) или препаровальной иглы снимают с ножа и переносят на планшет или гладкую бумагу (лучше черную). Срезы подписывают с указанием объекта, с которого получены срезы, или напротив среза располагают соответствующий блок, с которого он сделан.

Перед расправлением срезов предварительно на обезжиренные предметные стекла наносят белковый клей, предназначенный для прикрепления их к стеклам;

23.5.9. для приготовления клея используют свежий яичный белок без примесей. 2 части белка взбивают тщательно вилкой до состояния пены, добавляют 1 часть глицерина, 1 кристаллик камфоры или тимола и размешивают. Смесь готова к использованию через 1 - 2 дня. На предметное стекло наносят маленькую каплю клея, растирают пальцем досуха и проносят над пламенем спиртовки 3 - 5 раз, пока не исчезнет помутнение на стекле.

Для расправления срезы переносят в емкость (чашку, бобовидный тазик) с теплой (46 - 48 град. С) дистиллированной водой, температуру контролируют термометром и расправляют. Более горячая вода приводит к расплавлению парафина. Лучше использовать спирт 70 град. С. Срезы кладут на воду или спирт той стороной, которая была обращена к ножу;

23.5.10. характер расправления серийных срезов несколько иной. Серию срезов вначале плавно подносят к краю емкости, затем несколько ускоренным движением вперед касаются воды нижним краем и при таком же движении вдоль краев чашки опускают на воду поочередно следующие срезы. Подготовленное ранее предметное стекло опускают концом в воду, подводят под срезы и подхватывают их препаровальной иглой за один из краев, затем плавно вынимают из воды стекло вместе со срезом. Остатки воды вокруг среза удаляют фильтровальной бумагой, ставят стекла вертикально в подставки и оставляют для сушки на несколько часов при комнатной температуре во избежание отклеивания их во время окраски. Допускается при небольшом количестве патологического материала изготовление замороженных срезов.

23.6. Окрашивание гистосрезов проводят в следующей последовательности:

23.6.1. окрашивание проводится с целью оптической дифференцировки структурных элементов тканей. Используемые в гистологической технике краски делятся на основные (ядерные, кислые (цитоплазматические, фоновые), нейтральные и специальные.

Из группы основных красок наибольшее применение имеют приготовленные из гематоксилина. Наиболее употребительными являются гематоксин Эрлиха и гематоксин Бемера;

23.6.2. гематоксин Эрлиха состоит: из гематоксилина - 2 г, спирта 96 град. - 100 мл, воды дистиллированной - 100 мл, глицерина - 100 мл, квасцов алюмокалиевых - 3 г и кислоты уксусной ледяной - 10 мл. Приготовленный раствор гематоксилина Эрлиха наливают в широкогорлую банку, завязывают марлей 3 - 4 слоя и оставляют на свету для созревания на 3 - 4 недели, периодически взбалтывая. Созреваемая краска имеет темно-вишневый цвет, приятный запах, оставляет след на стекле. Такой раствор фильтруют и хранят в плотно закрытой посуде. Срезы окрашивают в течение 3 - 5 минут;

23.6.3. гематоксин Бемера готовят следующим образом: 40 г алюмокалиевых квасцов растворяют в 400 мл дистиллированной воды при нагревании, охлаждают и фильтруют в широкий стакан, затем добавляют 20 мл 10-процентного спиртового раствора гематоксилина (на 96-градусном спирте), завязывают марлей и оставляют для созревания, как и гематоксин Эрлиха.

При приготовлении гематоксилинов все компоненты добавляют в указанной последовательности после растворения предыдущего реактива. Перед каждым употреблением гематоксин необходимо фильтровать во избежание выпадения осадков в срезах;

23.6.4. из кислых красок постоянное применение имеет эозин К (калий) или Н (натрий) в 0,25 - 0,5-процентных водных растворах. Концентрацию рабочего раствора определяют опытным путем. Для этого окрашивают несколько срезов в различных растворах краски (0,1; 0,2; 0,3% и так далее) в течение 2 - 5 минут, проверяют под микроскопом степень окрашивания и устанавливают оптимальную концентрацию.

КонсультантПлюс: примечание.

В официальном тексте документа, видимо, допущена опечатка: должно быть "Na (натрий)", а не "Н (натрий)".

Все краски для гистологических работ готовят только на дистиллированной воде.

23.7. Окраска срезов гематоксин-эозином.

23.7.1. Этот метод позволяет определить не только наличие патологических изменений, но и ориентировать на необходимость применения других дополнительных методов для окончательного установления диагноза (например, по Ван-Гизону - на соединительную ткань, ретикулиновых волокон - по Футу, липидов - Суданом).

23.7.2. Окраску гистосрезов проводят в следующем порядке:

депарафинирование (ксилол - 3 порции, спирт 100 град., 96 град., 70 град., вода дистиллированная - 2 порции) по 2 минуты в каждом растворе;

промыть в водопроводной воде 60 - 90 секунд;

дифференцировка в солянокислом спирте (1-процентный раствор соляной кислоты в 70-градусном спирте) до появления розового цвета срезов (30 - 60 секунд);

промыть в водопроводной воде (лучше в двух порциях) 3 - 5 - 10 минут до посинения срезов;

окраска раствором эозина - 2 - 5 минут;

промыть в дистиллированной воде 40 - 60 секунд;

обезвоживание в спиртах возрастающей крепости (70 град., 96 град., 100 град.) по 1 минуте;

просветление гистосрезов в карбол-ксилоле 2 минуты;

окрашенные гистосрезы переносят в ксилол на 1 - 2 минуты, после чего заключают в бальзам.

Для просветления срезов используют карбол-ксилол в соотношении 1:4 - 1:10 (по объему). Для этого расплавляют в термостате (при 56 - 60 град.) кристаллическую карболовую кислоту (фенол) и смешивают с ксилолом, который также предварительно ставят в термостат.

23.8. Для заключения срезов под покровное стекло чаще применяется канадский или пихтовый бальзам;

23.8.1. затвердевшую смолу помещают в широкогорлую банку, заливают ксилолом (5:1) и ставят в термостат при 37 град. С. Бальзам должен иметь консистенцию жидкого мела. Кедровый бальзам - низкого качества, так как быстро кристаллизуется под покровным стеклом и гистопрепараты невозможно долго хранить;

23.8.2. при заключении срезов каплю бальзама наносят на предметное стекло под углом 45 град. и, когда бальзам растечется по краю, плавно его опускают на срез, поддерживая противоположный край иглой. Излишки бальзама удаляют со стекла салфеткой или тряпочкой, слегка смоченной ксилолом. Препарат кладут на планшет горизонтально на 24 - 48 часов, желательно под груз. Стекла этикетировать. Подписи делают тушью или чернилами по стеклу. При этом методе окраски ядра клеток лиловые или синие, цитоплазма - красного цвета различного тона, соединительная ткань - светло-розового цвета.

24. Характерные (патогномоничные) для губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота признаки согласно приложениям 8 - 10:

- диффузная вакуолизация и расплавление нейроглии (в виде множественных разной формы и величины сот);

- коагуляция цитоплазмы в нейронах, проявляющаяся в виде плотного сгустка с повышенной оксифильностью (красного цвета);

- наличие пикноза, рексиса и частичного лизиса ядер нейронов, иногда криброза цитоплазмы (множественные мелкие вакуоли);

- гипертрофия эндотелия кровеносных сосудов с явлениями кариопикноза и рексиса);

- наличие периваскулярных круглоклеточных астроцитных и макрофагальных элементов типа негнойного энцефалита (напоминающие "висна" у овец);

- явления вакуолизации нейронов (перстневидные клетки) встречаются редко и слабо выражены, тогда как при "скрепи" у овец они носят более выраженный характер;

- наличие вокруг нейронов явлений отека и вакуолизации;

24.1. подтвержденным на губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота диагноз следует считать только на основании комплексного анализа эпизоотологических, клинико-анатомических и патогистологических исследований. При этом следует сравнивать гистопрепараты отделов головного мозга, полученных от заведомо здоровых животных (контроль);

24.2. сомнительным считается диагноз при наличии асимметричных признаков вакуолизации в нейроглии или в нейронном околоядерном пространстве;

24.3. отрицательный диагноз ставится в случае отсутствия гистологических изменений в основных участках головного мозга, необходимых для диагностики, согласно приложениям 11 - 13), а при подозрении - и остальных участков мозга;

24.4. Дополнительными методами диагностики губкообразной энцефалопатии являются электронно-микроскопический метод, иммуноблоттинг, а также иммуногистохимический метод выявления патологических PrP-белков в обычных, фиксированных в формалине срезах, который проводится Всероссийским научно-исследовательским институтом защиты животных (г.Владимир, Российская Федерация).

Глава 8. ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЙ

25. Выявление (САФ) в тканях центральной нервной системы (далее - ЦНС) методом получения мазков-отпечатков осуществляется путем их изучения после воздействия на мазок различных ферментов и дальнейшего их просмотра под электронным микроскопом.

25.1. Исследования проводят в следующем порядке:

приготовление исходных концентрированных и рабочих растворов;

получение мазков-отпечатков;

обработка исследуемых проб;

контрастирование;

микроскопия;

учет результатов.

25.2. Оборудование, реактивы и приготовление растворов - согласно приложению 14.

25.3. Постановка реакции проводится в следующем порядке:

25.3.1. в исследуемой ткани мозга (лобная, височная, затылочная, теменная части коры полушарий большого мозга, кора мозжечка) делают срез длиной не менее 1 см;

25.3.2. электронно-микроскопические сеточки, покрытые фармваруглеродной подложкой, предварительно смоченные в бидистиллированной воде и / или 2-процентном растворе додецилсульфата натрия (далее - ДСН) в течение 1 минуты, помещаются на "свежий" срез мозга на 1 минуту;

25.3.3. в 3 чашки Петри вносят по 200 мкл растворов ДСН, трипсина и протеиназы К соответственно. Полученные на сеточках мазки-отпечатки накладывают отпечатком вниз в капли соответствующих растворов, накрывают крышкой, помещают в термостат и инкубируют в течение 30 минут при 37 град. С;

25.3.4. для каждого вида обработки используют по 4 электронно-микроскопические сеточки. Отдельные сеточки проводят последовательно через обработку всеми тремя реагентами;

25.3.5. после обработки сеточки промывают дистиллированной водой (5 раз по 30 секунд);

25.3.6. для контрастирования сеточки с мазками-отпечатками помещают в 5-процентный раствор уранил ацетата на 15 - 20 минут, затем интенсивно промывают под проточной дистиллированной водой и высушивают на фильтровальной бумаге;

25.3.7. исследование мазков-отпечатков проводят на электронном микроскопе при ускоряющем напряжении 80 кВ и инструментальном увеличении 15000 - 60000;

25.3.8. учет результатов проводят путем сравнительного электронно-микроскопического изучения мазков-отпечатков мозга в сочетании с обработкой ДСН, трипсином и протеиназой К, что позволяет идентифицировать САФ из общего пула трубчато-филаментозных образований, выявляемых в ЦНС. При этом, чем более выражена "жесткость" ферментативной обработки, тем ниже вероятность ошибки и выше возможность обнаружения таких специфических фибриллярных структур.

После описанной обработки при электронно-микроскопическом обследовании сеточек в мазках-отпечатках сохраняются только аномальные филаментозные спиральные структуры - САФ, устойчивые к воздействиям, модифицирующим белковые макромолекулы. Обычно САФ представлены относительно однородной по морфологии популяцией: имеют диаметр 10 - 20 нм и состоят из нескольких (2 - 4) спирально закрученных протофиламентов, перекрещивающихся друг с другом через одинаковые интервалы 50 - 150 нм. Длина САФ может варьировать в зависимости от "жесткости" ферментативной обработки в пределах от 100 - 200 нм до 1,5 - 2 микрон. Реже РrР-структуры могут быть представлены отдельно лежащими глобулами, палочками и / или другими палочковидными структурами. Обнаружение протеазо-устойчивых структур свидетельствует о наличии прионовой инфекции в ЦНС.

26. Выявление прионовых палочек в тканях центральной нервной системы методом негативного контрастирования осуществляют путем их ферментативного выделения с последующим просмотром под электронным микроскопом.

26.1. Исследование проводят в следующем порядке:

приготовление исходных концентрированных и рабочих растворов;
обработка исследуемых проб (выделение и очистка белковых структур);
ферментативная обработка белковых структур;
контрастирование;
микроскопия;
учет результатов.

26.2. Оборудование, реактивы и приготовление растворов - согласно приложению 15.

26.3. Постановка реакции проводится в следующем порядке:

26.3.1. отбирают образец ткани головного мозга (лобная, височная, затылочная, теменная части коры полушарий большого мозга, кора мозжечка, подкорковые ядра) массой 5 г;

26.3.2. образцы мозга измельчают и тщательно гомогенизируют в гомогенизаторе Даунса (20 тракций);

26.3.3. готовят 10% мозговую суспензию на растворе 1 согласно приложению 15 с добавлением 1 - 2 капель изопропанола и центрифугируют при 22000 x g, 30 минут, 4 град. С;

26.3.4. отбирают надосадочную жидкость и центрифугируют при 215000 x g, 2 часа, 4 град. С;

26.3.5. осадок гомогенизируют в гомогенизаторе Даунса (20 тракций) и разводят раствором 2 в соответствии с приложением 15;

26.3.6. суспензию центрифугируют при 215000 x g, 2,5 часа, 4 град. С;

26.3.7. полученный осадок растворяют в том же растворе (раствор 2), добавляют протеиназу К до конечной концентрации 20 мкг/мл и инкубируют в течение 2 часов при 37 град. С;

26.3.8. после ферментативного протеолиза материал помещают в эппендорф и центрифугируют при 6000 оборотов/минуту, 15 мин при 4 град. С;

26.3.9. осадок разводят буфером STE, рН 7,4 и повторно центрифугируют при 6000 оборотов/минуту, 15 минут при 4 град. С;

26.3.10. подобную операцию желательнее проводить еще 1 - 2 раза, при этом потери белка составляют не более 5 процентов;

26.3.11. результирующий осадок разводят в 50 мкл буфером STE, рН 7,4 и хранят до использования при -20 град. С;

26.3.12. аликвоту полученной суспензии (5 - 10 мкл) наносят на электронно-микроскопические сеточки, покрытые формваруглеродной подложкой, и инкубируют 1 минуту при комнатной температуре;

26.3.13. затем сеточки промывают дистиллированной водой (5 раз по 30 секунд);

26.3.14. для контрастирования сеточки помещают в 5% раствор уранил ацетата на 15 - 20 минут, затем интенсивно промывают под проточной дистиллированной водой и высушивают на фильтровальной бумаге;

26.3.15. исследование образцов проводят на электронном микроскопе при ускоряющем напряжении 80 кВ и инструментальном увеличении 15000 - 60000;

26.3.16. учет результатов проводят после обработки, в исследуемых образцах центральной нервной системы сохраняются только аномальные PrP-структуры, в виде везикул, глобул, палочек и филаментов, состоящие из белка PrP²⁷⁻³². Обычно PrP-структуры представлены относительно однородной по морфологии популяцией палочкообразных частичек диаметром от 10 до 25 нм и длиной от 100 - 200 до 500 нм. Выявление в исследуемых образцах аномальных PrP-структур позволяет судить о наличии прионовой инфекции в ЦНС.

27. Диагностика прионовых инфекций методом ультратонких срезов осуществляется путем обнаружения дегенеративно-деструктивных изменений в тканях ЦНС методом электронной микроскопии.

27.1. Исследование проводят в следующем порядке:

фиксация материала;

обезвоживание;

полимеризация;

ультрамикротомия;

контрастирование;

микроскопия;

учет результатов.

27.2. Оборудование, реактивы и приготовление растворов - согласно приложению 16.

27.3. Постановка реакции проводится в следующем порядке:

27.3.1. из ткани мозга (лобная, височная, затылочная, теменная, части коры полушарий большого мозга, кора мозжечка, подкорковые ядра и т.д.) вырезают кусочки объемом 0,5 куб.см и немедленно помещают в пробирку с 2,5% глутаровым альдегидом на 5 - 10 минут при 0 град. С;

27.3.2. извлеченные из глутарового альдегида кусочки мозга нарезают бритвенным лезвием на блоки объемом 1 куб.мм и снова помещают в 2,5% глутаровый альдегид на 2 часа при +4 град. С;

27.3.3. фиксированные кусочки мозга промывают в 3 сменах фосфатного буфера, охлажденного до +4 град. С, в течение 15 минут;

27.3.4. кусочки мозга дополнительно фиксируют в течение 1 часа в 1% OsO₄;

27.3.5. для обезвоживания кусочки мозга помещают в 70% этанол по 10 минут 2 раза; 96% этанол - по 10 минут 2 раза; 100% этанол - по 20 минут 2 раза; ацетон - по 20 минут 2 раза;

27.3.6. обезвоженные кусочки мозга помещают в смесь аралдитов, разведенную равным объемом ацетона, на 12 часов при комнатной температуре;

27.3.7. кусочки мозга переносят 3 - 4 часа в смесь аралдитов с добавлением 4% дибутилфтолата;

27.3.8. кусочки мозга помещают в капсулы, заливают свежей смесью аралдитов на 24 часа при +70 град. С для полимеризации;

27.3.9. блоки с образцами затачивают в виде пирамидки бритвенным лезвием под контролем бинокулярной лупы;

27.3.10. срезы готовят на ультрамикротоме и помещают на опорные электронно-микроскопические сеточки;

27.3.11. для контрастирования сеточки со срезами помещают в 5% раствор уранил ацетата на 15 - 20 минут, затем интенсивно промывают под проточной дистиллированной водой и высушивают на фильтровальной бумаге;

27.3.12. в чашку Петри вносят каплю раствора цитрата свинца и рядом с каплей помещают 5 - 7 гранул NaOH или KOH;

27.3.13. электронно-микроскопическую сеточку помещают срезом вниз в каплю раствора на 15 - 20 минут, промывают водой и высушивают;

27.3.14. исследование ультратонких срезов проводят на электронном микроскопе при ускоряющем напряжении 80 кВ при увеличении 15000, 30000, 45000;

27.3.15. учет результатов при диагностике прионовой инфекции в ЦНС методом ультратонких срезов основывается на обнаружении дегенеративно-деструктивных изменений в нейронах головного, реже спинного, мозга, спонгиоза серого и белого вещества мозга, астроглиоза (гипертрофии астроцитов и их пролиферации) и амилоидоза (отложение амилоидных бляшек в стенках сосудов и паренхиме мозга). Обнаружение этих патогномических признаков заболевания свидетельствует о развитии прионовой инфекции в ЦНС.

Глава 9. ВЫЯВЛЕНИЕ ПРИОНОВОГО БЕЛКА PrP²⁷⁻³² МЕТОДОМ ИММУННОГО БЛОТИНГА

28. Исследование проводят в следующем порядке:

приготовление исходных концентрированных и рабочих растворов;

обработка исследуемых проб;

приготовление пластины 12% ДСН-полиакриламидного геля;

электрофорез прионов;

перенос PrP с полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную бумагу и приготовление полос шириной 0,5 см;

обработка нитроцеллюлозных полос исследуемыми образцами ЦНС;

учет результатов.

28.1. Оборудование, реактивы и приготовление растворов - согласно приложению 17.

28.2. Постановка реакции осуществляется следующим образом:

28.2.1. концентрированный препарат PrP²⁷⁻³² в объеме 100-120 мкл и содержанием белка 500 мкл (5 мг/мл) обрабатывают лизирующим буфером в количестве 1/4 от объема образца и вирусные белки разгоняются в додецилсульфате натрия - полиакриламидном геле (далее - ДСН-ПААГ) (электрофорез проводится по методу Лэммли). Электрофорез проводят в течение 16 - 18 часов при напряжении 40 В и силе тока 7 мА;

28.2.2. после окончания электрофореза гель осторожно снимается со стекла. С одного края обрезается полоска геля шириной 2 см для проверки качества разделения белков;

28.2.3. остальная часть геля замачивается на 30 минут в буфере для переноса, здесь же замачивается нитроцеллюлозный фильтр, крупнопористая фильтровальная бумага и поролоновые прокладки;

28.2.4. после истечения указанного периода времени готовится кассета для переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану. Для этого на поролоновую прокладку последовательно укладывают крупнопористый фильтр, нитроцеллюлозную бумагу, гель, фильтровальную бумагу и опять поролоновую прокладку. Вся кассета зажимается плотно между двумя пористыми пластинами из оргстекла;

28.2.5. кассета опускается в камеру для переноса (нитроцеллюлозная мембрана со стороны (+), гель со стороны (-), которая заливается тотчас буфером для переноса;

28.2.6. электрофорез проводят в течение 2 часов при напряжении 160 В и силе тока 550 мА;

28.2.7. после окончания электрофореза нитроцеллюлозные мембраны промываются в фосфатном буфере (далее - PBS) с 0,05% Твин-20 в течение 30 минут. С одного края мембраны отрезается полоска шириной 5 мм и окрашивается 0,2% амидо черным для проверки качества переноса;

28.2.8. нитроцеллюлоза высушивается на воздухе и хранится между листами фильтровальной бумаги при +4 град. С до использования.

Исследуемые образцы (лизаты мозга, селезенки) в разведении 1:10 в твин-фосфатном буфере (далее - TS-PBS) с 1% этилового спирта добавляют к стрипам шириной 5 мм и инкубируют при 16 - 18 град. С при комнатной температуре, стрипы отмывают 3 раза TS-PBS и инкубируют в течение 1 часа с коммерческими моноклональными антителами IgG при 37 град. С в TS-PBS. Затем стрипы опять трижды отмываются TS-PBS и реакция визуализируется путем добавления к стрипам субстрата (PBS - 0,5 мг/мл диаминобензидин и 0,5 мг/мл H₂O₂) до появления полос. Реакция останавливается промыванием стрипов под водопроводной водой. После высушивания стрипов на воздухе проводится учет результатов.

Выявление специфических полос в стрипах, соответствующих по электрофоретической подвижности контрольному образцу PrP, дает основание судить о наличии прионовой инфекции в ткани ЦНС. Отсутствие специфических PrP-полос в стрипах рассматривают как отрицательный результат.

Глава 10. ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНЫЙ ДИАГНОЗ

29. Губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота необходимо дифференцировать от бешенства, листериоза, болезни Ауески, нервной формы инфекционного ринотрахеита, злокачественной катаральной горячки, а также отравлений фосфорорганическими, хлорорганическими, ртутьорганическими соединениями, фосфидом цинка, мышьяком, поваренной солью.

Основными отличительными признаками от губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота являются короткий латентный период (от 5 до 15 дней), острое или подострое течение, повышение температуры тела, отказ от корма и другие симптомы, присущие указанным заболеваниям, биопроба, данные вирусологических, бактериологических и токсикологических исследований.

30. Бешенство - острая контагиозная болезнь различных видов животных и человека, характеризующаяся параличами, агрессией, водобоязнью.

Возбудитель - рабдовирус.

Бешенство крупного рогатого скота чаще протекает в буйной форме и характеризуется возбуждением, извращением аппетита, расширением зрачков, обильным слюноотделением. Агрессивность по отношению к человеку и животным наблюдается редко. К концу болезни развиваются параличи - спазм гортани и глотки, затем передних и задних конечностей. Смерть наступает на 3 - 6 день. При тихой форме бешенства симптомы возбуждения выражены в незначительной степени, но очень рано развиваются параличи.

Необходимо отметить, что прижизненная дифференциальная диагностика губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота и бешенства, несмотря на всю ее значимость, имеет лишь ориентировочное значение. Основное практическое значение имеет посмертная диагностика, основанная на данных морфологического, серологического исследования и биопробы.

Гистологические изменения головного и спинного мозга при бешенстве характеризуются рассеянным энцефаломиелитом, проявляющимся воспалительными изменениями сосудов и поражением нервных клеток. Указанные изменения для бешенства неспецифичны и при диагностике играют второстепенную роль согласно приложениям 18 и 19. Специфическим является обнаружение в цитоплазме нейронов головного мозга особых образований, названных тельцами Бабеша-Негри, наиболее часто они обнаруживаются в клетках аммонова рога, реже - в других отделах. Тельца Бабеша-Негри представляют собой полиморфные образования со сложной внутренней структурой: в середине одна или несколько плотных гранул, по периферии - более мелкие зернышки.

Размеры телец колеблются от 0,25 - 1 до 20 - 25 микрон. В одной клетке может быть одно или несколько телец различной величины и формы согласно приложению 20.

Для обнаружения телец Бабеша-Негри в гистосреззах, мазках и отпечатках мозга предложено множество способов окраски последних: по Михину, Муромцеву, Манну, Ленцу, Адуцкевичу.

Из серологических методов исследования наиболее специфичным при бешенстве является метод флюоресцирующих антител, позволяющий выявлять при наличии вируса в мозгу специфическое свечение (разной величины и формы гранулы яркого желто-зеленого цвета величиной от едва заметных образований до 15 - 20 микрон).

При отрицательных результатах, полученных морфологическими и серологическими методами, для окончательной постановки диагноза проводится биологическая проба, основанная на заражении исследуемым материалом лабораторных животных, главным образом белых мышей. С этой целью суспензией мозга 1:10 с добавлением антибиотиков заражают в мозг 5 - 6 белых мышей весом 4 - 6 г в дозе 0,03 мл. Наблюдение за животными проводят в течение 14 дней. В случае падежа животных их мозг исследуют на наличие телец Бабеша-Негри. Если в течение 14 дней у зараженных животных не будут выявлены тельца Бабеша-Негри, то результат считается отрицательным.

31. Болезнь Ауески (псевдобешенство) - контагиозная болезнь домашних и диких животных, в том числе и крупного рогатого скота, сопровождается поражением центральной нервной системы и органов дыхания.

Возбудителем является герпесвирус. Вирус обладает пантропностью, инкубационный период от 1 до 15 дней. У крупного рогатого скота вначале повышается температура тела до 41,9 град. С, прекращается жвачка, появляется сильный зуд в области ноздрей, губ, щек или глаз, реже - на других участках тела. Животные вялые, отказываются от корма, беспокоятся, непрерывно лижут зудящие места, трутся об окружающие предметы. Возбуждение нарастает, глаза выражают испуг, животное мычит, стонет, рвется с привязи (агрессивности не проявляет). Нередко наблюдаются судорожные сокращения жевательных и шейных мышц.

При вскрытии у животных расчесы в области головы, спины, конечностей. На месте расчесов кожа гиперемирована, края раны отечные, подкожная клетчатка геморрагически инфильтрирована. При гистологическом исследовании в мозгу отмечается картина негнойного менингоэнцефалита. Он характеризуется образованием диффузной и очаговой пролиферации клеток глии, периваскулярной инфильтрацией, клетками ретикулоэндотериального типа, вакуолизацией и пикнозом ганглиозных нервных клеток, нейрофагией, многорядовой пролиферацией клеток мозговых оболочек и боковых желудочков согласно приложениям 18 и 19.

Лабораторная диагностика болезни Ауески заключается в обнаружении и идентификации возбудителя болезни в патологическом материале (реакцией иммунофлуоресценции или иммуноферментного анализа), выделении вируса на культуре клеток с последующей его типизацией, а также обнаружении противовирусных антител в сыворотке крови от больных и переболевших животных в реакции непрямой геммагглютинации, иммуноферментном анализе, реакции нейтрализации.

32. Листериоз - инфекционная болезнь, протекающая с признаками сепсиса, поражения центральной нервной системы, половых органов и молочной железы.

Возбудителем инфекции является *Listeria monocytogenes*.

Инкубационный период длится 1 - 4 недели. Течение болезни бывает острое, подострое и хроническое. Листериоз может проявляться несколькими формами: нервной, септической, смешанной, бессимптомной или выражаться в виде поражения половых органов и молочной железы. У крупного рогатого скота и овец отмечается преимущественное поражение центральной нервной системы. Первые признаки характеризуются угнетением, снижением аппетита, в дальнейшем (1 - 7 дней) проявляются неkoordinированность движений, круговые движения, потеря равновесия, судороги,

парезы отдельных групп мышц, потеря зрения, конъюнктивит, стоматит, оглумоподобное состояние, иногда приступы буйства. В начальной стадии болезни температура тела может быть несколько повышена или не превышать физиологической нормы, длительность болезни 7 - 10 дней и в большинстве случаев животные погибают.

При вскрытии у крупного рогатого скота отмечают острую венозную гиперемия и отек легких, гистогнойный энцефалит (стволовая часть головного мозга и шейная часть спинного мозга) согласно приложениям 21 и 22.

Диагноз на листериоз устанавливают на основе эпизоотологических, клинических, патологоанатомических и лабораторных методов исследований.

Основанием для постановки диагноза является выделение возбудителя на питательных средах, его идентификация, биопроба на белых мышках и кроликах. Для серологической диагностики используют сыворотки крови от больных и переболевших животных. Наличие антител выявляют в реакции агглютинации, реакции связывания комплемента, иммуноферментном анализе. Для ускорения диагностики используют люминесцентную микроскопию с использованием гипериммунной антилистериозной сыворотки, меченной флюорохромами.

33. Злокачественная катаральная горячка крупного рогатого скота - острая инфекционная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся поражением слизистой оболочки головы, глаз и нервной системы.

Возбудитель - герпесвирус.

Начальная стадия заболевания характеризуется высокой температурой в течение 1 - 2 дней, воспалением слизистых оболочек ротовой и носовой полостей. Из носа появляются истечения слизистого, затем гнойно-кровянистого секрета. Повышенная температура тела (40 - 42 град. С) держится на постоянном уровне на протяжении болезни. Смерть может наступить через 24 часа, иногда через 2 недели и более. Летальность - 90%.

Патологоанатомические измерения зависят от тяжести и продолжительности заболевания и характеризуются катарально-гнойным конъюнктивитом и кератитом, некрозом эпидермиса носового зеркала и слизистой оболочки ротовой полости, гнойно-фибринозным ринитом, ларингитом, крупозно-геморрагическим или дифтеритическим колитом. При гистологическом исследовании головного мозга - негнойный менингоэнцефалит согласно приложениям 18 и 19.

Методы диагностики основаны на выделении и идентификации вируса на культуре клеток и обнаружении специфических антител в реакции иммунодиффузии, реакции непрямой гемагглютинации или иммуноферментном анализе.

34. Инфекционный ринотрахеит - острое инфекционное заболевание крупного рогатого скота, характеризующееся поражением органов дыхания и пищеварения у молодняка и половых органов у взрослых животных, также менингоэнцефалитом у телят.

Возбудитель - герпесвирус.

Заболеемость животных инфекционным ринотрахеитом зависит от локализации вируса, его вирулентности, возраста, пола и физиологического состояния животного. Отмечены респираторная, энтеральная, генитальная, конъюнктивальная и нервная формы течения инфекционного ринотрахеита. Наиболее часто встречается у новорожденных телят энтеральная форма, у телят старше 1 месяца - респираторная, конъюнктивальная, реже - нервная формы, у взрослых - генитальная форма.

Нервная или менингоэнцефалитная форма инфекционного ринотрахеита возникает у животных после проникновения вируса через гематоэнцефалический барьер. Ее наблюдают редко и, как правило, у молодняка 2 - 6 месяцев. Она характеризуется расстройством двигательных функций и нарушением равновесия. Болезнь сопровождается мышечным тремором, мычанием, скрежетом зубов, конвульсиями, слюнотечением.

На вскрытии у животных с менингоэнцефалитной формой инфекционного ринотрахеита в головном мозге гиперемия сосудов, отечность тканей и мелкие кровоизлияния. При гистологическом исследовании - хорошо выраженный

лимфоцитарный менингоэнцефалит. Ему сопутствуют периваскулярная лимфоцитарная инфильтрация в различных отделах полушарий и мозжечка, сильная инъеция сосудов и отечность вещества мозга. У животных, которые погибают, в веществе мозга преобладают кровоизлияния, а при затяжном течении болезни - дегенеративные изменения нервных клеток и клеточно-пролиферативные процессы глиальных элементов согласно приложениям 18 и 19.

Диагноз на инфекционный ринотрахеит ставят путем выделения и идентификации вирусов на культуре клеток, обнаружения противовирусных антител в сыворотках крови больных и переболевших животных в реакции нейтрализации, реакции непрямой гемагглютинации или иммуноферментном анализе.

35. Отравление мочевиной характеризуется сильным угнетением, потливостью, атаксией, слюнотечением, клоническими и тетаническими судорогами. Отравлению подвержены в основном взрослые животные. Температура тела в норме. Заболевают единичные животные до 30 - 40-процентного поражения стада.

На вскрытии - геморрагический гастроэнтерит, вздутие рубца (при разрезе ощущается резкий запах аммиака), зернистая (жировая) дистрофия печени и некрозы в ней. Основанием для постановки диагноза являются лабораторные исследования содержимого рубца на наличие в нем мочевины.

36. Отравление ртутьорганическими соединениями характеризуется резким угнетением, сильной саливацией, поносом, полиурией, угнетением сердечной деятельности, атаксией, парезами, параличами. Температура тела в норме. Заболевают единичные животные до массовых случаев поражения стада.

На вскрытии - серозно-катаральный гастроэнтерит, некротический некроз, зернистая (жировая) дистрофия миокарда и печени, крупозно-дифтеретический колит, кровоизлияния в серозных оболочках пищеварительного тракта.

Основанием для постановки диагноза являются лабораторные исследования содержимого рубца на наличие в нем соединений ртути.

37. Отравление хлорорганическими соединениями характеризуется резким угнетением или возбуждением, сильной саливацией, поносом, полиурией, судорогами, сердечной недостаточностью, парезами, параличами. Температура тела в норме. Заболевают единичные животные до массовых случаев поражения стада.

На вскрытии - катарально-геморрагический гастроэнтерит, кровоизлияния в слизистой оболочке бронхов, плевре, под эпи- и эндокардом, зернистая дистрофия и венозная гиперемия в миокарде, печени, почках, венозная гиперемия и отек легких.

Основанием для постановки диагноза являются химико-токсикологические лабораторные исследования содержимого рубца на наличие в нем хлорорганических соединений.

38. Отравление фосфорорганическими соединениями характеризуется расстройством нервной системы, повышенной возбудимостью, затем угасанием рефлексов, атаксией, сильной саливацией, поносом, судорогами, сердечной недостаточностью. Температура тела в норме. Заболевают единичные животные до массовых случаев поражения стада.

При вскрытии - обильная саливация в ротовой полости, цианоз слизистых оболочек глаз и ротовой полости, венозная гиперемия печени и легких (отек легких), гиперемия и отек головного мозга, сужение зрачков, кровоизлияния под эпи- и эндокардом, в слизистой оболочке мочевого пузыря, щитовидной и поджелудочной железах, головном мозге.

Основанием для постановки диагноза являются химико-токсикологические лабораторные исследования содержимого рубца на наличие в нем хлорорганических соединений.

39. Наряду с поражением крупного рогатого скота губкообразной энцефалопатией аналогичные изменения отмечаются и у овец при скрепи, аденоматозе, висна.

39.1. При аденоматозе овец наряду с головным мозгом поражаются и легкие. При этом отмечают метаплазию альвеолярного эпителия в виде онкоподобных аденом на фоне

расплавления межальвеолярных перегородок и образования эмфизематозных полостей согласно приложению 23.

39.2. При заболевании овец висна отмечают периваскулярный инфильтрат крупноклеточных элементов в стволовой части продолговатого мозга согласно приложению 24.

39.3. При скрепи овец имеются различные стадии поражения головного мозга. Отмечают кариопикноз, коагуляцию и пониженную оксифилию цитоплазмы нейронов согласно приложению 25, цитокариолизис нейронов согласно приложению 26, хроматолизис ядра и вакуолизацию цитоплазмы нейронов согласно приложению 27, лизис цитоплазмы и оттеснение остатков ядра к периферии нейрона. Иногда отмечают наиболее характерный патогномичный признак - перстневидный нейрон согласно приложению 28.

39.4. При меди овец отмечается пролиферация круглоклеточных элементов в интерстициальной ткани легких, перибронхим, расплавление межальвеолярных перегородок и образование эмфиземоподобных полостей согласно приложению 29.

39.5. При проведении гистологических исследований в нормальных участках головного мозга преобладают волокна нейроглии, заметны нейроны согласно приложениям 11 и 12. При микроскопии гистосрезов из мозжечка здоровых животных при микроскопии видны грушевидные клетки Пуркинье, зернистый слой с мелкими нейронами, молекулярный слой (немиелизированные волокна), нейроны согласно приложению 13.

Глава 11. УСТАНОВЛЕНИЕ ОКОНЧАТЕЛЬНОГО ДИАГНОЗА НА ГУБКООБРАЗНУЮ ЭНЦЕФАЛОПАТИЮ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

40. Подтвержденным на губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота диагноз следует считать только на основании комплексного анализа эпизоотологических, клинико-анатомических и патогистологических исследований. При этом следует сравнивать гистопрепараты отделов головного мозга, полученные от заведомо здоровых животных и от животных с различными поражениями центральной нервной системы, согласно приложениям 8 - 13 и 18 - 29.

41. Подтверждением диагноза на губкообразную энцефалопатию крупного рогатого скота является заключение региональной референтной лаборатории Международного эпизоотического бюро, расположенной во Всероссийском научно-исследовательском институте защиты животных (г.Владимир, Российская Федерация), путем исследования иммуногистохимическим методом наличия патологических PrP-белков в обычных фиксированных в формалине срезах участков головного мозга крупного рогатого скота с наиболее характерными патогномичными признаками, характерными для этого заболевания, выявленными после патогистологических исследований.

Глава 12. МЕРЫ БЕЗОПАСНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С ПАТОЛОГИЧЕСКИМ МАТЕРИАЛОМ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

42. При работе с патологическим материалом, содержащим возбудитель губкообразной энцефалопатии крупного рогатого скота, необходимо учитывать высокую устойчивость возбудителя к физико-химическим факторам и в этой связи строго соблюдать правила техники безопасности.

43. Все работы, связанные с распиловкой головы, извлечением головного мозга, отбором проб для патогистологических, бактериологических и вирусологических исследований, следует проводить в соответствии с требованиями санитарных правил 1.2.011 "Безопасность работы с микроорганизмами I и II групп патогенности", утвержденных постановлением Главного санитарного врача Республики Беларусь от 25 ноября 1998 г. N 25 "Об утверждении санитарных правил работы с микроорганизмами I и II групп патогенности".

44. Специалист, который проводит исследования, должен иметь халат, прорезиненный (лучше хлорвиниловый) фартук с нарукавниками, анатомические перчатки, резиновые сапоги, водонепроницаемый капюшон, защитную маску из оргстекла для исключения попадания на лицо или глаза брызг крови, осколков костной ткани и интрацеребральной жидкости.

45. По окончании работ необходимо обработать настойкой йода или бриллиантовой зелени ногти и различные царапины или травмы рук. Также по окончании работ инструменты, которыми проводили отделение головы, укладываются в стерилизатор с 2-процентным раствором гипохлорида натрия не менее чем на 1 час (инструменты должны быть погружены в раствор полностью). Сапоги, фартук, капюшон, маску и перчатки также обрабатывают 2-процентным раствором гипохлорида натрия. Халаты обрабатывают автоклавированием при 132 град. С в течение 60 минут. Горючие отходы сжигают.

46. Труп животного, а также и голову (после отбора мозга) рекомендуется утилизировать в яме Беккари или в яме глубиной не менее 2 метров, предварительно обильно засыпав хлорной известью, или сжигать. Неиспользованные участки головного мозга целесообразно сжечь в муфельной печи, а при ее отсутствии утилизировать, как труп животного.

Приложение 1
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

ИНСТРУМЕНТЫ, ПРИМЕНЯЕМЫЕ ДЛЯ ВСКРЫТИЯ ЧЕРЕПНОЙ КОРОБКИ

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Приложение 2
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

СХЕМА РАСПИЛОВ ЧЕРЕПА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Приложение 3
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

СХЕМА УЧАСТКОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА ЖИВОТНЫХ

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Приложение 4
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

СХЕМА РАЗРЕЗОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Приложение 5
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

АППАРАТУРА, МАТЕРИАЛЫ И ИНСТРУМЕНТЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКИ И ОКРАСКИ ТКАНЕЙ

1. Автомат универсальный (типа АТ-4, АТ-5) для гистологической обработки и окраски тканей
2. Термостат суховоздушный (на 37 град. С)
3. Термостат для парафиновой заливки ТВЗ-25 (на 58 - 60 град. С)
4. Микротом санный (мс) или для парафиновых срезов (МПС-2)
5. Станок для заточки микротомных ножей
6. Станок для правки микротомных ножей
7. Микротомные ножи (для парафиновых или целлоидиновых срезов)
8. Формалин (коммерческий), параформ
9. Спирт 96 град. (этанол)
10. Медь сернокислая (5-водная или безводная)
11. Хлороформ
12. Уксусная кислота (ледяная)
13. Гематоксилин (или гематеин)
14. Эозин калия или натрия
15. Соляная кислота
16. Ксилол (пара-, орто-, мета-)
17. Фенол (карболовая кислота)
18. Иглы препаровальные гистологические (стоматологический зонд)
19. Белковый клей
20. Блоки деревянные (или текстолитовые)
21. Плитка электрическая (газовая горелка)

22. Спиртовки
23. Часы песочные на 1, 2, 3, 5, 10 минут
24. Карандаш по стеклу (тушь черная, чернила по стеклу)
25. Бальзам канадский (пихтовый)
26. Предметные и покровные стекла
27. Фильтровальная бумага (фильтры)

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ СПИРТОВ
ДЛЯ ГИСТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ**

Для получения 100 мл спирта	Необходимое количество компонентов, мл					
	спирта 96 град.	90 град.	воды спирта воды		спирта 80 град.	воды
		52	48	44	56	50
50 град.	50	63	37	50	50	56
60 град.		44				
70 град.	37	73	27	56	44	63
75 град.		78	22	83	17	94
		6				
80 град.	-	83	17	89	11	-
		94	6	-	-	-
90 град.		-				

Приложение 7
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

ДЕФЕКТЫ ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ПАРАФИНОВЫХ СРЕЗОВ, МЕТОДЫ ИХ УСТРАНЕНИЯ

N	Дефект	Причина	Метод устранения
1	2	3	4
1.	Залитый кусочек выпадает из парафина при резке	1. Недостаточное обезвоживание материала 2. Неполное удаление промежуточных сред 3. Охлаждение кусочка при переносе его в форму 4. Заливка материала охлажденным парафином	Повторная заливка материала
2.	Материал плохо режется, нож подскакивает над поверхностью блока, поверхность среза неровная	1. Переуплотнение материала при проводке и фиксации	Устранить трудно. Поставить микротомный нож под углом к блоку и попытаться получить одиночные срезы
3.	Срезы хрупкие, крошатся	1. Твердый парафин 2. Низкая температура окружающей среды 3. Большой угол наклона ножа	Повторно залить материал в более мягкий парафин (или добавить воск). Прогреть дыханием поверхность блока перед каждым движением ножа или включить сбоку настольную лампу. Уменьшить угол наклона ножа
4.	Срезы закручиваются, прилипают к поверхности ножа	1. Мягкий парафин 2. Высокая температура окружающей среды 3. Малый угол наклона ножа	Охладить блок в холодильнике (2 – 3 мин). Увеличить угол наклона ножа
5.	Срезы раздваиваются или покрыты белесоватыми полосами	1. Грязный парафин 2. Зазубрины на лезвии ножа	Повторно залить в чистый парафин. Заточить или передвинуть нож

6.	Срезы получают через одно движение ножа	1. Малый угол наклона ножа	Увеличить угол наклона ножа
----	---	----------------------------	-----------------------------

Приложение 8
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

ГУБКООБРАЗНАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ РОГАТОГО СКОТА

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Патогномоничная диффузная вакуолизация нейроглии
стволовой части продолговатого мозга (окраска
гематоксилинэозином, 300х)

Приложение 9
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

ГУБКООБРАЗНАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Патогномоничная диффузная вакуолизация нейроглии
стволовой части продолговатого мозга. Высокая степень
поражения (окраска гематоксилинэозином, 300х)

Приложение 10
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

ГУБКООБРАЗНАЯ ЭНЦЕФАЛОПАТИЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Цитокариопикноз и лизис нейронов. Подобные изменения

наблюдаются и при других инфекционных болезнях с поражением центральной нервной системы (листериоз, болезнь Ауески, злокачественная катаральная горячка)
(окраска гематоксилинэозином, 300x)

Приложение 11
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

НОРМАЛЬНЫЕ УЧАСТКИ КОРЫ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Преобладание волокон нейроглии и нейронов
(окраска гематоксилинэозином, 300x)

Приложение 12
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

НОРМАЛЬНЫЕ УЧАСТКИ КОРЫ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Преобладание волокон нейроглии и нейронов
(окраска серебрением по Кохалю, 300x)

Приложение 13
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

МОЗЖЕЧОК ЗДОРОВОГО ЖИВОТНОГО

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Грушевидные клетки Пуркинью, зернистый слой с мелкими нейронами, молекулярный слой (немиелизированные волокна)

нейронов (окраска серебрением по Кохалю, 300х)

Приложение 14
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

**ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАКТИВЫ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ
ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ ГУБКООБРАЗНОЙ
ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В
МАЗКАХ-ОТПЕЧАТКАХ**

Оборудование

1. Электронный микроскоп (JEM-100 CX, Япония)
2. Электронно-микроскопические сеточки (Balzera, Union) на 100 или 50 ячеек
3. Иономер (рН-метр)
4. Автоматические пипетки с переменным объемом на 0,02 мл; 1,0 мл
5. Наконечники к автоматическим пипеткам на 0,02 мл; 1,0 мл
6. Бритвенные лезвия "Нева"
7. Лабораторная посуда
8. Весы аналитические
9. Термостат
10. Чашки Петри
11. Фильтровальная бумага

Реактивы

1. Додecilсульфат натрия (L4509, Sigma)
2. Трипсин (T8003, Sigma)
3. Протеиназа К (P5056, Sigma)
4. Трис-(гидрооксиметил)-аминометан (T1378, Sigma)
5. HCl концентрированная (ГОСТ 3118-77)
6. Натрий хлористый (NaCl) (ГОСТ 4233-77)
7. Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (E9884, Sigma)
8. Глутаральдегид 25% (G6257, Sigma)
9. Уранил ацетат, Serva
10. Метиловый спирт (метанол) (M3641, Sigma)

Приготовление растворов

Все растворы готовятся на бидистиллированной воде.

1. Фосфатный буфер рН 7,2 (28 мл 0,2 М NaH_2PO_4 + 72 мл 0,2 М Na_2HPO_4).
2. Буфер STE, рН 7,4 (0,01 М трис-HCl, рН 7,4, 0,1 М NaCl, 0,001 ЭДТА) - взвешивают навески NaCl (1,4625 г), трис-HCl (0,3028 г) и ЭДТА (0,1041 г), растворяют в бидистиллированной воде, концентрированной HCl, устанавливают рН 7,4 и доводят конечный объем раствора до 250 мл.
3. 2% додecilсульфат натрия - 2 г ДСН растворяют в бидистиллированной воде. Объем доводят до 100 мл.
4. Трипсин (5 мг трипсина растворяют в 10 мл фосфатного буфера).
5. Протеиназа К (2 мг протеиназы К растворяют в 10 мл буфера STE, рН 7,4).
6. 2,5% глутаральдегид (10 мл 25% глутаральдегида + 90 мл фосфатного буфера).
7. 5% уранил ацетат (0,5 мл уранил ацетата + 7 мл метанола + 3 мл H_2O).

**ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАКТИВЫ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ
ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРИОНОВЫХ ПАЛОЧЕК В МАЗКАХ-ОТПЕЧАТКАХ
ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ МЕТОДОМ НЕГАТИВНОГО
КОНТРАСТИРОВАНИЯ ПРИ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО
СКОТА**

Оборудование

1. Скоростная ультрацентрифуга ("Beckman", Швеция)
2. Микроцентрифуга типа "Eppendorf" (Bio-Rad, США)
3. Электронный микроскоп (JEM-100 CX, Япония)
4. Электронно-микроскопические сеточки (Balzera, Union) на 100 или 50 ячеек
5. Иономер (рН-метр)
6. Автоматические пипетки с переменным объемом на 0,02 мл; 1,0 мл
7. Наконечники к автоматическим пипеткам на 0,02 мл; 1,0 мл
8. Гомогенизатор Даунса
9. Бритвенные лезвия "Нева"
10. Лабораторная посуда
11. Весы аналитические
12. Термостат
13. Фильтровальная бумага

Реактивы

1. Лаурил саркозин натрия (L9150, Sigma)
2. Изопропаноловый спирт (изопропанол), (L9516, Sigma)
3. Протеиназа К (P5056, Sigma)
4. Трис-(гидрооксиметил)-аминометан (T1378, Sigma)
5. HCl концентрированная (ГОСТ 3118-77)
6. Натрий хлористый (NaCl) (ГОСТ 4233-77)
7. Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (E9884, Sigma)
8. Глутаральдегид (G6257, Sigma)
9. Уранил ацетат, Serva
10. Метиловый спирт (метанол) (M3641, Sigma)

Приготовление растворов

Все растворы готовятся на бидистиллированной воде.

1. Буфер STE, pH 7,4 (0,01 M трис-HCl, pH 7,4, 0,1 M NaCl, 0,001 ЭДТА) - взвешивают навески NaCl (1,4625 г), трис-HCl (0,3028 г) и ЭДТА (0,1041 г), растворяют в бидистиллированной воде, концентрированной HCl, устанавливают pH 7,4 и доводят конечный объем раствора до 250 мл.

2. Раствор 1 (10 г лаурил саркозина натрия растворяют в буфере STE pH 7,4, объем доводят до 100 мл).

3. Раствор 2 (1 г лаурил саркозина натрия и 10 г NaCl растворяют в буфере STE pH 7,4, объем доводят до 100 мл).

4. Протеиназа К (2 мг протеиназы К растворяют в 10 мл буфера STE, pH 7,4).

5. 2,5% глутаральдегид (10 мл 25% глутаральдегида + 90 мл фосфатного буфера).
6. 5% уранил ацетат (0,5 мл уранил ацетата + 7 мл метанола + 3 мл H₂O).

Приложение 16
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАКТИВЫ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ УЛЬТРАТОНКИХ СРЕЗОВ

Оборудование

1. Электронный микроскоп (JEM-100 CX, Япония)
2. Ультрамикротом (Reichert, Австрия)
3. Прибор для приготовления стеклянных ножей (Inifemaker, Австрия)
4. Желатиновые или полистирольные капсулы (желатиновые - РФ, полистирольные - Veem, США)
5. Электронномикроскопические сеточки (Balzera, Union) на 100 или 50 ячеек
6. Иономер (рН-метр)
7. Автоматические пипетки с переменным объемом на 0,02 мл; 1,0 мл
8. Наконечники к автоматическим пипеткам на 0,02 мл; 1,0 мл
9. Бритвенные лезвия "Нева"
10. Биноккулярная лупа МБС-9, РФ
11. Лабораторная посуда
12. Весы аналитические
13. Термостат

Реактивы

1. Этиловый спирт (этанол) (ГОСТ 18300-87)
2. Метиловый спирт (метанол) (M3641, Sigma)
3. Глутаральдегид (G6257, Sigma)
4. Ацетон (ГОСТ 2603-79)
5. Аралдит (964), Serva
6. Аралдит (212), Serva
7. Аралдит 0,64 - катализатор, Serva;
8. Дибутилдифтолат - пластификатор, Serva;
9. Уранил ацетат, Serva
10. Цитрат свинца, Serva
11. Тотрат калия, Serva
12. Едкий натр (NaOH) (ГОСТ 4328-77)
13. Натрий фосфорнокислый (NaHPO₄ и Na₂HPO₄ x 2H₂O) (ГОСТ 4172-76)
14. Тетраоксид осмия OsO₄ (O5500, Sigma)

Приготовление растворов

Все растворы готовятся на бидистиллированной воде.

1. 70% этанол (100 мл 96 град. этанола + 28 мл H₂O).
2. 100% этанол хранится в посуде с силикогелем или получают из 96 град. этанола путем обезвоживания (100 мл 96 град. этанола + 20 г CuSO₄ x 5H₂O, прожженного при 100 град. С в течение 30 - 40 мин).

3. 2,5% глутаральдегид (10 мл 25% глутаральдегида + 90 мл фосфатного буфера).
4. Смесь аралдитов. Равные объемы (20 мл) аралдита 964 и аралдита 212 тщательно перемешивают, предварительно нагрев до 60 град., добавляют 0,8 мл аралдита 964 и 1,2 мл дибутилфтолата и вновь тщательно перемешивают в течение 20 - 30 минут.
5. 5% уранил ацетат (0,5 мл уранил ацетата + 7 мл метанола + 3 мл H₂O).
6. Раствор цитрата свинца (40 мг NaOH растворить в 10 мл H₂O + 20 мл тортрата калия + 40 мг цитрата свинца).
7. 1% тетраоксид осмия (1,3 г тетраоксида осмия растворить в 50 мл H₂O и хранить в темном месте). Перед употреблением добавить 50 мл фосфатного буфера.
8. Фосфатный буфер pH 7,2 (28 мл 0,2 М NaH₂PO₄ + 72 мл 0,2 М Na₂HPO₄).

Приложение 17
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

ОБОРУДОВАНИЕ, РЕАКТИВЫ И ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГУБКООБРАЗНОЙ ЭНЦЕФАЛОПАТИИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА МЕТОДОМ ИММУНОБЛОТИНГА

Оборудование

1. Автоматические пипетки с переменным объемом на 1 мл, 0,2 мл и 0,02 мл
2. Наконечники к пипеткам 1 мл и 0,2 мл
3. Пластиковые центрифужки одноразового применения на 1,5 мл
4. Центрифуга настольная типа ОПН-8
5. Центрифуга лабораторная типа ЦЛР
6. Холодильник бытовой с морозильной камерой -18 град. С ("Минск-15")
7. Лабораторная посуда
8. pH-метр
9. Источник тока (ПЭФ-3, УИП-2)
10. Прибор для вертикального электрофореза
11. Герметичные коробки для фиксации и окраски гелей
12. Прибор для переноса белков с ДСН-ПААГ на нитроцеллюлозные мембраны
13. Герметичные коробки для обработки нитроцеллюлозных мембран
14. Целлофановая пленка
15. Фильтровальная бумага
16. Термостат
17. Водяная баня
18. Весы технические 10 - 200 г
19. Весы аналитические
20. Аппарат для встряхивания АВЧ-6С (РФ)

Реактивы

1. Трис-(гидрооксиметил)-аминометан (ТУ 6-09-4292-76)
2. HCl концентрированная (ГОСТ 3118-77)
3. Глицин (ГОСТ 5860-75)
4. Акриламид (ТУ 6-09-14-1576-73)
5. Метиленабисакриламид (ТУ 6-09-10-1234-77)
6. Додецилсульфат натрия (ТУ 6-09-06-805-76)

7. Аммония персульфат (ГОСТ 20478-75)
 8. TEMED (N,N,N,N-тетраметилэтилендиамин) (T9281, Sigma)
 9. Бромфеноловый синий (ТУ11П-282-71; ТУ 6-09-4530-77)
 10. В-меркаптоэтанол (ТУ 6-09-08-1024-75)
 11. Глицерин (ГОСТ 6259-75)
 12. Мочевина (ГОСТ 6691-77)
 13. Этиловый спирт C₂H₅OH (ГОСТ 18300-87)
 14. Уксусная кислота ледяная (ГОСТ 61-75)
 15. Глицерин (ГОСТ 6259-75)
 16. Амидо черный 10В (N3393, Sigma)
 17. Мембрана нитроцеллюлозная "Миллипор"-НА (Франция, "Schleicher & Schuell" ВАД-0,45 мкм; ФРГ, ВА-85-0,45 мкм)
 18. Твин-20 (P7949, Sigma)
 19. Бычий сывороточный альбумин (A2153, Sigma)
 20. 3,3'-диаминобензидин тетрагидрохлорид (D7304, Sigma)
 21. Моноклональные антитела к иммуноглобулинам крупного рогатого скота, меченные пероксидазой хрена
 22. Положительные и отрицательные контрольные сыворотки
- Приготовление растворов
Все растворы готовят на бидистиллированной воде.
1. Раствор мономеров: 45 г акриламида; 1,2 г N,N-метиленабисакриламида и 0,15 г ДСН растворяют в 105 мл H₂O, фильтруют.
 2. Буфер для разделительного геля: 13,6 г трис, 0,2 г ДСН растворяют в 180 мл H₂O, доводят концентрированной HCl до pH 8,8, объем доводят H₂O до 200 мл.
 3. Буфер для фокусирующего геля: 1,68 г трис, 0,1 г ДСН растворяют в 90 мл H₂O, доводят концентрированной HCl до pH 6,8 (осторожно) и доводят H₂O до 100 мл.
 4. Электродный буфер, 10-кратный: 144 г глицина, 10 г ДСН растворяют в 900 мл H₂O, доводят сухим трисом (10 г) до pH 8,3 и общий объем - до 1 л.
 5. Лизирующий буфер: 10 мл буфера для фокусирующего геля (pH 6,8), 5 мл - в-меркаптоэтанола, 2 г ДСН и 5 мл H₂O. Лизирующий буфер добавляют к пробе в количестве 1/4 от объема образца.
 6. Маркерная краска: 200 мг "бромфенолового голубого" растворяют в буфере для образца, добавляют 50 мг глицерина, объем доводят до 100 мл.
 7. Буфер для образца: 0,84 г трис растворяют в 90 мл H₂O, доводят концентрированной HCl до pH 6,8 и H₂O до 100 мл.
 8. Разделительный гель. Для приготовления 10% разделительного геля смешивают 10 мл раствора мономеров, 20 мл буфера для разделительного геля (для приготовления 12% разделительного геля берут соответственно 12 мл и 18 мл). Добавляют 0,015 мг персульфата аммония и 0,075 мл TEMED в разведении 1/10. Смесь перемешивают и заливают в пластину для электрофореза. Сверху осторожно настилают 1 мл дистиллированной воды и оставляют при комнатной температуре. О завершении полимеризации геля судят по появлению четкого раздела между гелем и водой. После завершения полимеризации воду сливают и поверхность геля осторожно осушают фильтровальной бумагой.
 9. Фокусирующий гель, 5%. Смешивают 1,5 мл раствора мономеров и 9 мл буфера для фокусирующего геля, добавляют 6 мг персульфата аммония и 0,05 мл TEMED в разведении 1/10.
 10. Буфера для переноса:
буфер А: 0,3 М трис pH 10,4;
буфер Б: 25 мМ трис pH 10,4;
буфер В: 40 мМ аминокaproновая кислота, 25 мМ трис pH 9,4.

11. Трис-буфер рН 7,4 (ТБ), 10-кратный сток-раствор: 6,05 г трис, 0,5 г азида натрия и 45 г хлористого натрия. Растворяют в 400 мл Н₂О, доводят рН до 7,4 концентрированной НСl. Доводят объем буфера до 500 мл.

12. Промывочный буфер. Смешивают 10 мл 10-кратного сток-раствора ТБ и 90 мл Н₂О. Добавляют 50 мкл Твин-20, перемешивают.

13. Блокирующий раствор: 1 г БСА растворяют в 50 мл Н₂О, добавляют эмбриональную сыворотку 10 мл и 10 мл 10-кратного ТБ. Объем доводят до 100 мл Н₂О, перемешивают.

14. Раствор субстрата: 10 мл 10-кратного ТБ и 90 мл Н₂О. Вносят 30 мг бензидина, смесь нагревают на водяной бане до полного растворения диаминобензидина, охлаждают до комнатной температуры и добавляют 0,1 мл 30% Н₂О₂. Раствор субстрата готовят непосредственно перед использованием.

Приложение 18
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

НЕГНОЙНЫЙ ЭНЦЕФАЛИТ

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Диффузная инфильтрация круглоклеточными элементами
нейроглии, сглаживание структуры мозга, вакуолизация
отсутствует (окраска гематоксилинэозином, 300х)

Приложение 19
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

НЕГНОЙНЫЙ ЭНЦЕФАЛИТ

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Диффузная инфильтрация круглоклеточными элементами
нейроглии, сглаживание структуры мозга, вакуолизация
отсутствует (окраска гематоксилинэозином, 600х)

к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

БЕШЕНСТВО

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Наличие в аммоновом рогу патогномичных оксифильных
(красных) округлых телец Бабеша-Негри (окраска по
Муромцеву, 600х)

Приложение 21
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

ГНОЙНЫЙ ЭНЦЕФАЛИТ ПРИ ЛИСТЕРИОЗЕ

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Цитокариопикноз и лизис нейронов, диффузная инфильтрация
нейроглии лимфоидными и частично нейтрофильными
элементами (окраска гематоксилинэозином, 300х)

Приложение 22
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

ГНОЙНЫЙ ЭНЦЕФАЛИТ ПРИ ЛИСТЕРИОЗЕ

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Цитокариопикноз и лизис нейронов, диффузная инфильтрация
нейроглии лимфоидными и частично нейтрофильными элементами
(окраска гематоксилинэозином, 300х)

Приложение 23
к Инструкции по диагностике

губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

АДЕНОМАТОЗ ОВЕЦ

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Метаплазия альвеолярного эпителия в виде онкоподобных аденом на фоне расплавления межальвеолярных перегородок и образования эмфизематозных полостей (окраска гематоксилинэозином, 300х)

Приложение 24
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

ВИСНА ОВЕЦ

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Патогномоничный периваскулярный инфильтрат крупноклеточных элементов в стволовой части продолговатого мозга (окраска гематоксилинэозином, 300х)

Приложение 25
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

СКРЕПИ ОВЕЦ

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Кариопикноз, кагуляция и пониженная оксифилия цитоплазмы нейронов (окраска гематоксилинэозином, 300х)

Приложение 26
к Инструкции по диагностике

губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

СКРЕПИ ОВЕЦ

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Цитокариолизис нейронов (окраска гематоксилинэозином, 300x)

Приложение 27
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

СКРЕПИ ОВЕЦ

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Хроматолизис ядра и вакуолизация цитоплазмы нейронов
(окраска гематоксилинэозином, 300x)

Приложение 28
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

СКРЕПИ ОВЕЦ

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Лизис цитоплазмы и оттеснение остатков ядра к периферии
нейрона. Характерный патогномоничный признак -
перстневидный нейрон (окраска гематоксилинэозином, 300x)

Приложение 29
к Инструкции по диагностике
губкообразной энцефалопатии
крупного рогатого скота

МЕДИ ОВЕЦ

***** НА БУМАЖНОМ НОСИТЕЛЕ

Пролиферация круглоклеточных элементов в
интерстициальной ткани легких, перибронхит,
расплавление межальвеолярных перегородок и образование
эмфиземоподобных полостей (окраска гематоксилинэозином, 300х)
