

Центральный Институт Эпидемиологии и Микробиологии
Н.К.З. СССР.

ГОРБУНОВОЙ-ВИНОГРАДОВОЙ А.С.

СВОЙСТВА ВИРУСА ГРИППА.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук.

Директор - Л.С. ДИКЕЛЕВИЧ

г. Свердловск. 1942 г.

О Г Л А В Л Е Н И Е.

Стр.

В в е д е н и е	I
---------------------------	---

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.

Глава I. Этиология гриппа	4
1. Об этиологической роли <i>Haemophilus influenzae</i>	7
2. Первые опыты с фильтрами патологического материала от больных гриппом	10
3. О роли <i>B. pneumosintes</i> в этиологии гриппа	14
4. Открытие возбудителя свиной инфлюэнцы	16
5. Выделение гриппозного фильтрующегося вируса	18
6. Об этиологии инфлюэнцеподобных заболеваний	21
7. О вирусах, описанных при некоторых других заболеваниях дыхательного тракта у людей и мышей	33
Глава II. Биологические свойства вируса гриппа	38
1. Величина частиц вируса	38
2. Отношение к физическим и химическим агентам	38
3. Чувствительность различных видов животных к вирусу инфлюэнцы	40
4. Распределение вируса в организме чувствительного животного	46
5. Культивирование вируса инфлюэнцы вне организма чувствительного животного	47
Глава III. Иммуитет	56
1. Антитела, нейтрализующие вирус	56
2. Активная иммунизация	64

3. Приготовление гипериммунных сывороток . . .	75
Заключение	78

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

Глава I. Опыт выделения вирусов от людей, больных гриппом и насморком.	82
1. Материал для исследования	82
2. Методика культивирования вирусов	83
Выделение вирусов на мышах.	84
Выделение вирусов на куриных эмбрионах . . .	90
3. Изучение вирусов, выделенных от людей, больных гриппом	92
Выделяемость вируса в течение эпидемии . . .	93
Патогенность различных штаммов вируса для мышей	95
Идентификация новых штаммов с вирусом ин- флюэнцы	97
4. Свойства вирусов, выделенных от людей, боль- ных насморком	104
Истощение вируса насморка при пассировании на яйцах	105
Адаптация яичного вируса к мышам	106
Идентификация вируса насморка с вирусом гриппа	107
5. Обсуждение результатов по главе I	108
Глава II. Культивирование вируса гриппа на яйцах .	III
1. Изучение условий размножения вируса в яйцах	III
Распределение вируса в тканях куриного эмбриона	III
Поведение вируса в неоплодотворенном яйце .	III7
Культивирование вируса на эмбрионах раз- личного возраста	121
Влияние сроков инкубации культур на актив- ность вируса	123

2. Идентификация яичного вируса с вирусом, адаптированным к мышам	124
3. Сохранение жизнеспособности яичных культур вируса	126
Устойчивость к замораживанию	126
Консервация вируса в культурах	127
4. Обсуждение результатов по главе II	132
глава III. Активная иммунизация против гриппа	135
1. Активная иммунизация мышей вирусом гриппа	136
2. Опыт вакцинации людей яичными культурами гриппозного вируса	141
3. Обсуждение результатов по главе III.	145
глава IV. Приготовление противогриппозных иммунных сывороток	149
1. Методика получения и титрования сывороток	149
Виды антигенов	149
Временная методика титрования сывороток	150
2. Приготовление сывороток на кроликах	152
Штаммоспецифические кроличьи сыворотки	152
Гипериммунные кроличьи сыворотки	156
3. Приготовление гипериммунных сывороток на лошадях	159
Схема иммунизации	160
Наращение антител в процессе иммунизации	161
Сравнение методов иммунизации яичным и мышинным антигенами	163
4. Обсуждение результатов по главе IV	166
Итоговое заключение	169
Выводы	172
Литературный указатель	176

В В Е Д Е Н И Е.

Несмотря на то, что грипп является нередким заболеванием, несмотря на то, что описания его дошли до нас с глубокой древности и в настоящее время ученые всего мира изучают его этиологию, эпидемиологию и клинику, мы не располагаем достаточно точными знаниями о сущности этой инфекции.

Затруднения для точного определения понятия "грипп", быть может, основаны на существовании трех форм его: эндемической, эпидемической и пандемической. До последнего времени неясно, являются ли они одной болезнью, в основе которой лежит один и тот же возбудитель, или для каждой формы следует искать специального агента. /Гамалей, 1941г./

Доптер (Dopter)⁵⁹ дает следующую характеристику заболеванию. "Грипп или инфлюэнца есть инфекционное заболевание, исключительно эпидемическое и контагиозное, которое имело место во все времена, но появлялось с некоторыми интервалами в особенно острой экстенсивной форме, такой, которая за какойнибудь год охватывала весь мир. Каждый раз новые поколения врачей, внимание которых не привлекали небольшие местные эпидемии и которые не были знакомы с мировыми эпидемиями, считали что они находятся перед лицом нового заболевания".

По Гамалей⁴ "грипп есть острая заразная болезнь, вызываемая проникновением в дыхательные пути специфического возбудителя - гриппозного фильтрующегося вируса.

Грипп в своей чистой неосложненной форме проявляется после короткой, в 1 - 3 дня, инкубации внезапным лихорадочным повышением температуры, чиханием, насморком и кашлем, головной болью, общей разбитостью и слабостью, болезненностью в мышцах конечностей и спины.

Особенно характерна для гриппа, в его эпидемической форме, чрезвычайная заразительность, быстрота его передвижения, громадное число поражаемого им населения. Ни с чем не сравнима способность эпидемического гриппа захватывать в короткий срок все страны земного шара".

К этим двум исчерпывающим характеристикам гриппа следует прибавить замечание Гринвуда (Greenwood) ⁹⁴, который затрудняется дать точное научное определение заболеванию. "Практическое определение инфлюэнцы чисто эпидемиологическое и сводится к следующему: явное внезапное нарушение общественного здоровья благодаря появлению очень большого количества случаев заболеваний, характеризуемого в отношении большинства признаками и симптомами поражения дыхательной системы. Как бы ни было это определение не научным и не полным, но оно дает нам достаточную возможность проследить эпидемии инфлюэнцы без особого труда более, чем на 250 лет назад".

Не касаясь истории гриппозных эпидемий и изучения эпидемиологии гриппа интересно отметить, что Гиппократ в V веке до Р.Х. описал одно контагиозное заболевание, аналогичное с тем, что мы называем теперь гриппом.

В средние века в 1358 и в 1387 г.г. итальянские ученые Маттео Вильяни (matteo villani) и Доменико Буонинсеньи (Domenico Buoninsegni) писали об "l'influenza di freddo" и "influenza d'una tosse d'un freddo".
Дюжаррик де-ла-Ривьер (Dujarric de la Riviere)⁸², у которого заимствованы эти исторические справки, несколько сомневается в том, что речь флорентийских хроникеров шла о гриппе, а не о чуме. Однако Томсоны (Thomson D. а Thomson R.)¹⁸⁷ связывают название заболевания "инфлюэнца" именно с этим первоначальным описанием болезни.

Эпидемия, свирепствовавшая в Италии в 1742-43 г.г., получила там свое окончательное название "инфлюэнца"; в то же время во Франции впервые появилось наименование заболевания "грипп" /Дюжаррик де-ла-Ривьер/.

Интересно лингвистическое объяснение слову грипп, которое приводят Томсоны и Глинчиков^{7, 8}. В XVIII веке во Франции и Англии господствовало представление о на-секоме "la grippe", которое летая отравляло воздух и тем самым являлось причиной возникновения эпидемий острого заболевания верхних дыхательных путей. С другой стороны немецкое слово "greifen" и французское слово "agripper", означающие в переводе на русский язык "хватать", могут дать объяснение названию заболевания, от-теняя его внезапный и всеобъемлющий характер.

Хорошо известны также синонимы гриппа "испанская болезнь", "русская болезнь" и проч. по названию тех стран, откуда предполагалось распространение эпидемий.

В настоящее время "инфлюэнца" и "грипп" являются

синонимами одного и того же понятия. "Грипп" - название эпидемического заболевания верхних дыхательных путей, принятое в русской, французской и немецкой специальной литературе; "инфлюэнца" - название того же заболевания, принятое в английской и американской литературе.

Глинчиков⁷ указывает на то, что в недавнее время Комиссией по разработке инструкции по борьбе с гриппом в Швейцарии была сделана попытка дифференцировать эти понятия: "гриппом" называть спорадические случаи с насморком и кашлем, "инфлюэнцей" - эпидемический грипп.

Тушинский²¹ внес аналогичное предложение на Всесоюзной конференции микробиологов, эпидемиологов и инфекционистов в 1939 году.

Однако такая классификация не получила практического применения. В дальнейшем изложении мы будем пользоваться обоими терминами для обозначения одного и того же понятия.

Как видно из предыдущего, описания эпидемий гриппа появились уже у Гиппократа и в средние века. Что касается этиологии гриппа, то ее изучение стало возможно⁶¹¹ только с развитием науки микробиологии.

Характерны следующие этапы в истории этиологии гриппа. В 1892 г. Прейффер (Preiffer)¹⁶² сообщил, что во время эпидемии 1889-90 г.г. он выделил из мокроты больных гемофильную палочку, которая, по его мнению, являлась причиной заболевания гриппом.

Ко времени пандемии 1918 г. была разработана мето-

дика культивирования анаэробов и появились первые работы по изучению ультравирусов. Таким образом во время последней пандемии гриппа 1918 года поиски этиологического агента велись в трех направлениях.

Проверялась роль *H. influenzae* при гриппе.

Началось всестороннее изучение фильтратов отделяемого дыхательного тракта и крови больных в поисках фильтрующегося вируса.

Велись изыскания возбудителя гриппа в области анаэробов.

Несмотря на то, что большинство исследователей высказывалось за фильтрующийся вирус, как причину гриппа, никому не удалось выделить его ни в разгар пандемии, ни в последующие годы.

Только в 1933 г. английские ученые Смит, Эндрюс и Лейдлоу (Smith, Andrewes a. Laidlaw)¹⁷⁷ выделили фильтрующийся вирус из мокроты гриппозных больных путем интраназального заражения хорьков. Изучая сыворотки людей, переболевших инфлюэнцей в 1918 году, эти авторы доказали ретроспективно, что выделенный ими вирус был причиной последней пандемии.

В свете новейших данных вирус, выделенный на хорьках, а впоследствии и на мышах, признан большинством исследователей единственным этиологическим агентом эпидемического гриппа.

Целью настоящей работы было изучение свойств вируса гриппа. В соответствии с поставленной задачей мы начали свои исследования в 1937 году.

Первым этапом явилась разработка методов культивирования вируса и выделение штаммов вируса от больных.

Затем мы попытались получить профилактическую вакцину и лечебную противогриппозную сыворотку.

Прежде чем перейти к описанию экспериментальных исследований, мы приводим изложение тех данных, которые имеются в литературе по указанным вопросам.

ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.

Глава I. ЭТИОЛОГИЯ ГРИППА.

I. Об этиологической роли Haemophilus influenzae.

Изучение этиологии гриппа связано с эпидемией 1889-90 г.г. В 1892 году Прейффер опубликовал следующее свое открытие. Из мокроты гриппозных больных он выделил мелкую неподвижную грамотрицательную палочку, которая развивалась только в присутствии гемофилина. Она получила название haemophilus influenzae, или бактерии Прейффера. Приняты еще следующие названия этого микроба: Bacterium influenzae, Bacillus influenzae /Борджо/.

В период между двумя пандемиями гриппа 1889 года и 1918 г. бактерия инфлюэнцы была признана несомненным возбудителем этой инфекции. Скотт (Scott)¹⁸⁷ приводит следующее категорическое заявление Вассермана (Wassermann)¹⁸¹, сделанное им в 1893 году: "Где инфлюэнца, там и бактерии инфлюэнцы" ("wo Influenza, da Influenza-bacillen"). Однако в течение ближайших лет возникли сомнения относительно этиологической роли этого микроба при гриппе. Во время эпидемии 1918-19 г.г. были произведены многочисленные исследования, которые должны были оценить ее этиологическое значение.

183

По данным Шмидта и Кайриса (Schmidt u. Kairies) сам Пре́йффер в 1918-19 г.г. находил гемофильных микробов в 60-70% при исследовании мокроты больных гриппом. Уленгут (Uhlenhut)¹⁸⁸, Левинталь (Levinthal)¹²⁰, Шмидт (Schmidt)¹⁶¹⁸², Готшлих (Gotschlich)⁵⁰, Шюрманн (Schürmann)¹⁸⁸, Дитрих (Dietrich) и др. доказали наличие бактерий Пре́йффера в гриппозной мокроте и в легких погибших от инфлюэнцы людей.

125

37

Однако Любарш (Lubarsch)¹⁶⁴, Бенда (Benda)¹¹⁴, Шморль (Schmorl)⁸⁸, Колле (Kolle), Фридманн (Friedmann)⁸⁸ и др. не подтверждали данных Пре́йффера.

86

Гааген и Мауер (Haagen u. Mauer)⁸⁶ приводят следующие отрицательные данные по поводу находок бактерий Пре́йффера во время этой пандемии.

138

Эллер (Eeller)¹³⁸ в 1918 г. при исследовании 87 случаев заболевания только от 21 больного выделил бактерию Пре́йффера, что составляет 24%.

82

Гретц (Graetz)⁸² в 1919 г., исследуя 1229 проб мокроты гриппозных больных, выделил палочку инфлюэнцы только в 4 случаях.

101

69

Гиршбруг (Hirschbrugh)¹⁰¹ в 1918 г., Фейжес (Fejes)⁶⁹ в 1919 г. чрезвычайно редко находили Пре́йфферовскую палочку в мокроте больных инфлюэнцей.

154

Плеш (Plesch)¹⁵⁴ в 1919 г. отрицал значение бактерии Пре́йффера в этиологии гриппа.

185

Шоттмюллер (Schottmüller)¹⁸⁵, наблюдая эпидемию 1919 г., также сомневался в ее этиологическом значении.

По мнению Дюжаррик де-ля-Ривьера бактерия инфлюэн-

цы очевидно принадлежит к группе "microbe de sortie", т.е. к микробам сопутствующим, но не являющимся перво-причиной заболевания.

Прейн (Prein)¹⁵⁵ считает, что палочка Шейффера, как и стрептококки, вторично развивается в бронхах после того, как первичное поражение их производит гипотетический вирус.

В настоящее время Смородинцев¹⁵⁶ называет палочку Шейффера вторичным возбудителем, подобно стрептококкам и пневмококкам, которые являются причиной осложнений гриппа.

Шейфферу не удавалось заражение людей или животных чистой культурой бактерий инфлюэнцы /Шмидт и Янцхес/.

По Гаагену и Мауэру, Скотту и Гамалю многие авторы получили отрицательные результаты при заражении добровольцев культурами бактерий Шейффера. /Листер и Тейлор (Lister a. Taylor)¹²², Розенау (Rosenau)¹⁵⁷, Вааль, Уайт и Лийелл (Wahl, white a. Lyall)¹⁸⁰, Шмидт и Янцхес (Schmidt u. Jentsch)¹⁸², Ишивара (Ischiwara)¹¹¹ /.

Смородинцев¹⁵ в 1936 г. наблюдал 110 добровольцев, зараженных вирулентной культурой бактерий инфлюэнцы. Автор пришел к заключению, что патологические явления, развившиеся у некоторых добровольцев, не сходны с гриппом.

Скотт (Scott)¹⁸⁷ приводит описание многих случаев заболевания коклюшем, туберкулезом, корью, где не было клинической инфлюэнцы, но где были обнаружены бактерии Шейффера.

По поводу разноречивых результатов бактериологиче-

ских исследований на наличие бактерий инфлюэнцы в мокроте гриппозных больных во время пандемии 1918 года мы приводим замечание Шмидта и Найриеса, которые и в настоящее время являются сторонниками Пфейфферовской этиологии гриппа. Тем не менее они пишут следующее: "Большие ученые находят бактерий Пфейффера при гриппе, однако другие не менее знаменитые авторы находят их чрезвычайно редко или совсем не находили. Третейский судья не помог бы в этом деле, т.к. каждая сторона засыпала бы его аргументами до полной запутанности".

Гамалей /1941 г./ указывает на то, что за время гриппа 1918-19 г.г. этилогическая роль бактерии Пфейффера была подвергнута сомнению. В дальнейшем проходили целые эпидемии, где исследование на Пфейфферовскую бактерию давало отрицательный результат.

2. Первые опыты с фильтраатами патологического материала от больных гриппом.

Как видно из изложенного роль бактерии Пфейффера в этиологии инфлюэнцы не удовлетворяла исследователей. Следствием этого явились новые поиски возбудителя и возникла гипотеза о фильтрующемся вирусе.

Еще в период между двумя пандемиями гриппа 1889 и 1918 годов Крузе (Kruze)¹¹⁸ в 1914 г. и Фостер (Foster)⁷⁰ в 1916 г. показали, что можно заразить здоровых людей фильтраатами носового секрета от больных острым насморком (common cold).

Скотт считает, что нельзя было доказать наличие

фильтрующегося вируса при гриппе в отсутствие гриппозной эпидемии. Тем не менее он приводит исследования Крузе и Фостера, как первые опыты по изучению вирусной этиологии гриппа.

Опыты с фильтраатами мокроты и других патологических материалов от больных истинной инфлюэнцей были произведены во время пандемии 1918-19 г.г.

Зельтер (Selter)¹⁷³ и его ассистентка подверглись ингаляции фильтратом отделяемого носоглотки гриппозных больных, после чего у них обнаружались явные признаки заболевания.

Николль и Лебайи (Nicolle et Lebailluy)¹⁸⁵ заразили обезьяну *Macacus sinicus* нефильтрованной мокротой от больного несложненным гриппом. На шестой день у обезьяны были обнаружены явные симптомы гриппа. В следующих опытах Николль и Лебайи инокулировали волонтеров под кожу и в вену фильтраатами мокроты и крови от гриппозных больных. Более четкие результаты по воспроизведению заболевания всякий раз получались при заражении людей фильтраатами мокроты, а не крови.

Джаррик де-ла-Ривьер заражал разнообразных животных фильтраатами крови, мокроты и плевральной жидкости от гриппозных больных. Опыты, поставленные на мелких лабораторных животных /мышь, кроликах, свинках, кошках и птицах/, дали отрицательный результат. Тогда автор поставил опыт на человеке. Одному волонтеру было введено под кожу 4 к.см. фильтраата крови от нескольких больных гриппом. На четвертый день у зараженного волонтера об-

наружились типичные симптомы инфлюэнцы. Через пять дней наступило выздоровление. Несколько времени спустя этот волонтер оказался иммунным к повторному заражению.

Дюжаррик де-ла-Ривьер приводит данные, полученные неевропейскими исследователями в тот же период пандемии 1918-19 г.г. Кунья, Магальяес и Фонсека (Cunha, Magalhaes, Fonseca)⁴⁸ получили явно положительный результат при подкожном заражении обезьян фильтратом крови, взятой в начале заболевания от нескольких больных. Фильтраты мокроты оказались столь же патогенны^{ми} для обезьян. Интересно, что одна из обезьян, предварительно проделавшая экспериментальную инфекцию, оказалась резистентной к новому заражению фильтратом мокроты от гриппозного больного.

Японские исследователи Ямануши, Ивашина и Сакаками (Jamanouchi, Iwashina et Sakakami)¹⁹⁴ поставили опыт на 52 волонтерах. 1/ 12 человек получили в носоглотку эмульсию мокроты от 43 больных. 2/ Фильтрат той же эмульсии мокроты был введен в носоглотку 12-ти другим волонтерам. 3/ 8 человек получили в носоглотку фильтрат крови гриппозных больных. 4/ Четирем волонтерам под кожу ввели фильтрат мокроты и четирем волонтерам фильтрат разведенной крови. 5/ Четырнадцать человек получили в носоглотку смесь культур бацилл Фрейффера, стрептококка и стафилококка.

Опыт дал положительный результат на волонтерах первых четырех групп за исключением 6 человек, которые

за 1-2 месяца до этого переболели гриппом. Отрицательный результат был получен при заражении волонтеров пятой группы.

Джибсон, Баумэн и Коннор (Gibson, Bowman a. Connor)⁸⁰
Лешке (Leschke)¹¹⁹ и др., заражая людей и обезьян фильтрованным материалом от гриппозных больных, получали положительные результаты.

Фридбергер и Конитцер (Friedberger u. Konitzer)⁸⁸
Мак Интош (Mac Intosh)¹¹⁰ и Сали (Sahli)¹⁵⁹ по Джаррик де-ла-Ривьеру получали отрицательные результаты, заражая людей и обезьян фильтрами отделяемого дыхательного тракта гриппозных больных.

Джаррик де-ла-Ривьер приводит соображение Ру¹⁵⁸ (Roux) по поводу неуспеха некоторых опытов с фильтрами отделяемого гриппозных больных. Ру считает, что отрицательные результаты воспроизведения инфекции могли явиться следствием технических недостатков в работе, например, фильтрации материала через несоответствующие мелкопористые фильтры.

Таким образом при заражении фильтрами мокроты или крови от гриппозных больных во многих случаях удавалось перенести заболевание на здорового человека или обезьяну. Эти опыты указывали на присутствие фильтрующегося вируса в патологическом материале от гриппозных больных. Однако, никому из исследователей не посчастливилось выделить этот вирус, т.е. получить его в культуре или пассировать на чувствительном животном.

3. О роли *B. pneumosintes* в этиологии гриппа.

Следующим этапом в изучении этиологии инфлюэнцы было открытие Олитского и Гэтса (Olitsky a. Gates) ¹⁴⁰⁻¹⁵⁰ в 1921-23 г.г. фильтрующегося грамотрицательного микроба, который был назван ими "*Bacterium pneumosintes*". Согласно номенклатуре Бердье принято также название этого микроба "*Dialister pneumosintes*".

Авторы выделили этого микроба на среде Ногучи (Noguchi) ^{*} при засевах фильтратов носоглоточных смывов от больных во время эпидемии инфлюэнцы. При выделении ряда штаммов требовался предварительный пассив исходного материала через кролика. Производилось интратрахеальное заражение кролика нефильтрованной мокротой гриппозных больных. Только при засевах легких такого кролика удавалось выделить *B. pneumosintes* на среде Ногучи.

Вкратце перечислим работы Олитского и Гэтса, посвященные изучению *Bact. pneumosintes*. Авторы исследовали носоглоточные смывы больных инфлюэнцей на присутствие *Bact. pneumosintes*, его фильтруемость и резистентность; культивировали этого микроба в анаэробных условиях; изучили сопутствующие гриппу заболевания и реакции иммунитета в отношении *Bact. pneumosintes*; иммунизировали кроликов и людей вакцинами, приготовленными из этих микробов и, наконец, изучили антитела против *Bact. pneumosintes* в крови реконвалесцентов после эпидемической инфлюэнцы.

^{*}/ Среда Ногучи: В 1912 г. Ногучи предложил асцитическую жидкость с содержанием свежее выделенной от животного ткани для культивирования спирохет, обитающих в крови.

Скотт приводит ряд авторов, Лёве и Цеман (Loewe a. Zeman)¹²³, Брэнэм (Brannham)³⁹, Бэр и Лёве (Baehr a. Loewe)³⁶, Накажима (Nakajima)¹³⁴, которым удалось подтвердить данные Олитского и его сотрудников /Олитского и Гэтса и Олитского и Мак Гартни (Olitsky a. Mc Gartney)¹³¹/. Вместе с тем Скотт указывает на Преффера (Preiffer)¹⁵³ и Готтингера (Hottinger)¹⁰⁶, которые отрицали роль *Bact. pneumosintes* в этиологии инфлюэнцы.

Мы не приводим здесь отдельные этапы дискуссии о *Bact. pneumosintes*, как о предполагаемом возбудителе гриппа. Окончилась она не в пользу Олитского и Гэтса.

Исследованиями Дочес, Шибли и Милльса (Dochez, Snibley a. Mills)⁵⁸, Лонга и Доула (Long a. Doull)¹²⁴ было доказано, что *Bact. pneumosintes* является вполне безобидным обитателем носоглотки большого количества /75%/, как здоровых, так и больных людей не только инфлюэнцей, но и обычным насморком. Слизь носоглотки от больных острой инфекцией верхних дыхательных путей были профильтрованы через свечи Беркефельда V, которые пропускали *Bact. pneumosintes*, и через свечи Беркефельда W, а также через пластинки Зейтца. Однако, несмотря на отсутствие *Bact. pneumosintes* в двух последних фильтрах, они также, как и фильтраты через свечи Беркефельда V, оказались одинаково инфекционными. Интраназальное заражение волонтеров всеми этими фильтрами влекло за собой заболевание со всеми симптомами инфлюэнцы.

Таким образом Лонг и Доул, Дочес, Шибли и Милльс не

только опровергли этиологическую роль *Bact. pneumosintes*, но подтвердили еще раз инфекционность бактериологически стерильных носоглоточных смывов от больных гриппом.

Гааген и Мауер по поводу роли *Bact. pneumosintes* в истории этиологии гриппа указывают, что Олитский и Гэтс в 1921-23 г.г. привлекли внимание исследователей своими фильтрующимися грамотрицательными палочками, но что данные этих авторов не нашли подтверждения в работах других исследователей в период 1927-1934 г.г.

4. Открытие возбудителя свиной инфлюэнцы.

Мысль ученых всего мира была направлена по новому пути после блестящего открытия Шопа (Shope)¹⁶⁸⁻¹⁷⁰ в 1931 г. возбудителя инфлюэнцы свиней, "hog-flu"^{это}. Заболевание ~~людей~~ стало известным в ветеринарной практике со времени пандемии инфлюэнцы в 1918 году.

Коэн (Coen)¹¹⁵ был очень поражен одновременным появлением инфлюэнцы у людей и новым заболеванием свиней. Дорсет, Мак Брайд и Найльс (Dorset, Mc Bryde a. Niles)⁶⁰ в 1922 году описали жестокое заболевание инфлюэнцей в стаде поросят. Поражало сходство симптомов заболевания свиней с симптомами человеческой инфлюэнцы. Высокая заразительность, внезапное начало, высокая температура, мышечная слабость, доходящая до протрации и, в случаях, оканчивающихся смертью, обширные изменения в легких.

В опытах, не вызывающих сомнения, Шоп доказал, что в основе заболевания свиней лежит комплекс, состоящий из фильтрующегося вируса и бактерии *Haemophilus influ-*

enzae suis. Оба компонента были выделены им из дыхательного тракта больных свиней.

Заболевание свиней со всеми симптомами инфлюэнцы может быть воспроизведено только при синергетическом действии обоих факторов. Заражение происходит через дыхательные пути; например, можно получить экспериментальную инфекцию путем накапывания в ноздри здоровым животным смеси, состоящей из эмульсии вируса и палочки свиной инфлюэнцы. Экспериментальная инфлюэнца ничем не отличается от эпизоотической инфлюэнцы, протекающей в условиях естественного заражения.

Источником вируса свиной инфлюэнцы является эмульсия из дыхательных органов больных свиней или фильтрат этой эмульсии. При введении здоровым свиньям материала, содержащего вирус, без примеси *H. influenzae suis*, у животных развивается легкое заболевание с симптомами инфлюэнцы, так называемая "фильтратная болезнь", сопровождающееся стойким иммунитетом к естественному или экспериментальному заражению комплексом возбудителей.

Культура микроба *Haemophilus influenzae suis* была получена на искусственной питательной среде. По своим свойствам бактерия свиной инфлюэнцы оказалась весьма сходной с Клейфферовской палочкой. При введении в дыхательный тракт здоровым свиньям не удавалось обнаружить никаких симптомов заболевания и никакого иммунитета к последующему заражению вышеописанной смесью вируса с этим микробом.

Открытие Мона было подтверждено Кобе (Кёбе)¹¹³ в

Германии, который выделил вирус от больных свиней и с успехом повторил опыты Шопы.

Сторонники вирусной этиологии человеческой инфлюэнцы получили блестящее подтверждение своей гипотезы в опытах Шопы. Несомненное клиническое сходство заболеваний людей и свиней дало повод упорно продолжать поиски возбудителя гриппа в области фильтрующихся вирусов.

5. Выделение гриппозного фильтрующегося вируса.

В 1933 году Смит, Эндрюс и Лейдлоу (Smith, Andrewes¹⁷⁷ a. Laidlaw) в Англии выделили фильтрующийся вирус из смывов носоглотки от людей, больных инфлюэнцей. Авторы воспользовались удачной моделью Дэнкина и Лейдлоу (Dunkin a. Laidlaw)⁶³, которые еще в 1926 г. выделили вирус собачьей чумы на хорьках.

Смит, Эндрюс и Лейдлоу показали, что не только легко заразить хорьков смывами носоглотки от людей, больных гриппом, но и переносить заболевание с больного хорька на здорового в бесконечной серии пассажей.

Методика выделения вируса заключалась в следующем. Смывы носоглотки от больных инфлюэнцей фильтровались через градоколовые мембраны Эльфорда (Elford). Бактериологически стерильные фильтраты накапывались в нос хорькам под легким эфирным наркозом.

Вирусная инфлюэнца у хорьков характеризуется инкубационным периодом в 48 часов и двухфазным подъемом температуры с небольшой ремиссией. Лихорадочный период продолжается 4-5 дней; в течение этого времени ясно вы-

ражены симптомы катарра верхних дыхательных путей с прострацией и мышечной слабостью. Болезнь не смертельна для хорьков. Выздоровление сопровождается иммунитетом к новому заражению.

Для поддержания вируса в серии пассажей пользуются эмульсией носовых ходов или легочной ткани больного хорька, как культурой вируса для интраназального заражения свежих животных. Авторы считают, что можно заразить хорьков вирусом инфлюэнцы только через дыхательный тракт; выделить вирус от этих животных можно также только из дыхательных органов. По данным авторов кровь, cerebro-спинальная жидкость, печень, селезенка и мозг не содержат вирус даже на высоте болезни.

Экспериментальная инфлюэнца хорьков весьма контагиозна для этих животных. Заболевание передается простым контактом, поэтому необходима строгая изоляция ⁹⁸ подопытных животных. Лейдлоу (Laidlaw) в лекции, прочитанной в Кембридже, дал подробное описание устройства здания для подопытных хорьков. Хорсфолл ¹⁰² (Horsfall) также описал помещение для индивидуальной изоляции хорьков в Рокфеллеровском Институте в Америке; к описанию приложена фотография, на которой можно видеть детали изолятора.

После того, как Смит, Эндрюс и Лейдлоу в 1933 г. сообщили о выделенном ими вирусе человеческой инфлюэнцы, они продолжали эту работу, пользуясь каждой возможностью для доказательства своей гипотезы. Штамм 1933 г. был назван ими "ws". В следующем 1934 году они опять

выделили вирус, который оказался идентичным с вирусом ws. По Эндриусу те же авторы в 1935 г. выделили 8 штаммов вируса человеческой инфлюэнцы.

В 1934 г. Френсис (Francis)⁷¹ выделил первые два штамма вируса в Америке во время эпидемии в порто-Рико и в Филадельфии. Автор назвал свои штаммы "PR-8" и "Phila" и направил их в Англию для идентификации. Лейдлоу признал американские штаммы совершенно идентичными с ранее выделенными английскими штаммами.

В 1935 г. Бернет (Burnet)⁴⁸ в Австралии, в 1936 г. Смородиццев в Ленинграде выделали идентичные вирусы. В 1937 г. работниками Мечниковского Института²³ в Москве было выделено четыре штамма вируса эпидемического гриппа.

По Стюарт-Гаррису (Stuart-Harris)¹⁸⁶ аналогично вирус были выделены в 1936 году Брайтменом и Траском (Brightman a. Trask)⁴⁰ в Америке, Бийл и Доммисс (Bijl a. Dommisse)³⁸ в Голландии; в 1937 г. Дужаррик де-ла-Ривьером и Шево (Dujarric de la Rivière et Chev⁶²é) во Франции и Хойлен и Фейрбросером (Hoyle a. Fairbrother)¹⁰⁷ в Англии.

С 1933 г. по 1941 г. почти все вышеперечисленные авторы изучали многочисленные вспышки эпидемического гриппа в различных странах света и выделили большое количество новых штаммов. Каждый раз вновь выделенные штаммы сравнивались с ранее изученными, английским ws и американскими PR-8 и Phila.

По мнению Лейдлоу¹¹⁷, вирусы человеческой инфлюэн-

цы, выделенные в различных странах света, являются потомками, происходящими от одного корня. Вирус инфлюэнцы специфичен для данного заболевания, его удается выделить только от случаев эпидемического гриппа, но не от случаев спорадического гриппа или насморка. Автор делает предположение, что вирус человеческой инфлюэнцы адаптировался к свиньям во время пандемии 1918 года. В отличие от инфлюэнцы свиней эпидемическая инфлюэнца человека является чисто вирусной инфекцией. Доказательством этому, по мнению Лейдлоу и его соавторов, служит то, что при заражении хорьков вирусно-бактериальным комплексом /вирус с добавлением бактерий инфлюэнцы Пфейффера/ только вирус способен к пассированию на хорьках. Пфейфферовская палочка исчезает из дыхательного тракта этих животных после нескольких последовательных пересевов; первоначальное заражение вышеописанным комплексом не изменяет течения болезни у хорьков.

Таким образом основоположники вирусной этиологии гриппа совершенно исключили бактерию Пфейффера при изучении эпидемической инфлюэнцы.

6. Об этиологии инфлюэнце - подобных заболеваний.

Вопрос этиологии заболеваний, сходных по своей клинической картине с инфлюэнцей, давно интересовал исследователей. Хорошо известны простудные заболевания с насморком и кашлем, которые протекают легко или отягчаются некоторыми симптомами, характерными

для эпидемической инфлюэнцы. Понятно, что это заболевание, получившее английское название "common cold" в переводе "насморк", "обычная простуда", изучалось всеми, кто занимался этиологией эпидемической инфлюэнцы.

Авторы искали общего возбудителя для этих заболеваний. В случае удачи такое открытие имело бы большое значение для эпидемиологии гриппа, главным образом для разрешения вопроса о сохраняемости вируса в межэпидемические периоды.

Исследованиями Крузе в 1914 г. и Фостера в 1917 году было доказано, что причиной насморка является фильтрующийся вирус. Авторы не выделили вирус, но доказали его присутствие тем, что заразили здоровых людей фильтратом смыва носоглотки от больных насморком. При попытке культивировать вирус common cold на среде Ногуши Фостер наблюдал грамотрицательные кокковидные тельца, которые при более тщательном изучении оказались принадлежностью самой среды.

57-58

Дочес с сотрудниками (Dochez, Shibly a. mills, 51-55
Dochez, mills a. Kneeland) посвятили ряд работ изучению вирусов common cold и инфлюэнцы. При отборе больных для получения вируса насморка авторы руководствовались следующими симптомами: наличие острой инфекции верхних дыхательных путей с профузными катаральными явлениями без аллергического ринита и полостных заболеваний. Авторы подчеркивают, что насморк в основном отличается от инфлюэнцы отсутствием лихо-

радки. "При отборе больных исключались гриппозные варианты, т.е. больные, у которых наблюдалась лихорадка".

В 1929 г. авторы поставили опыт заражения обезьян вирусом common cold. Смывы носоглотки от больных типичным насморком фильтровались через свечи Беркефельда V и инстиллировались в нос человекообразным обезьянам. Заболели 3 обезьяны из 7; клиническая картина болезни обезьян соответствовала человеческой. Авторы выделили из фильтрата носоглоточных смывов людей и обезьян грамотрицательных анаэробов, которых они склонны были отнести к *Bact. pneumosintes* Олитского и Гэтса.

В 1930 году те же авторы поставили большой опыт на обезьянах. В 44% случаев удалось вызвать заболевание у волонтеров и обезьян при заражении фильтратами смыва носоглотки от больных насморком. Как и в работах по изучению инфлюэнцы оказалось, что фильтраты смывов носоглотки от здоровых людей в 75% случаев содержали фильтрующихся анаэробов. Таким образом роль этих анаэробов была признана необоснованной в этиологии насморка.

Следует отметить, что при работе, как с волонтерами, так и обезьянами, авторы соблюдали всевозможные меры предосторожности, чтобы гарантировать внесение инфекции извне.

Волонтеров помещали в специальный павильон при госпитале. Комнаты предварительно мылись 2% лизолом и проветривались 24 часа. Люди принимали ванну и на-

девали автоклавированную одежду. Пища, вносившаяся в изолятор, подвергалась стерилизации по мере возможности. Вход обслуживающего персонала был сведен до минимума. Все лица, соприкасавшиеся с волонтерами, снабжались масками, халатами, перчатками, галошами и прочими предметами индивидуальной изоляции. Волонтеров помещали в изолятор за 5 дней до предполагавшегося опыта. Заражение проводилось по следующей методике. Людей клали на спину и накапывали в каждую ноздрю по I - 1,5 куб.см. матерьяла, подлежащего испытанию. В таком положении их оставляли на 2-3 минуты, затем перекладывали лицом вниз на I минуту.

В 1931-32 и 33 г.г. авторы сообщали об успешном культивировании вируса common cold на тканевой среде. В 1934 г. им удалось культивировать вирус инфлюэнцы. Активность культур испытывалась на волонтерах в условиях вышеописанной изоляции.

Интересно, что при заражении людей культурами вируса common cold наблюдалась картина экспериментального насморка, которая почти ничем не отличалась от естественного заболевания. При заражении волонтеров культурами вируса инфлюэнцы чаще наблюдалось слабо выраженное заболевание, которое, по мнению Гаагена и Мауера, скорее напоминало насморк, чем инфлюэнцу. Только в редких случаях развивалось заболевание, которое по своей клинической картине соответствовало гриппозному.

Таким образом опытами Дочеса с сотрудниками было

установлено, что, как от случаев насморка, так и от случаев инфлюэнцы удавалось выделить вирусы в культурах. Поведение этих вирусов в культурах указывает на их близкое родство.

После того как Смит, Эндрюс и Лейдлоу выделили вирус человеческой инфлюэнцы на хорьках, они сделали попытку выделить вирус common cold на тех же животных. Авторам не удалось вызвать заболевание хорьков при заражении смывами носоглотки от больных насморком. На основании этого было сделано заключение о различной природе возбудителей обоих заболеваний.

Нобль и Брейнард (Noble a. Brainard)¹³⁷, указывая на родственность заболеваний насморком и инфлюэнцей, повторили опыт Смита, Эндрюса и Лейдлоу. Носоглоточные смывы от 40 больных насморком были профильтрованы через свечи Беркефельда W и введены 12 хорькам интраназально. У 4 из 12 хорьков было обнаружено заболевание с подъемом температуры до $104,1^{\circ}\text{F}$ и увеличением носовой секреции через 24-72 часа после заражения. Кроме того у 2 хорьков наблюдалась сонливость и слезотечение. Оказалось возможным перенести заболевание с больного хорька на человека путем заражения нефилтрованным носовым смывом. После интраназального введения этого материала у одного из двух волонтеров было обнаружено заложенность носа с легким выделением слизи в течение 36 часов. Попытка перенести заболевание от больного хорька на здорового окончилась неудачей.

Таким образом по данным Нобля и Брейнарда хорьки

оказались достаточно чувствительными к вирусу насморка, чтобы у части из них можно было вызвать экспериментальное заболевание. В то же время безуспешность серийного переноса заболевания от хорька к хорьку указывает на непригодность этой модели для выделения вируса насморка.

Лайд и Чепмен (Lide a. Chapman)¹⁰⁸ пытались установить на лабораторных животных различие возбудителей насморка и инфлюэнцы. Пользуясь одинаковой методикой при изучении обоих возбудителей, авторы отметили различное поведение вирусов при попытке их выделения. Им не удалось пассировать на хорьках и длительно культивировать на курином эмбрионе вирусы от больных насморком и спорадическим гриппом. Тем не менее удавалось заразить хорьков фильтратами смывов носоглотки от больных с резко выраженным гриппом и культивировать вирус в течение продолжительного времени на курином эмбрионе. Авторы не разрешили вопроса о единстве вирусов насморка и гриппа. Их выводы сводятся к тому, что вирус легко адаптируется к животным и размножается на курином эмбрионе, если он взят от случаев резко выраженного заболевания во время вспышки значительной суровости.

Как видно из изложенного, некоторым исследователям удалось выделить вирус common cold, некоторые авторы могли только доказать его существование, но никто не идентифицировал его с вирусом эпидемической инфлюэнцы.

Изучение гриппозных эпидемий с точки зрения выделения вируса по методу Смита, Эндрюса и Лейдлоу привело многих исследователей к необходимости дифференциальной диагностики гриппа от сходных заболеваний.

Старт - Гаррис, Эндрюс и Смит предприняли большую работу по изучению вируса эпидемической инфлюэнцы в Англии в 1936-37 г.г. В этот период авторы наблюдали в окрестностях Лондона вспышку лихорадочного заболевания, по своим симптомам напоминающего инфлюэнцу. Заболеванию предшествовало недомогание в течение нескольких дней, озноб и головная боль, затем развивался кашель и насморк, мышечные боли, подъем температуры, который держался от 1 до 3 дней. В феврале 1936 года такая вспышка наблюдалась в Вульвиче; в мае того же года в Истчере; в ноябре в Четаме и в Рэгби Скул. Во всех указанных местностях авторы изучали клиническую картину и эпидемиологию заболевания, проводили исследования патологического материала от больных с целью выделения вируса, исследовали сыворотку крови больных на содержание антител против вируса инфлюэнцы, как в остром периоде болезни, так и в период реконвалесценции.

Попытки выделить вирус от случаев этого заболевания оказались безуспешными; изучение сывороток привело к мысли о том, что данное заболевание не имеет отношения к эпидемическому гриппу вирусной этиологии. Авторы озаглавили эту часть своей работы, как "Заболевания, сходные с эпидемической инфлюэнцей". Они

предложили называть эти заболевания "лихорадочными катаррами" ("febrile catarrhs") неизвестной этиологии.

Те же авторы выделяли гриппозный вирус в 40 случаях в конце 1936 г. и в 1937 г. при заболевании, которое по своей клинической картине очень незначительно отличалось от только что описанного. ^{Это} Заболевание наблюдалось также в окрестностях Лондона и носило эпидемический характер, начиналось внезапно, без продромального периода. В противоположность раннее описанной вспышке "лихорадочного катарра", при которой не удалось выделить вирус на корьках, авторы считали, что заболевание 1936-37 г.г. идентично с истинной "эпидемической инфлюэнцей", так как удавалось выделить вирус в большинстве исследованных случаев.

173

Френсис (Francis) в 1936 году в Калифорнии изучил большую эпидемию инфлюэнцы, в течение которой ему не удалось выделить вирус. Автор не обнаружил также повышения титра антител в крови переболевших против вируса эпидемической инфлюэнцы.

102

Хорсфолл (Horsfall) в 1940 году не мог выделить вирус от больных во время большой эпидемии инфлюэнцы в Северной Каролине. Автор констатировал отсутствие специфических антител против вируса эпидемической инфлюэнцы в сыворотке реконвалесцентов.

15, 16

Сморodinцев подтвердил наблюдения вышеописанных авторов относительно безуспешности выделе-

ния вируса в течение некоторых вспышек заболевания гриппом. "Лихорадочные катарры" английских авторов Смородинцев рассматривает как вспышки простудных заболеваний в связи с переменой погоды весной или осенью, т.е. с переходом от одного сезона к другому. Он предложил называть "сезонным гриппом" заболевания, при которых не удается выделить из носоглотки больных никакого другого возбудителя кроме банальной флоры. В соответствии с номенклатурой английских и американских авторов Смородинцев называет "эпидемическим гриппом" только такие заболевания, при которых легко удается выделить вирус на хорьках или мышах.

Повидимому автор не делает различия между понятиями "эндемический грипп", "спорадический грипп", "common cold", "насморк", "лихорадочные катарры" и "сезонный грипп".

В то же время, по данным Дробинцевской⁹, небольшая часть людей, болеющих гриппом в межэпидемический период, является резервуаром хранения вируса. При обследовании дыхательных путей 25 больных во время вспышки сезонного гриппа автору удалось в одном случае выделить вирус, патогенный для хорьков и мышей. Анализом изменения концентрации микрофлоры в верхних дыхательных путях у остальных 25 больных не удалось доказать, что возбудителями этой вспышки являлись палочки Фрейфелера, гемолитические стрептококки или пневмококки. Автор делает заключение, что подавляющая масса так называемых гриппозных заболеваний в межэпидемический период имеет

другую этиологию.

Все авторы согласны с тем, что весьма затруднительна дифференциация эпидемической инфлюэнцы от других острых эпидемических заболеваний верхних дыхательных путей. Так Стюарт - Гаррис, Андрус и Смит¹⁸⁵ (Stuart-harris, Andrewes a. Smith) в результате изучения инфлюэнцы 1936-37 г.г. пришли к выводу, что "полная дифференциация эпидемической инфлюэнцы является трудным делом, если нет большой эпидемии" и что "нельзя претендовать на то, что выявляется резко очерченная картина вирусного заболевания"... "Возникают затруднения в случае легких форм с немногими или плохо выраженными симптомами и тогда совершенно нельзя быть уверенным в диагнозе".

По этому же вопросу в весьма иронической форме высказывается Гринвуд в своем определении эпидемической инфлюэнцы: "Употребление термина в медицинской практике вполне согласуется с методом одного циничного натуралиста, который однажды дал мне об'яснение по поводу того, как отличить ворону от грача: "Если Вы видите трех или больше, то это грачи, если только одного или двух, то это, наверное, вороны".

⁷²
Френсис (Francis) в 1937 г. так охарактеризовал положение вопроса о терминологии: "Инфлюэнца, прежде всего, клинический и эпидемиологический синдром, который принимает различные размеры в эпидемическое время. Клиническое течение заболевания индивидуально колеблется. До сих пор под названием инфлюэнцы подра-

зумеваются ряд клинически сходных заболеваний. Эпидемиологи различают три формы: эпидемическая, пандемическая и спорадическая инфлюэнца. Клиницисты трудятся над дифференциальным диагнозом между простудой (common cold), гриппом /эпидемической инфлюэнцей/ и инфлюэнце-подобными заболеваниями".

В 1940 году была образована комиссия из английских и американских исследователей, основоположников вирусной этиологии гриппа, которая предложила новую номенклатуру заболеваний, диагностируемых, как инфлюэнца. В состав комиссии вошли работники Рокфеллеровского Института в Нью-Йорке, Хорсфолл, Леннетт и Рикард, и Национального Медицинского Исследовательского Института в Лондоне, Эндрюс, Смит и Стюарт-Гаррис (Horsfall, Len-
nette a. Rickard, Andrewes, Smith a. Stuart-Harris) 105 .

Комиссия предложила называть "клинической инфлюэнцей" заболевание, при котором не был выделен вирус эпидемической инфлюэнцы, но которое по своему симптомокомплексу ничем не отличается от эпидемической инфлюэнцы. Заболевание, при котором был выделен вирус, идентичный с вирусом Смита, Эндрюса и Лейдлоу, получило название "инфлюэнцы А". Комиссия предложила названию "вируса А" с целью оставить открытой широкую дорогу для описания новых вирусов, которые оказались бы причиной гриппозных эпидемий неясной этиологии. Если таковые будут выделены, комиссия предложила именовать их "вирус инфлюэнцы В, С и т.д."

Уже появилось несколько описаний более или менее

значительных эпидемий инфлюэнцы, в основе которых лежал новый вирус "инфлюэнцы В".

В 1940 г. Френсис (Francis)⁷⁶ в детском приюте в Ирвингтоне наблюдал заболевание, сходное с эпидемической инфлюэнцей. Однако, сыворотки больных в острой стадии и во время реконвалесценции не показали повышения титра антител в отношении вируса эпидемической инфлюэнцы PR-8. Вирус не удалось выделить из смывов носоглотки от типичных больных методом интраназального заражения мышей. В одном случае /больной Ли (Lee)/ было получено легкое заболевание у хорьков при интраназальном заражении носоглоточным смывом. Эмульсия из носовых раковин и легких этого хорька была пассирована серийно на свежих животных. У хорьков наблюдалось заболевание, по своей клинической картине сходное с инфлюэнцей. После нескольких пассажей вирус был перенесен на мышей. Выделенный таким образом "вирус Ли" оказался не идентичным с ранее изученными вирусами инфлюэнцы А. Автор предложил считать этот штамм вирусом инфлюэнцы типа В.

В январе 1940 г. в юго-восточной части С.Ш.А. вспыхнула эпидемия инфлюэнцы, при которой также наблюдалось повышение титра антител только к вирусу Ли, но не к вирусу PR-8.

Вспышка инфлюэнцы в Северной Каролине в 1936 г. была ретроспективно диагностирована Френсисом, как инфлюэнца В на основании анализа сохранившихся сыво-

роток от больных в острой стадии и в стадии реконвалесценции. Эти сыворотки дали ясное повышение титра при испытании против вируса Ли, но не против вируса PR-8.

Было произведено аналогичное исследование сывороток от пациентов, перенесших заболевание инфлюэнцы в Западной Индии в 1940 г. ^{Эти} Сыворотки ~~от~~ также нейтрализовали вирус Ли и не нейтрализовали вирус PR-8.

Таким образом, за короткий срок удалось проследить несколько вспышек инфлюэнцы В.

В другой своей работе Френсис (Francis) ⁷⁵ приводит дифференциацию инфлюэнцы А и инфлюэнцы В на основании реакции фиксации комплемента.

Мальдер, ван ден Берг и ван Коллен (Mulder, van den Berg en van Kollen) ^{132, 133} во время эпидемии среди солдат в гарнизоне Гронинген выделили вирус инфлюэнцы. При серологическом изучении штамма оказалось, что он принадлежит к типу инфлюэнцы В.

7. О вирусах, описанных при некоторых других заболеваниях дыхательного тракта у людей и мышей.

Кроме перечисленных вирусов, имеющих прямое отношение к вопросу, описаны вирусы первичной пневмонии новорожденных и взрослых, а также фильтрующиеся возбудители, связанные с заболеваниями дыхательных путей у людей и мышей.

В 1937 г. в отделении для недоносков одного из госпиталей в Миннеаполисе Адамс (Adams) ³⁰ наблюдал эпиде-

мию легочного заболевания у новорожденных. На вскрытии трупов /28% смертности/ автор обнаружил цитоплазматические тельца - включения в бронхиальном эпителии. Посмертный материал /легкие погибших детей/ был передан Френсису, который сообщил, что попытка выделить вирус оказалась неудачной. Сыворотка корьков, зараженных этим материалом, не нейтрализовала вирус инфлюэнцы. Автор уверен в вирусной этиологии этого заболевания на основании контагиозности, видовой и тканевой специфичности агента и наличия телец-включений. Этим автор установил только вирусную природу заболевания, но не демонстрировал вирус.

Уир и Хорсфолл (Weir a. Horsfall) ¹⁸² сообщили о вирусе, выделенном ^{от больных взрослых} ~~из~~ ^{из} ~~инкубационной~~ острой пневмонией ~~на мангустах~~ на мангустах. Принадлежность этого вируса к группе вирусов инфлюэнцы опровергается опытами перекрестной иммунизации.

Герцберг (Herzberg) ⁸⁹, Герцберг и Гросс (Herzberg u. Gross) ¹⁰⁰ получили пневмонию у мышей, которая воспроизводилась путем последовательного переноса при интраназальном заражении животных. Исходным материалом для заражения мышей служили смывы носоглотки от больных насморком и инфлюэнцей. Возбудитель фильтровался через свечи Беркефельда V, выделить его на хорьках не удалось. Герцберг показал, что фильтрующийся возбудитель пневмонии мышей доступен для изучения под микроскопом. Автор представил микрофотографии альвеолярного эпителия с эпителиолярным расположением

возбудителя в виде скопленных коммандов. Он причисляет открытого таким образом возбудителя к вирусам по признаку тесной связи его с клетками. Опытами перекрестной иммунизации мышей было доказано, что вирус не причастен к группе вирусов инфлюэнцы.

В связи с тем, что основные работы по изучению вируса инфлюэнцы проводились на мышах, были поставлены опыты по выделению спонтанного вируса из дыхательного тракта у этих животных.

Дочес, Миллс и Малленкен (Dochez, Mills a. mulliken)⁵⁶ обнаружили в легких здоровых на вид мышей вирус, который подобно вирусам инфлюэнцы нассировался на этих животных. Этот вирус был нейтрализован некоторыми нормальными человеческими сыворотками и одной противогриппозной. Авторы сделали вывод, что мыши являются носителями спонтанного вирусного заболевания. Вследствие этого они не считают мышь удачной моделью для опытов с вирусом человеческой инфлюэнцы.

Гордон, Фреман и Клемпит (Gordon, Freeman a. Clam-pit)⁵⁷ выделяли вирус из мышечных легких. Этот вирус не нейтрализовался сывороткой против вируса человеческой инфлюэнцы. Авторам не удалось установить его идентичность с вышеописанным вирусом Дочеса.

Заключенно по г л а в е 1. После пандемии 1918 г. эпидемиологическая роль Иейфоровской палочки при гриппе подверглась сомнению.

Многочисленными опытами была доказана инфекционность фильтратов мокроты и крови от гриппозных больных.

Однако последователи вирусной этиологии гриппа долго блуждали в поисках методики для выделения возбудителя.

Открытие Шопом вируса свиной инфлюэнцы натолкнуло исследователей на мысль о биологическом сходстве обоих вирусов на основании сходства клинической картины заболевания свиней и людей.

В 1933 году Смит, Эндрюс и Лейдлоу разработали метод выделения вируса человеческой инфлюэнцы на хорьках, а впоследствии и на мышах. Выделение вируса на чувствительном животном сыграло решающую роль при изучении этиологии эпидемического гриппа.

После того, как исследователи стали располагать методом выделения вируса на хорьках и других чувствительных животных, удалось дифференцировать грипп, при котором легко выделяется вирус, от гриппа, при котором попытки выделения вируса остаются безуспешными.

Кроме вируса инфлюэнцы А, идентифицированного с вирусом Смита, Эндрюса и Лейдлоу, выделен новый тип инфлюэнцы В. Сделано предположение о существовании многих типов инфлюэнцы, возбудителями которых являются не описанные до сих пор вирусы.

Возникла новая проблема этиологии инфлюэнцеподобных заболеваний, при которых не удается выделить вирус. Быть может в эту группу заболеваний вкрадены случаи инфлюэнцы, которые не могут быть идентифицированы из-за отсутствия подходящей методики. Возможно, что хорьки и мыши не являются универсальной моделью для выделения вирусов инфлюэнцы всех типов. Необходимо вести углубленную

работу по усовершенствованию методики культивирования вирусов для того, чтобы расшифровать группу инфлюэнце-подобных заболеваний.

Глава II. Биологические свойства вируса гриппа.

1. Величина частиц вируса.

Биологические свойства вируса гриппа, т.е. его классических штаммов типа инфлюэнцы А всесторонне изучены в лабораториях различных стран света.

Эльффорд, Эндрюс и Танг (Elford, Andrewes a. Tang)⁸⁷ определили величину частиц вируса, пользуясь градоколовыми мембранами различной пористости. Вирус проходит через мембраны с порами $0,18\mu$ и задерживается на мембранах с порами $0,14\mu$. Авторы сделали вывод, что величина частиц вируса должна находиться между $80m\mu$ и $120m\mu$. Работа производилась с штаммом WS, адаптированным к мышам. Тсуруми и Огасавара (Tsurumi a. Ogasawara)¹⁸⁸ получили в мазках из мышинных легких, зараженных вирусом инфлюэнцы, элементарные тельца, расположенные внутри- и внеклеточно. Размер их авторы определили $0,2 - 0,3\mu$.

2. Отношение к физическим и химическим агентам.

Вирус гриппа неустойчив. Он быстро погибает при комнатной температуре, еще быстрее при нагревании до $56^{\circ}C$. По Лейдлоу при этой температуре вирус погибает в течение 1 часа. В 50% глицерине пассажный вирус /легкие зараженных вирусом мышей или хорьков/ сохраняется несколько недель. В высушенном и замороженном состоянии он сохраняет свою вирулентность неопределенно дол-

то же время. Стюарт-Гаррис (Stuart-harris)¹⁸⁵ имел случай проверить активность вируса, который был высушен в вакуум-эксикаторе и после двухлетнего хранения при -20°C оставался еще вирулентным для животных.

Островская, Чалкина и Олехнович¹⁴ считают, что вирус гриппа менее устойчив к химическим агентам, чем гемолитический стрептококк.

Особенно неустойчив вирус оказался к высушиванию при комнатной температуре.

При облучении ультра-фиолетовым светом вирус погибает в 10 минут /Гаарен и Мауер/.

Есть указания, что физиологический раствор губительно действует на взвесь вируса. Стюарт-Гаррис (Stuart-harris)¹⁸⁵ предложил эмульгировать зараженную вирусом ткань животного в бульоне, разведенном физиологическим раствором. Другие авторы рекомендуют цельный бульон для приготовления вирусной взвеси.

Формалин инактивирует вирус в разведении 1:5000 или 1:10000 в течение короткого времени.

Сток и Френсис (Stock a. Francis)¹⁸⁰ изучили инактивирующее действие мыла и различных органических кислот на вирус инфлюэнцы. Наиболее эффективными оказались ненасыщенные жирные кислоты, олеиновая и линолиновая. Те же авторы определили стабильность вируса инфлюэнцы в отношении pH. Вирус сохраняет свою активность при концентрации водородных ионов в пределах от 7,0 до 9,0.

3. Чувствительность различных видов животных

к вирусу инфлюэнцы.

Как указывалось выше далеко не все виды лабораторных животных чувствительны к вирусу инфлюэнцы. Впервые вирус человеческой инфлюэнцы был выделен на хорьках Смитом, Эндрюсом и Лейдлоу¹⁷⁷. При интраназальном заражении смывом носоглотки от гриппозных больных у хорьков обнаруживались симптомы инфлюэнцы, сходные с заболеванием людей. При заражении свежих хорьков эмульсией, приготовленной из носовых ходов и легких хорьков, убитых на высоте болезни, инфекция переносилась в серии пассажей на неопределенно длинном ряде животных.

После того, как вирус адаптировался к хорькам удалось перенести это заболевание на мышей. Авторы указывали, что различные штаммы вируса требовали различного количества предварительных пассажей на хорьках прежде, чем удавалось вызвать заболевание у мышей.

Вирусное заболевание у мышей представляет собой первичную пневмонию, при которой не отмечается поражения верхних дыхательных путей. Легкие мышей, погибших вследствие заражения вирусом инфлюэнцы, увеличены в объеме, имеют вид сплошного опеченения и цвет сливы с ^мэффеазматозной каймой по краям. В случаях частичного поражения легких, т.е. заболевания, не закончившегося смертью, у убитых мышей отмечаются очаговые поражения, занимающие иногда целые доли легкого. Пораженная ткань имеет цвет сливы и резко отграничена от нормальной пе-

рочной ткани. По величине поражений можно судить о силе вируса. Английские и американские авторы отмечают четырьмя крестами /++++/ поражения со сплошной гепатизацией легких; тремя крестами /+++/ поражения, занимающие $3/4$ объема легких; двумя крестами /++/ отмечаются поражения половины всего объема легких и одним крестом /+/ - участок поражения, занимающий $1/4$ объема легких.

На основании величины поражения легочной ткани у мышей при интраназальном заражении различными дозами вируса разработан метод его титрования, определения минимальной смертельной дозы для мыши. За 1 д.л. принимают наибольшее разведение вируса, содержащееся в 1 куб. см., которое вызывает смертельную пневмонию у 50% инокулированных мышей. Обычно пользуются 10-ти кратными разведениями. Вирус, адаптированный к мышам, еще обладает активностью в разведении около 10^{-6} .

По наблюдениям Лейдлоу, Смита, Эндрюса и Дэнкина (Laidlaw, Smith, Andrewes a. Dunkin)¹¹⁸, Смородинцева¹⁵, работников Московского Института им. Мечникова²³ и других ткань мышного легкого, пораженная вирусом, бактериологически стерильна. Однако эти же авторы отметили, что эмульсия легкого, растертого вместе с крупными бронхами, оказалась нестерильной. При посеве Наблюдался рост грамотрицательных бактерий, которые, повидимому, попадают в бронхи из верхних дыхательных путей. Эти бактерии можно выделить также из нормальных легких, растертых вместе с бронхами. Патологического значения

эти бактерии не имеют, но при серийном пассировании нефилтрованных мышиных легких они могут являться причиной абсцессов. В виду этого предпочтительно пользоваться фильтрами эмульсии мышиных легких. При фильтровании через свечи Боркофельда, пластинки Зейтца и мембранные фильтры титр вируса несколько понижается.

182

В 1937 г. Френсис и Мэджилл (Francis a. Magill) сообщили о непосредственном перенесении вируса инфлюэнцы от человека на мышей. Белые мыши были заражены интраназально центрифугатом смыва носоглотки от двух больных инфлюэнцей. В течение трех первых пассажей не отмечалось никаких поражений в легких у убитых мышей. Тем не менее было доказано присутствие вируса в легких этих мышей, поскольку была обнаружена экспериментальная инфекция у хорька, зараженного такими легкими. На четвертом пассаже в легких мышей были обнаружены очаговые поражения; смертельные поражения со сплошной гепатизацией легочной ткани установились с шестого пассажа. После этого вирус совершенно адаптировался к мышам, вызывая смертельную пневмонию на 3-4 день после интраназального заражения. Мышиный вирус так же, как и хорьковый, легко фильтровался через свечи и градоколовые мембраны и нейтрализовался гриппозной иммунной сывороткой. Выделение вируса человеческой инфлюэнцы на мышах обычно связано с более или менее длительным пассированием до появления первых признаков экспериментальной инфекции.

183

Шоп (Shope) предложил вводить вирус под лег-

ким эфирным наркозом для более успешного интраназально-
го заражения хорьков. Позднее Смит, Индрюс и Лейдлоу¹⁷⁸
применили этот метод при интраназальном заражении мышей
вирусом инфлюэнцы. Некоторые исследователи возражали
против наркоза, указывая на то, что он провоцирует ре-
спираторную пневмонию. Однако опытами Рикарда и Френ-
сиса (Rickard a. Francis)¹⁵⁷ было доказано, что нар-
котизация не играет существенной роли в развитии спе-
цифических легочных поражений у мышей. Теперь все ис-
следователи пользуются эфирным наркозом при интрана-
зальном заражении хорьков и мышей вирусом инфлюэнцы.

У мышей отсутствуют поражения верхних дыхательных
путей при экспериментальной инфлюэнце, у них не наблю-
дается насморка и кашля, специфический процесс разви-
вается только в легочной ткани. Практически можно счи-
тать, что вирусная пневмония мышей не контагиозна.

Итон (Eaton)⁵⁵, специально исследовавший этот
вопрос, получил при некоторых условиях контактное за-
болевание у свежих мышей. Контактная инфекция обнару-
живалась лишь на вскрытия у убитых, на вид здоровых,
мышей в виде незначительных очагов поражения легочной
ткани. Серийный перенос вируса путем контактных пасса-
жей никогда не удавался.

Экспериментальная работа на мышах имеет свои
преимущества. 1/ Дешевизна и доступность этих живот-
ных. 2/ Простота содержания подопытных мышей. Заражен-
ные вирусом мыши содержатся в обычных банках без при-
менения каких либо особых мер изоляции. Основным недо-

статком опытов на мышах является отсутствие общности симптомов заболевания у этих животных с заболеванием человека. В этом отношении экспериментальная инфлюэнца у хорьков гораздо убедительнее. Однако общность иммунологических реакций у мыши, хорька и человека в опытах с одним и тем же вирусом примиряет исследователя с этим основным недостатком.

Сморodinцев¹⁵, Фалькович²³, Клемпит и Гордон (Clampit a. Gordon)⁴⁷ выделили вирус от больных инфлюэнцей также непосредственно на мышах.

В 1934 г. Элькелес (Elkeles)⁶⁸ перенес вирус человеческой инфлюэнцы на поросят.

Шоп и Френсис (Shope a. Francis)¹⁷² подтвердили опыт Элькелеса. Эти оба исследователя показали, что более резкое заболевание поросят получалось в результате комплексного заражения вирусом человеческой инфлюэнцы в комбинации с *Haemophilus influenzae suis* или с *H. influenzae Pfeifferi*.

Агапов^{1, 2} сообщил об успешном перенесении вируса человеческой инфлюэнцы от мышей на белых и серых крыс.

Стюарт-Гаррис (Stuart-Harris)¹⁸² перенес на ежой вирус человеческой инфлюэнцы, адаптированный к хорькам и мышам.

Белка и китайская ласка оказались чувствительными к вирусу человеческой инфлюэнцы /Танг (Tang)¹⁸⁶/.

Согласно данным Лозовой¹² вирус человеческой инфлюэнцы патогенен для белых крыс, кошек и хомяков.

Мак Интош и Селби (Mc Intosh a. Selbie)¹¹⁰ получили положительные результаты при заражении мышей, хорьков, кроликов, морских свинок и обезьян вирусом, взятым непосредственно от человека. Однако описание вируса, с которым работали эти авторы, вызывает сомнение относительно его идентичности с вирусом инфлюэнцы. Авторы в одном случае называли вирусом инфлюэнцы анаэроба, выделенного ими *in vitro* в бульоне Hartley с лошадиной сывороткой из фильтра эмульсии легких человека, погибшего от гриппозной пневмонии.

Деттвилер, Гудсон и Вульперт (Dettwiler, Hudson a. Woolpert)⁴⁹ при изучении чувствительности морских свинок к вирусу инфлюэнцы нашли, что вирус размножается только в незрелых плодах морской свинки при интрацеребральном заражении их через стенку матки.

После того как вирус был перенесен с человека на хорьков и мышей были сделаны многократные попытки обратного заражения человека вирусом, адаптированным к этим животным. Вообще эти попытки привели к отрицательным результатам, хотя отдельные авторы указывали на положительные случаи заражения. Так, Смородинцев¹⁰ подверг ингаляции эмульсией вируса, адаптированного к хорькам и мышам, 70 волонтеров. В 20% случаев были обнаружены отдельные симптомы эпидемической инфлюэнцы.

Смит и Стюарт-Гаррис (Smith a. Stuart-Harris)¹⁷⁹ описали лабораторное заражение инфлюэнцей, случившееся с одним из авторов. Во время опыта больной хорек чихнул на автора, после чего тот заболел типичной инфлюэнцей.

Эндрюс (Andrewes)³¹ не получил убедительных результатов при искусственном заражении людей.

По мнению Гаарена и Мауэра во время пассаживания на животных происходит такое ослабление и изменение вируса, что он перестает быть вирулентным для людей.

Таким образом несомненно чувствительными к вирусу человеческой инфлюэнцы являются хорьки, мыши, поросята, крысы, ежи; нечувствительными, по мнению большинства исследователей, считаются лошади, кролики, козы и морские свинки.

Интересно то, что при таком разделении человека скорее можно отнести к нечувствительному или малочувствительному виду. Доказательством этого по Гаарену и Мауэру служит то, что даже прямое заражение фильтратом смыва носоглотки от больного человека к здоровому в опытах Дочеса, Миллса и Книленда (Dochez, Mills a.⁵⁵ Kneeland) удавалось не во всех случаях, а воспроизведенное заболевание лишено было многих свойств, характерных для естественного заболевания, например, контагиозности. Повидимому естественные условия заражения связаны с каким то добавочным фактором, ускользающим от внимания исследователей.

4. Распределение вируса в организме чувствительного животного.

Рикард и Френсис (Rickard a. Francis)¹⁵⁶ произвели подробное исследование распределения вируса инфлюэнцы в организме мышей. Авторы изучали поведение ви-

руса и его органотропность при внутрибрюшинном заражении мышей. Как известно, мыши заболевают вирусной пневмонией только при введении вируса в дыхательные пути; подкожная и внутрибрюшинная аппликация вируса не влечет за собой заболевания.

Применяя массивные дозы вируса для внутрибрюшинного введения, авторы доказали его появление и размножение в легочной ткани. Выводы авторов сводятся к тому, что при интраперитонеальной инокуляции мышей массивными дозами вируса /50.000 и 100.000 д.м./ он обнаруживался в высоких концентрациях в легких, где вызывал умеренные поражения ткани. Вирус в легких достигал наивысшего титра через 48-72 часа после интраперитонеальной инъекции и оставался там в течение 10 дней. В первые 24 часа вирус был выделен из крови. Вирус, введенный мышам в вену, быстро исчезал из крови, но так же, как и при внутрибрюшинном введении локализовался в легких. В течение нескольких дней вирус можно было выделить из печени. При подкожном введении вирус не достигал ни крови, ни легких, хотя содержался в значительном количестве в регионарных железах.

Смеродинцев¹⁵ считает, что при внутрибрюшинном введении вируса, даже в массивных дозах, он не проникает в легкие.

5. Культивирование вируса инфлюэнцы вне организма чувствительного животного.

Дочес, Милльс и Книлэнд (Dochez, Mills a. Kne-

51, 52
land) в 1930-31 г.г. впервые сообщили о культивировании вируса common cold на тканевой среде. Авторы воспользовались методом Мейтлендов (Maitland a. maitland)¹³⁰ и Ли и Риверса (Li a. Rivers)¹²¹, разработанным для культивирования вируса вакцины.

Дмитриев, резюмируя работы Мейтлендов и Ли и Риверса, сообщает, что для культивирования вирусов нет необходимости в растущей ткани, как это первоначально предполагалось. Достаточно, чтобы ткань только присутствовала, хотя бы и не в активном состоянии, а в состоянии переживания. На этом принципе основан метод культивирования вирусов на жидких средах, в которых ткани не растут, но длительно переживают.

Дочес, Милльс и Книлэнд приготовили среду с тканями куриного эмбриона в жидкости Тироде с 0,1% желатин. В эту тканевую среду вносился активный фильтрат смыва носоглотки от больных common cold. Культура вируса в тканевой среде инкубировалась 5 дней при 37°C. Путем переноса культуры в новую тканевую среду были получены субкультуры в ряде генераций. Все растворы, употреблявшиеся для культивирования вируса, готовились с прибавлением хлористо-водородного цистеина чтобы создать условия, задерживающие окислительные процессы.

Активность культур вируса до 12 генерации испытывалась на волонтерах, у которых обнаруживались то более сильные, то более слабые симптомы насморка. В качестве контроля была испытана тканевая среда, не содержащая вируса, на другой группе волонтеров. После

интраназального введения среды без вируса не наблюдалось никаких реакций.

Те же авторы (Dochez, Mills a. Kneeland⁵³) в 1932-33 г.г. культивировали вирус инфлюэнцы на той же тканевой среде. Активность тканевых культур вируса инфлюэнцы также испытывалась на волонтерах. Однако заболевания истинной инфлюэнцей воспроизвести не удалось, наблюдалось заболевание, ~~формы~~ сходное с common cold. При испытании 63 пассажа на людях еще отмечались слабые симптомы поражения верхних дыхательных путей.

В 1934 г. Дочес, Миллс и Кнелэнд (Dochez, mills a. Kneeland)⁵⁴ более успешно культивировали вирус от типичного случая инфлюэнцы на той же среде с тканями куриного эмбриона. При испытании культуры на волонтерах наблюдалось заболевание со всеми симптомами инфлюэнцы.

В 1936 году Дочес, Миллс и Кнелэнд (Dochez, Mills a. Kneeland)⁴² при культивировании вируса common cold in vitro упростили технику, заменив специальные флаконы для тканевых культур обычными пробирками диаметром в 2 см.

Наблюдая культивирование в аэробных и анаэробных условиях, авторы отметили разрушительное влияние среды на вирус. В связи с этим наблюдением были сокращены сроки между переносами вируса на новую среду до 2-3 дней. Анаэробные условия оказались выгодными для размножения вируса, но неблагоприятными для эмбриональной ткани. Происходила быстрая дегенерация и гибель эмбриональных клеток, что влекло за собой разрушение

вируса.

Поставив перед собой задачу найти способ сохранения вируса в активном состоянии *in vitro*, авторы разработали методику консервации культур. Они предложили прибавлять смолу акации к культуре вируса, которая затем подвергалась замораживанию и высушиванию в вакууме. При такой обработке удавалось сохранить вирус в течение более длительного срока, чем без прибавления смолы.

При длительном культивировании *in vitro* вирус становился авирулентным для человека. Авторы предполагали, что несмотря на потерю вирулентности он продолжал расти вне организма человека неопределенно долгое время. В защиту этого предположения не приводится никаких доказательств.

Далее авторы сообщили о трудности поддержания культур вируса инфлюэнцы на уровне первоначальной вирулентности. Две культуры после нескольких пассажей в тканевой среде были введены в нос волонтерам. У волонтеров появился резкий насморк без симптомов типичной инфлюэнцы. Еще один штамм вируса после 18 пассажей в культуре тканей куриного эмбриона привел к заболеванию людей типичной инфлюэнцей. Однако после длительного культивирования наблюдалась полная потеря вирулентности этого штамма для людей.⁵⁵ /Доше, Милльс и Кнееланд (Dochez, Mills a. Kneeland) /.

Франсис и Магилл (Francis a. Magill)⁷⁸ в 1935 г. культивировали на среде Ли и Риверса вирус PR-8, адаптированный к корькам и индиан. Пассажи продолжались

целый год; в течение этого времени культуры не утратили своей способности инфицировать хорьков и мышей. Эти же авторы выделили вирус инфлюэнцы непосредственно от человека в культуре тканей. Активность вируса в культурах определялась интраназальным заражением мышей. Вирус мог быть продемонстрирован на мышах лишь при серийном пассировании. Таким образом вирус, выделенный от человека прямо в тканевую среду, ведет себя так же в отношении мышей, как вирус, выделенный непосредственно на мышах.

В 1931 г. Вудруф и Гудпасчур (Woodruff a. Good-
pasture)¹⁹³ опубликовали метод культивирования вируса вакцины на хорько-аллантоисе куриного эмбриона. Бернет (Burnet)⁴¹ успешно культивировал этим методом вирус инфлюэнцы, выделенный им в Австралии.

Метод заключается в том, что на скорлупе яйца 10-12 дневного эмбриона выпиливают окошечко в 1 кв.см. и на открытую таким образом сосудистую оболочку /хорько-аллантоис/ наносят определенное количество взвеси вируса. Окошечко закрывают покровным стеклышком, и яйцо вновь подвергается инкубации. Через 3 дня на поверхности хорько-аллантоиса появляются очаги поражения в виде белых фокусов величиной с булавочную головку. Бернет предложил пользоваться этими фокусами с целью количественного учета вируса. Автор наблюдал, что в первых пассажах вирус был мало патогенен для эмбрионов и почти не мешал их нормальному развитию. После многократных пассажей патогенность вируса воз-

росла. Так, вирус 73 пассажа убил всех эмбрионов в течение 48 часов. В процессе адаптации к эмбриону вирус утратил патогенность для мышей, сохранив свои первоначальные иммуногенные свойства.

В 1935 г. Смит (Smith)¹⁷⁴ культивировал вирус инфлюэнцы, содержащийся в хорьковых и мышиных лог-ках, на хорион-аллантоисе.

В противоположность опытам Бернета (Burnet)⁴¹ культуры вируса на хорион-аллантоисе в опытах Смита не утратили своей патогенности для хорьков и мышей.

Френсис и Меджилл (Francis a. Magill)⁸³ выделили вирус от человека непосредственно на хорион-аллантоисе куриного эмбриона. Авторы отметили, что фокусы на оболочке не являлись признаком успешного культивирования. Испытание активности живой культуры производилось на хорьках и мышах. При переносе культуры на хорьков у них обнаруживались симптомы типичной инфлюэнцы, при переносе на мышей требовался ряд последующих пассажей, чтобы удостовериться в присутствии вируса.

Стюарт-Гаррис (Stuart-Harris)¹⁸⁴ сообщил, что при размножении вируса (штамм WS) на хорион-аллантоисе обнаружился геморрагический энцефалит у эмбриона. После нескольких пассажей на мышах вирус приобрел способность вызывать смерть этих животных вследствие менинго-энцефалита.

Мур и Френсис (Moore a. Francis)¹³¹ повторили опыт Стюарт-Гарриса и пришли к выводу, что невротроп-

ность, повидимому, была присуща штамму WS, но не являлась следствием специфических условий культивирования.

Хайд и Чепмен во время эпидемии 1936-37 г.г. в Балтиморе выделили вирус от больных инфлюэнцей непосредственно на хорион-аллантоисе. Проведено было 40 пассажей на ийцах; вирус оказался патогенным для мышей и херьков и убивал куриного эмбриона.

Как указывалось выше, авторы отметили резкий контраст между поведением вирусов насморка и инфлюэнцы при культивировании их на хорион-аллантоисе. Повидимому существует какая-то связь между тяжестью заболевания у человека и способностью обуславливающего его вируса адаптироваться и размножаться на хорион-аллантоисе.

В 1936 г. Шахмалиева и Бауэр²⁶ сделали предварительное сообщение о культивировании вируса гриппа, адаптированного к мышам, на курином эмбрионе по методу, являющемуся модификацией метода Вудруфа и Гудпасчора. Согласно этой методике вирус вводился непосредственно в желток яйца по соседству с куриным эмбрионом. При этом предполагалось, что вирус размножался, как в оболочках яйца, так и в самом эмбрионе.

Мыши, зараженные интраназально культурами вируса в яйца, погибали при тех же явлениях, которые были типичны для экспериментального гриппа при заражении восходящим пассажным вирусом.

В 1940 г. Зейтленом¹¹ сообщал об успешном культивировании вируса инфлюэнцы на курином эмбрионе.

Бернет (Burnet, 1940)⁴⁴ при культивировании вируса на хордон-аллантоисе изучил вопрос распределения его в тканях развивающегося куриного эмбриона. Оказалось, что вирус размножался в наибольшем количестве в амниотической жидкости зародка. На основании этого автор предложил новый метод инокуляции вируса непосредственно в амнион.

Нигг, Вильсон и Кроули (Nigg, Wilson a. Crowley)¹³⁶ в 1941 г. сообщили результаты сравнительного изучения различных методов культивирования вируса инфлюэнцы на тканях куриного эмбриона. Наиболее удачным авторами считают метод аллантоисных культур. Метод заключается в том, что материал, предназначенный для культивирования, вводится в аллантоисный мешок 12-ти дневного эмбриона через прокол в скорлупе. При этом происходит обильное размножение вируса, как в аллантоисной жидкости, так и на хордон-аллантоисной оболочке. Количество вируса в аллантоисной жидкости, по данным авторов, в 5-50 раз выше, чем на оболочке. Выход вируса на хордон-аллантоисной оболочке с одного яйца в среднем равняется количеству вируса, полученному на легочной ткани от одной мыши.

Авторы отметили безуспешность выделения вируса непосредственно из горловых смывов от больных инфлюэнцей на ткани эмбриона. В то же время переносом на эмбриона вируса инфлюэнцы, адаптированного к мышам и хорькам, не представляло затруднений. При длительном пассировании на эмбрионе, по данным авторов, вирус

теряет вирулентность по отношению к мышам и хорькам, но становится более вирулентным для эмбриона.

Таким образом проблема культивирования вируса вне организма чувствительного животного разрешена успешно. Предложены два основных метода культивирования: *in vitro* в культуре ткани куриного эмбриона и в развивающемся яйце. Метод культивирования вируса в яйце вытеснил культивирование на тканевых средах ввиду большой перспективности, как в отношении изучения вируса инфлюэнцы, так и с точки зрения общей проблемы биологии вирусов.

Все исследователи утверждают, что вирус, адаптированный к хорькам и мышам, легко культивируется *in vitro* и на курином эмбрионе. Однако не всем авторам удавалось выделить вирусы инфлюэнцы или common cold непосредственно от человека в тканевую среду или на эмбриона в развивающемся яйце.

Для доказательства успешности культивирования вирусов вне организма животного авторы пытались вызвать соответствующее заболевание у человека, хорька или мыши путем интраназального заражения их культурами.

Дочес с сотрудниками и некоторые другие авторы проверяли свои культуры только на людях. В этих опытах вирус, взятый от человека, после культивирования вне организма животного вновь попадал в оптимальные условия существования. Заболевание, развившееся у волонтера после интраназального введения испытуемой

культуры, являлось прямым доказательством размножения вируса вне организма животного.

Однако большинство исследователей не располагало возможностью экспериментировать на людях. Активность культур испытывалась на мышах. Известно, что вирус должен адаптироваться к мышам прежде, чем вызвать демонстративное заболевание у этих животных. Поэтому при проверке слабых или трудно адаптирующихся к мышам культур отрицательный опыт на мышах еще не говорит о безуспешности выделения вируса непосредственно от больного человека в тканевую среду или на куриного эмбриона.

Г л а в а П. И М М У Н И Т Е Т.

Проблема иммунитета при гриппе принадлежит к наиболее трудным проблемам иммунологии. Известно, что после гриппа или не остается никакого иммунитета, или он сохраняется лишь очень короткое время. Несмотря на это организм реагирует на перенесенное заболевание появлением в крови антител, нейтрализующих вирус.

1. Антитела, нейтрализующие вирус.

Антитела появляются в сыворотках реконвалесцентов и в сыворотках искусственно иммунизированных людей и животных /Стюарт-Гаррис, Эндрюс и Смит (Stuart-harris, Andrews a. Smith)¹⁸⁵, Смит и Стюарт-Гаррис (Smith a. Stuart-harris)¹⁷⁹, Френсис (Francis)⁷³, Френсис и Мэджилл (Francis a. Magill)⁷⁷, Смородинцев¹⁵/. Отмечено 10-20 кратное нарастание титра антител в сыворотках ре-

конвалесцентов по сравнению с сыворотками людей в острой стадии болезни. Циркулирующие в крови антитела держатся на высоком уровне в течение 6-8 месяцев после перенесенного заболевания. Сыворотки лиц, перенесших пневмококковую пневмонию и насморк, не обнаруживают нарастания антител в отношении вируса инфлюэнцы. Таким образом антитела, нейтрализующие вирус, специфичны для эпидемической инфлюэнцы.

Нейтрализующие свойства гриппозных сывороток можно определить двумя способами: *in vitro* при помощи реакции фиксации комплемента и *in vivo* в опытах на мышах. Метод титрования сыворотки на мышах оказался более чувствительным, но тем не менее реакция фиксации комплемента была довольно широко использована для определения нейтрализующих свойств гриппозных сывороток и высоко оценена многими авторами /Смит (Smith)¹⁷⁵ Френсис, Мэджилл, Рикард и Бек (Francis, Magill, Rickard a. Beck)⁸⁷, Хорсфолл (Horsfall)¹⁰² и др./.

Реакция нейтрализации вируса сывороткой в опыте на мышах впервые была предложена в 1934 г. Эндрюсом, Лейдлоу и Смитом (Andrewes, Laidlaw a. Smith)³². С тех пор этим методом пользуются с небольшими изменениями все исследователи, изучающие вирус инфлюэнцы.

Сущность метода заключается в том, что взвесь вируса, полученного любым способом в чувствительных тканях, смешивается в пробирке с убывающими концен-

трациями сыворотки и с физиологическим раствором для контроля. Смесь оставляется при комнатной температуре или при 37°C на 10-30 минут и вводится мышам интраназально под легким эфирным наркозом в количестве 0,05 куб.см. После 6-10 дневного наблюдения с учетом случаев, окончившихся смертью, убивают всех мышей, оставшихся в живых, и отмечают на аутопсии степень поражения легких крестами, как указывалось выше при описании способа титрования вируса. За титр сыворотки принимается наивысшее разведение ее, которое предохраняет мышей от смерти /методика Френсиса (Francis)⁸² / или от развития легочных поражений /методика Стюарт-Гарриса (stuart-harris)¹⁸⁵ /.

На основании разницы в титре отдельных сывороток учитываются результаты опытов перекрестной нейтрализации вируса гомо- и гетерологическими сыворотками. Определение различий в отдельных штаммах вируса и обобщение целого ряда сходных штаммов в особые группы имеет большое значение с точки зрения профилактики и эпидемиологии. При помощи стандартной гиперимунной лошадиной сыворотки, впервые полученной в Англии, идентифицируются вирусы, принадлежащие к типу А. Однако, эти вирусы могут значительно отличаться один от другого на основании имеющих антигенных особенностей каждого штамма.

Меджилл и Френсис (Magill a. Francis)¹²⁸ предложили иммунизировать кроликов различными штаммами человеческого вируса инфлюэнцы с целью получения спе-

цифических сывороток. По мнению этих авторов нечувствительные животные могут полнее отразить вторичные антигены, обуславливающие различия штаммов вирусов, чем чувствительные животные, в организме которых развиваются прежде всего антитела к первичному, т.е. общему для всех штаммов антигену.

Особенно специфичными для гомологичных штаммов авторы считали сыворотки, полученные несколько возможно раньше после однократной интраперитонеальной инъекции тканевой культуры вируса.

Магилл и Френсис (Magill a. Francis¹²⁹, Francis a. Magill⁷³) изучали антигенные различия между штаммами, как в опытах перекрестной нейтрализации, так и в опытах иммунизации на мышах. В последнем случае — при условии однократного введения антигена. Та и другая работы дали совпадающие результаты.

На основании результатов опытов перекрестной нейтрализации авторы предположили, что частица вируса по своему строению сходна с некоторыми бактериями, у которых наблюдается мозаика соматических антигенов и которые не могут быть идентифицированы по одному поверхностному специфическому антигену. От расположения доминирующего антигена, на поверхности или внутри частицы вируса, зависит серологическая реакция кролика, у которого вначале иногда могут появиться антитела против гетерологического штамма.

Стюарт-Гаррис, Эндрю и Смит (Stuart-Harris, Andrewes a. Smith)¹⁸⁵ пользовались сыворотками хорь-

ков - реконвалесцентов, с помощью которых удалось установить, что нейтрализация гомологичных штаммов вируса осуществлялась в более высоком титре, чем гетерологических.

При помощи реакции нейтрализации вируса хорьковыми иммунными сыворотками в опытах на мышах удалось разделить находившиеся в их распоряжении 11 штаммов на 3 группы. При сравнении кроличьих сывороток с хорьковыми авторы пришли к выводу, что те и другие одинаково специфичны.

В дальнейшем те же авторы изучили 28 штаммов при помощи четырех типовых сывороток /Смит и Эндрюс (Smith a. Andrewes)¹⁷⁵/. При попытке использовать все сыворотки против всех штаммов оказалось, что "чем больше штаммов включалось в опыт, тем труднее было уловить порядок в хаосе результатов перекрестной нейтрализации". Из этого можно заключить, что, повидимому, каждый штамм обладает собственной антигенной структурой.

Авторы считают, что штаммы, выделенные во время одной эпидемии иммунологически ближе друг к другу, чем штаммы, выделенные во время другой эпидемии.

Хорсфолл и Леннет (Horsfall a. Lennette)¹⁰³ также указывают на различие штаммов, полученных во время разных эпидемий.

Известность штаммов вируса инфлюэнцы создает трудности в проблеме специфической профилактики. По этому поводу Стюарт-Гаррис, Эндрюс и Смит (Stuart-harris, Andrewes a. Smith)¹⁸⁵ делают весьма уклончивое заключение: "Очень легко переоценить открытие Меджилла и Френсиса относительно различия штаммов, но также легко недо-

оценить встречающиеся варианты. Ясно, что все штаммы имеют общий фактор и различия не так велики, как, например, у трех штаммов ящура". Однако они могут быть достаточны, чтобы влиять, по мнению авторов, на результаты активной вакцинации в случае, если вирус, взятый для приготовления вакцины, и вирус, выделенный во время эпидемии, окажутся неоднотипными.

Эндрюс, Лейдлоу и Смит (Andrewes, Laidlaw a. Smith)³³ в 1935 г., Френсис и Мэджилл (Francis a. Magill)⁸⁰ в 1936 г., Шоп (Shope)¹⁷¹ в 1936 г., Бернет и Лэш (Burnet a. Lush)⁴⁵ в 1938 г., Хэйр (Hare)⁹⁷ в 1940 году исследовали нейтрализующие свойства нормальных сывороток от здоровых людей, взрослых и детей. Эти авторы нашли, что большинство сывороток взрослых содержит антитела, нейтрализующие вирус инфлюэнцы; в сыворотках детей такие антитела встречаются реже. В Англии, Америке и Австралии сыворотки взрослых содержали антитела в высоком титре также против вируса свиной инфлюэнцы.

Стюарт-Гаррис, Эндрюс и Смит (Stuart-Harris, Andrewes a. Smith)¹⁸⁵ сообщили данные обследования жителей острова св. Елены, которые избежали пандемии 1918 г. Эти люди в 1936 г. не имели в сыворотках антител ни к человеческой, ни к свиной инфлюэнце. Однако после небольшой вспышки у тех же лиц появились антитела против обоих вирусов.

Авторы показали в опытах на мышах, что вирус человеческой и свиной инфлюэнцы перекрестно иммунизируют один против другого при отсутствии в сыворотке гетеро-

логических антител.

В опытах Френсиса и Шопа (Francis a. Shope)⁸⁵ у животных - реконвалесцентов наблюдался иммунитет к гетерологическим штаммам при отсутствии соответствующих антител после инфекции человеческим или свиным вирусом инфлюэнцы.

В 1937 г. Стокс (Stokes)¹⁸² при обследовании группы детей нашел сывороточные антитела против вируса свиной инфлюэнцы. Автор объяснил эту находку тем, что дети жили в свиноводческом районе в тесном контакте со стадами свиней.

Авторы, наблюдавшие в сыворотке людей антитела к вирусу свиной инфлюэнцы, высказывались в смысле общности происхождения вирусов человеческой и свиной инфлюэнцы.

Стюарт-Гаррис (Stuart-Harris)¹⁸⁵ и Шеффер и Лейдер (Schaeffer a. Leider)¹⁸⁰ изучали колебания титра антител в сыворотках людей во внеэпидемический период. Стюарт-Гаррис в подобных колебаниях видел один из факторов периодичности эпидемий инфлюэнцы.

(Hare)⁹⁷ Лэйр наблюдал случаи заболевания инфлюэнцей людей с высоким содержанием антител против вируса; в то же время, по данным автора, лица с низким уровнем антител не заболевали инфлюэнцей.

Перед исследователями встал вопрос, являются ли сывороточные антитела показателем резистентности организма против инфлюэнцы.

На основании последних исследований Лэйра можно предполагать, что защитные антитела в сыворотке челове-

ка не всегда служит признаком высокого иммунитета против заболевания инфлюэнцей во время эпидемии. Таким образом этот фактор гуморального иммунитета не является надежным показателем при оценке невосприимчивости человеческого коллектива к предстоящей вспышке или эпидемии гриппа.

По мнению Гамалея⁶, как гуморальный, так и клеточный иммунитет, т.е. антитела и фагоцитоз, являются реакцией только одной соединительной ткани организма. Иммуитет других тканей, например, покровных, покоится на иных принципах.

Совсем недавно работами Бернета, Леш и Джексона⁴⁶ (Burnet, Lush a. Jackson) и Френсиса⁷⁴ (Francis) было установлено, что отделяемое слизистой носа здорового человека обладает свойством инактивировать вирус гриппа. Агент, инактивирующий вирус, легко фильтруется через свечи и пластинки Зейтца. Избирательно инактивируя ряд вирусов /гриппозный, герпетический, полиомиелита/, он не действует на вирус вакцины. Агент не может быть отождествлен с лизоцимом, т.к. последний не действует на вирусы; в то же время он не обладает свойствами иммунной сыворотки.

Френсис попытался установить зависимость между количеством специфических антител в сыворотке людей и наличием инактивирующего вирус гриппа агента в носовой слизи. Ему не удалось доказать, что инактивирующий агент чаще встречается у лиц с высоким уровнем циркулирующих в крови антител.

По сообщению Гамалея носовой секрет настолько активен, что введение в нос добровольцам, как вирулентного, так и авирулентного вируса не вызвало ни заболевания гриппом, ни появления антигриппозных антител. По мнению Гамалея, наличие предохраняющего агента указывает на существование местного, неспецифического иммунитета при гриппе.

На основании изложенного можно сделать вывод, что при гриппе образуются специфические антитела, как фактор гуморального иммунитета. Исследованиями самого последнего времени в носовой слизи людей обнаружен агент, способный инактивировать некоторые вирусы, в том числе вирус гриппа. Этот агент, повидимому, является фактором местного неспецифического иммунитета.

2. Активная иммунизация.

В результате искусственной иммунизации людей и животных вирусом гриппа наблюдается резкий подъем уровня защитных антител в сыворотках.

Френсис и Мэджилл (Francis a. Magill)^{79, 81}, Мэджилл и Френсис (Magill a. Francis)^{126, 127}, Эндрюс и Смит (Andrewes a. Smith)³⁴, Бернет и Леш (Burnet a. Lush)⁴⁵, Стюарт-Гаррис (Stuart-Harris)¹⁸⁵ и др. пользовались повышением титра антител как показателем эффективности вакцинации людей против эпидемической инфлюэнцы. При подкожной вакцинации вирусом инфлюэнцы авторы наблюдали 5-10 кратный подъем уровня антител.

Были сделаны многочисленные попытки вакцинировать людей вирусом инфлюэнцы против вспышек эпидемий, кото-

рые появляются, по Стюарт-Гаррису (Stuart-Harris)¹⁸⁴, в одной и той же местности примерно каждые 2 года.

Еще в 1931 г. Шоп (Shope)¹⁸⁸ показал, что из комплекса возбудителей /фильтрующийся вирус и *H. influenzae suis*/, обуславливающих заболевание свиней, только вирус обладает иммунизирующими свойствами. Резистентность к инфекции развивается, как после перенесенной "фильтратной болезни" /легкого заболевания в результате искусственного заражения одним вирусом/, так и после интрамускулярного введения вируса.

Все авторы, последователи вирусной теории инфлюэнцы, готовили свои вакцины из матерьяла, в состав которого входил только вирус.

Естественно, что прежде, чем перейти к опытам на людях, были испытаны различные вакцины на чувствительных животных.

Смит, Эндрюс и Лейдлоу (Smith, Andrewes a. Laidlaw)¹⁷⁸ в 1935 г. изучили иммунитет к вирусу инфлюэнцы у хорьков. Их выводы подтвердились впоследствии. В настоящее время можно считать установленным следующее: 1/ после перенесенной инфекции хорьки становятся полностью резистентными к новому заражению в течение нескольких месяцев; 2/ падающий иммунитет может быть восстановлен подкожной реинъекцией живого вируса; 3/ искусственно иммунизировать хорьков полностью не удается против интраназального введения вируса. Хорьки вырабатывают лишь парциальный иммунитет, выражающийся в том, что они в большей степени противостоят

развитию легочных поражений по сравнению с контрольными животными, но так же, как и последние заболевает с поражением верхних дыхательных путей. В крови у искусственно иммунизированных хорьков так же, как и у хорьков реконвалесцентов, накапливаются антитела, нейтрализующие вирус.

Стиарт-Гаррис, Эндрюс и Смит (Stuart-Harris, Andrewes a. Smith)¹⁸⁶ /1938 г./ показали, что искусственной иммунизацией удавалось предохранить хорьков только против контактной инфекции, т.е. против очень небольших доз вируса. Аналогичные опыты Чалкиной²⁹ /1938 г./ дали такие же результаты.

Френсис (Francis)⁷³, указывая на неполный активный иммунитет у хорьков в результате вакцинации, подчеркивает, что степень его зависит от вакцинирующей дозы вируса. При интраназальном заражении хорьков минимальными инфицирующими дозами вируса вслед за слабо выраженной инфекцией создается полный иммунитет, которого нельзя достигнуть подкожной или интраперитонеальной вакцинацией максимальными дозами. Продолжительность иммунитета при интраназальном заражении зависит от силы перенесенного заболевания.

После того как стало известно, что мыши чувствительны к вирусу гриппа, были поставлены опыты активной иммунизации этих животных. Как известно, гриппозный вирус, введенный интраназально, вызывает у мышей смертельную пневмонию. Таким образом целью активной иммунизации мышей является предохранение легочной ткани от

специфических поражений.

Смит, Эндрюс и Лейдлоу (Smith, Andrewes a. Laidlaw)¹⁷³, Эндрюс и Смит (Andrewes a. Smith)³⁴, Френсис (Francis)^{71, 73}, Шинкина²⁸ и др. вакцинировали мышей подкожно и внутрибрюшинно против интраназального заражения вирусом. Взятые в опыт вакцины представляли собой живой вирус из тканей хорьков и мышей, формализованный вирус того же происхождения и культуры вируса на тканях куриного эмбриона. Авторы наблюдали зависимость между иммунизирующей дозой вируса и эффективностью вакцинации.

Относительно эффективности инактивированного вируса по сравнению с живым в литературе встречаются противоречивые данные.

В первых работах Эндрюс и Смит (Andrewes a. Smith)³⁴ показали, что формализованный вирус так же эффективен в качестве вакцины, как и живой. Однако впоследствии они изменили свой взгляд, указывая, что "инактивирование вируса формалином или нагреванием в некоторой степени всегда уменьшает его антигенную ценность"³⁵ (Andrewes a. Smith).

Эндрюс и Смит (Andrewes a. Smith)³⁴ в 1937 г. и Стюарт-Гаррис (Stuart-harris)¹⁸⁵ в 1937 г. наблюдали под'em титра сывороточных антител у людей, вакцинированных формализованным вирусом.

Окли и Уоррек (Oakley a. Warrack)¹³⁸ и Шинкина нашли, что у мышей, вакцинированных внутрибрюшинно формализованным вирусом, титр антител и иммунитет

к тому же штамму возрастали параллельно.

Итон и Бэк (Eaton a. Beck)⁶⁴ в 1940 г. показали, что живой вирус в 32 раза антигеннее формалинизированного. Кроме того авторы инактивировали вирус перекисью водорода и кислотой / pH 3,3 - 4,0/. Два последние способа инактивации полностью разрушали антигенные свойства вируса.

Сток и Френсис (Stock a. Francis)¹⁸⁰ демонстрировали сохранение антигенности вируса, инактивированного олеиновой кислотой, в опытах на мышах.

Бернет (Burnet)⁴² в культурах на хорько-аллантоисе куриного эмбриона получал вирус, не патогенный для хорьков и мышей. На основании этого он предложил свою яичную культуру в качестве вакцины для интраназальной инкуляции.

В опытах Бернета мыши и хорьки после обработки его способом приобретали прочный иммунитет против интраназального заражения мышиным пассажным вирусом.

Итон и Бэк (Eaton a. Beck)⁶⁵ объяснили опыт Бернета с точки зрения иммунизации гетерологическим штаммом вируса в отношении его адаптации к различным видам животных, или ткани эмбриона.

Иммунизирующие свойства гетерологических штаммов, по мнению этих авторов, в основном отличаются от свойств гомологичных штаммов вируса. Итон и Бэк показали, что удавалось иммунизировать мышей интраназально гомологичным мышиным штаммом вируса в живом состоянии только в том случае, если мыши активно инфициро-

вались, т.е. в легких демонстрировались специфические поражения. Наоборот, гетерологическим штаммом, например, тканевой культурой вируса, удавалось активно иммунизировать мышью интраназально независимо от развития легочных поражений.

Эндрюс и Смит (Andrewes a. Smith)³⁵ рассматривали гетерологические антигены с другой точки зрения. Они показали, что различные виды животных реагировали различно на введение гетерологических вакцин. Так, хорьки одинаково хорошо иммунизировались, как homo-, так и гетерологическими вакцинами; например, вакцинами, приготовленными, как из хорьковых, так и мышинных легких. Для мышей при внутрибрюшинном способе введения эффективной оказалась только живая вакцина, приготовленная из мышинных же легких; вакцина, приготовленная из хорьковых легких, оказалась не эффективной.

Эти авторы указали, что гетерологические вакцины эффективны лишь в живом состоянии. Формализированный мышинный вирус не иммунизировал хорьков против инфекции хотя у некоторых из них отмечался под³ем циркулирующих антител. В то же время формализованная гомологичная вакцина активно защищала хорьков против интраназального заражения живым вирусом.

Шоп (Shope)¹⁷⁰ показал в отношении вируса свиной инфлюэнцы, что вакцина, приготовленная из тканей любого вида животного /свиные, хорьковые и мышинные легкие/ одинаково хорошо защищала свиней против интраназального заражения.

морьки и мыши, по наблюдениям Шота, хорошо иммунизировались только при внутрибрюшинном введении гетерологической вакцины; подкожный способ введения был эффективен только при применении гомологичной вакцины.

Согласно наблюдениям Эндрюса и Смита (Andrewes^{34, 35} a. Smith), Френсиса и Мэджилла (Francis a. McGill)⁸⁴ внутрибрюшинная вакцинация мышей эффективнее подкожной.

Смородицэв¹⁵ получил хорошие результаты в опытах на мышах при интраназальном введении несмертельных доз живого вируса. Для этой цели автор сконструировал камеру, в которой производилось распыление эмульсии вируса. Камера была приспособлена для применения вируса ингаляционным путем.

Балькович и Архина²⁴ успешно иммунизировали мышей интраназально фильтратом живого гриппозного вируса.

Окин и Уоррек сообщали, что у мышей, вакцинированных интраназально, появлялись антитела к гетерологическим штаммам.

Таким образом в опытах на животных была доказана большая или меньшая эффективность различных вакцин против экспериментальной инфлюэнцы.

Вслед за опытами на животных появились сообщения об испытании различных вакцин на волонтерах. Сначала это были единичные опыты главным образом с целью испытания безвредности препарата. Попутно исследовались

сыворотки вакцинированных людей на содержание антител.

Бренонс и Мэджилл (Francis a. Magill)^{79, 81},
Эндрюс и Смит (Andrewes a. Smith)⁸⁴ и Стюарт-Гаррис
(Stuart-Harris)¹⁸⁵ применяли в качестве вакцин че-
ловеческий или свиной вирус, активный или формалини-
зированный, в виде фильтрата эмульсии мышинных легких
или тканевых культур. В результате подкожной и внутри-
мышечной вакцинации все эти авторы отмечали под'ем
титра антител в сыворотке волонтеров в 10 - 25 раз.

В 1941 г. Хорсфолл, Леннет и Рикард (Horsfall,
Lennette a. Rickard)¹⁰⁴ предложили комплексную вак-
цину, приготовленную из куриных вибрионов, зараженных
вирусами инфлюэнцы А и собачьей чумы штамма Х. В пред-
варительных опытах вакцинации комплексной вакциной на
хорьках оказалось, что в результате подкожной вакцина-
ции хорьки получали иммунитет к интраназальной инфек-
ции не только гомологичным вирусом, но и к инфекции
различными штаммами вируса инфлюэнцы А.

В опыте на людях были испытаны вакцины, пригото-
вленные из мышинных и хорьковых легких, на тканях кури-
ного эмбриона и на хорькон-аллантоисе, зараженных толь-
ко вирусом инфлюэнцы А и в комбинации с вирусами со-
бачьей чумы. Наиболее эффективной оказалась комплекс-
ная вакцина, приготовленная на хорькон-аллантоисе, од-
новременно зараженном вирусом инфлюэнцы А и вирусом
собачьей чумы, штаммом Х. Эффективность вакцинации
оценивалась по стимулирующему действию препарата на
продукцию антител против вируса инфлюэнцы А. Вышеука-

званная комплексная вакцина стимулировала под⁹ ем анти-
тел в 29 раз по сравнению с первоначальным.

Чалкина²⁹ наблюдала 5 - 25 кратное нарастание
уровня антител у людей, получивших живой или формали-
низированный вирус подкожно или ингаляционным путем.
В опыте было 272 человека.

Фалькович, Игнатова, Пискунова и Аркина²⁵ в ре-
зультате пульверизации фильтрата живого вируса ws в
носоглотку 6 добровольцам получили нарастание титра
антител в 2 - 5 раз против исходного. Авторы пользо-
вались вирусом, адаптированным к легким мышей.

Немногого эпидемиологические данные, касающиеся
профилактической вакцинации людей гриппозным вирусом,
относятся к работам Стюарт-Гарриса и двум работам
Стокса.

После того как Стюарт-Гаррис, Эндрюс и Смит¹⁸⁵
(Stuart-Harris, Andrewes a. Smith) убедились,
что после за вакцинацией людей формализованным
вирусом из мышиных легких наступило возрастание титра
антител, они поставили эпидемиологический опыт на
2000 человек. Группы волонтеров по 200 человек нахо-
дились в местностях, далеко отстоящих друг от друга
с той целью, чтобы хоть некоторые из них попали бы
в контакт с эпидемией, если она не будет иметь широ-
кого распространения. Половина людей в каждой группе
была оставлена в качестве контроля и не вакцинирова-
лась; другая половина получила под кожу по 2 куб.см.
формализованного фильтрата мышиных легких, зара-

женных вирусом инфлюэнцы.

К сожалению эпидемия появилась слишком рано, чтобы можно было судить об эффективности вакцинации. Известно, что антитела продуцируются не раньше 2 недель после введения антигена. Было зарегистрировано 10 случаев заболевания через 14 дней после окончания вакцинации. В части этих больных был выделен вирус.

Обсуждая успех вакцинации, авторы указывают на неидентичность штаммов, взятых для вакцинации и послужившего причиной вспышки гриппозной эпидемии. Это объяснение накладывается в противоречии с тем, что существует общий антигенный фактор во всех штаммах вируса эпидемической инфлюэнцы. Наличие антител не исчерпывает вопроса о чувствительности организма к инфекции.

Авторы приступили к эпидемиологическому опыту на основании того, что взятая в опыт вакцина стимулировала достаточный под ее титра антител.

В 1937 г. Стокс (Stokes) ^{181, 182} с сотрудниками провел два опыта вакцинации людей живым вирусом инфлюэнцы. В одном опыте, было провакцинировано 1700 человек внутримышечно фильтратом инфицированных вирусом мышинных легких и тканевых культур. Во время последующей эпидемии отмечалось большее количество заболеваний среди непривитых по сравнению с привитыми.

В другом опыте сообщается о трехкратной прививке фильтрата мышинных легких и тканевых культур вируса человеческой и свиной инфлюэнцы.

Вакцинация была начата с появлением эпидемии.

опыт было взято около 800 человек, живущих в одинаковых условиях; 110 человек получили человеческий вирус в качестве вакцины; 138 человек - свиной вирус, а 550 были оставлены как контрольная группа.

В результате опыта отмечалось значительное нарастание титра антител у 31% привитых человеческим вирусом против вируса эпидемической инфлюэнцы. Переболело инфлюэнцей 23% людей. При внимательном изучении случаев заболевания удалось определить, что среди привитых вирусом человеческой инфлюэнцы было значительно меньше лихорадочных заболеваний, чем в двух других группах. Именно, в группе привитых человеческим вирусом 2,7%, среди привитых свиным вирусом 12,5% и в контрольной группе 12,4% случаев, сопровождавшихся значительным повышением температуры. Заболевания верхних дыхательных путей без повышения температуры распределялись почти поровну во всех трех группах.

Этиологическая роль вируса в этой эпидемии была доказана на группе невакцинированных детей, у которых до эпидемии не было циркулирующих в крови антител. У этих детей антитела к вирусу человеческой инфлюэнцы впервые появились после заболевания во время данной вспышки.

Таким образом опыты активной иммунизации людей разделяются на две группы. К первой группе принадлежит большинство работ, в которых эффективность вакцинации определялась сравнительным нарастанием титра антител. Во вторую группу входят работы эпидемиологического ха-

рактера, где эффективность вакцинации определялась прямой резистентностью к заболеванию во время вспышки.

При сопоставлении приведенных опытов очевидно, что только прямая резистентность к заболеванию во время эпидемии может служить доказательством эффективности профилактической вакцинации людей.

3. Приготовление гипериммунных сывороток.

Лейдлоу, Смит, Эндрюс и Дэнкин (Laidlaw, Smith, ¹¹⁸ Andrewes a. Dunkin) еще в 1935 году приготовили гипериммунную сыворотку на лошадях. Перед началом иммунизации авторы доказали, что лошади нечувствительны к заражению вирусом человеческой и свиной инфлюэнцы.

Антиген для иммунизации лошадей авторы готовили из хорьковых легких, инфицированных вирусом инфлюэнцы. Полученная иммунная сыворотка нейтрализовала в разведении 1:30 несколько сотен инфекционных доз вируса в опытах на хорьках и мышах, а также обладала профилактическими и лечебными свойствами. Сыворотка от одной из этих лошадей, иммунизированной вирусом человеческой инфлюэнцы, под названием 1H-2 была предложена авторами в качестве стандартной для идентификации вирусов человеческой инфлюэнцы.

Сморodinцев ¹¹⁹ подтвердил данные английских авторов о том, что лошади являются весьма подходящими животными для получения активных противогриппозных сывороток.

Автор иммунизировал подкожно 5 лошадей эмульсией

мышинных и хорьковых легких. От двух лошадей он получил активную сыворотку, которая нейтрализовала в разведении 1:800 1000 смертельных доз вируса для мыши и обладала профилактическими и лечебными свойствами.

⁹⁸
Хэйр (Hare) иммунизировал одну лошадь эмульсией хорьковых легких и получил сыворотку, которая обладала некоторыми профилактическими и лечебными свойствами. Так, введение этой сыворотки предохраняло от гибели мышей, зараженных 1 ДМ вируса. У мышей, зараженных сублетальными дозами вируса, наблюдалось уменьшение легочных поражений в результате введения сыворотки.

²⁷
Шахмалиева получала гипериммунную сыворотку при иммунизации лошади личинками культурами человеческого и свиного вирусов. Сыворотка обладала способностью нейтрализовать вирус гриппа, сообщать мышам пассивный иммунитет и в некоторой степени лечить их от гриппозной инфекции.

⁹⁸ ¹⁷⁵
Хэйр (Hare) и Смит (Smith) приготовили иммунные сыворотки на козах. Хэйр получал сыворотку, которая по титру была равна стандартной английской сыворотке 1Н-2. В качестве антигена авторы пользовались хорьковыми легкими.

¹⁸⁵
Стюарт-Гаррис, Эндрюс и Смит (Stuart-Harris, Andrewes a. Smith) испытали на людях иммунные лошадиные сыворотки для лечения инфлюэнцы. Была сделана попытка сывороточного лечения 9 больных. Выводы самих авторов не обнадеживающие, так как определенный

эффект в смысле детоксикации был получен только при интравенозном введении от 50 до 75 куб.см. сыворотки.

Сморodinцев^{15, 20} указал на благотворное действие лошадиной иммунной сыворотки при терапии и профилактике гриппа. Он предложил вводить сыворотку путем ингаляции прямо в дыхательный тракт. Сыворотка распылялась в особом аппарате - камере, откуда поступала в дыхательные пути. Камера приспособлена для одновременной ингаляции 10-15 человек. По предложению Смородинова оценку лечебного действия ингаляций иммунной сыворотки произвели Ночаев, Кориунова и Вору¹³.

Сыворотка, предназначенная для серотерапии и профилактики гриппа, по требованию автора должна быть особенно высокого титра. Такая сыворотка должна содержать в 1 куб.см. достаточное количество вирулицидных антител, чтобы нейтрализовать не менее 5 - 10 миллионов смертельных доз вируса для мыши.

Из приведенной литературы видно, что опыт приготовления гипериммунной лошадиной сыворотки высокого титра достаточно мал. Вследствие этого серопротекция и серотерапия гриппа не получила широкого применения, необходимого для определения их эффективности.

- - - - -

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

История этиологии гриппа пережила несколько этапов всеобщего увлечения различными видами микроорганизмов, как предполагаемых возбудителей заболевания.

Судьба каждого из них решалась главным образом на основании выделяемости от больных во время эпидемии. Этиологическая роль бактерии Кфейффера была в значительной мере опровержена тем, что многим исследователям не удавалось выделить этих микробов во время пандемии 1918 года.

Последователи вирусной этиологии гриппа долгое время не располагали методикой выделения вируса. Смит, Эндрюс и Лейдлоу в 1933 году выделили фильтрующийся вирус из отделяемого носоглотки гриппозных больных. Авторам удалось воспроизвести экспериментальную инфекцию на хорьках и пассировать вирус на этих животных. Неудача своих предшественников они объясняли отсутствием подходящей экспериментальной модели для культивирования вируса.

После того как оказалось, что вирус может быть адаптирован к мышам, появилась обширная литература по изучению его свойств. Пассирование на хорьках и мышах было признано общепринятым методом выделения вируса от больных гриппом.

Однако сообщения об отрицательных результатах опытов выделения вируса в течение нескольких эпидемий заставили исследователей пересмотреть роль этого вируса

в этиологии гриппа.

Для объяснения непостоянства выделяемости вируса было предложено с одной стороны дифференцировать эпидемический грипп вирусной этиологии от гриппоподобных заболеваний бактериального происхождения. С другой стороны все виды гриппа рассматривались с точки зрения вирусной этиологии. При этом явилась необходимость в признании множественности типов гриппозного вируса.

Вирусы, выделенные на хорьках или мышах и идентифицированные с возбудителем гриппа Смита, Эндриуса и Лейдлоу, были названы вирусами инфлюэнцы типа А. Грипп, при котором не удавалось выделить вирус на хорьках или мышах, было предложено рассматривать как заболевание неизвестной, вероятно, также вирусной этиологии.

Выделение возбудителей гриппозных заболеваний, клинически неотличимых от заболевания типа А, по видимому, связано с изысканием новой методики культивирования.

При изучении биологических свойств вируса инфлюэнцы типа А не все авторы пришли к совпадающим выводам.

Мы приводим здесь разноречивые данные по культивированию вируса на куриных эмбрионах. В результате исследований одних авторов /Френсис, Бернет/³ вирус инфлюэнцы легко культивировался на куриных эмбрионах при непосредственном заражении последних материалом

от гриппозных больных. Другие авторы пришли к отрицательным выводам при культивировании вируса в аналогичных условиях. Нигр, Вильсон и Кроули успешно культивировали на куриных эмбрионах только такой вирус гриппа, который был предварительно адаптирован к мышам или хорькам.

В обзоре приведено много работ по изучению иммунитета при гриппе. Бесспорно доказанным является факт накопления антител, нейтрализующих вирус, в крови людей и животных после перенесенного заболевания или искусственной иммунизации. Защитная роль этих антител в борьбе с инфекцией была подвергнута сомнению. У различных животных наблюдалась различная чувствительность к инфекции несмотря на большое количество антител в крови.

В опытах активной иммунизации мышей наблюдался параллелизм между концентрацией антител и напряженностью приобретенного иммунитета. В результате искусственной иммунизации хорьков отмечалось накопление антител при отсутствии полной резистентности к заболеванию. Как известно из повседневной практики почти все люди подвержены повторным заболеваниям гриппом независимо от наличия циркулирующих в крови антител.

Несмотря на отсутствие иммунитета у людей после естественного заболевания исследователи изучают проблему профилактической вакцинации при гриппе. Применение вакцин, приготовленных из тканой мышей, хорьков и куриных эмбрионов, инфицированных вирусом, дало

сомнительные результаты в нескольких эпидемиологических опытах.

Антитела, аналогичные тем, которые накапливаются в организме чувствительных к гриппу животных, могут быть получены в крови нечувствительных животных. Путем искусственной иммунизации кроликов, коз и лошадей были получены иммунные сыворотки против вируса гриппа.

Конечной целью приготовления иммунных сывороток являлось их применение для терапии и профилактики гриппа.

Недостаточно изучена методика иммунизации животных для получения сывороток высокого титра. Опыт применения этих сывороток на людях слишком мал, чтобы судить об их эффективности. Однако благоприятные результаты опытов Смородинцева позволяют думать об эффективности сыворототерапии и сыворотопрофилактики гриппа.

В задачу наших экспериментов входило изучение свойств вируса гриппа с целью выяснения тех противоречий, которыми полна литература по этому вопросу.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.

Глава 1. Опыт выделения вирусов от людей, больных гриппом и насморком.

С целью биологической идентификации возбудителя гриппа нами было выделено от больных 37 штаммов фильтрующихся вирусов. Из этого количества 31 штамм был получен от больных с клиническим диагнозом "грипп" и 6 штаммов от больных катарром верхних дыхательных путей с картиной острого насморка.

1. Материал для исследования.

В целях получения материала от соответствующих больных мы связались с гриппозным отделением 2-й городской больницы и с двумя районными поликлиниками г. Москвы.

Материалом для исследования на присутствие гриппозного вируса служили смазвы отделяемого носоглотки от стационарных и лабораторных больных с диагнозом "грипп"; в нескольких случаях была исследована мокрота больных гриппозной пневмонией. Смазвы от 260 больных неосложненным гриппом и от 16 больных гриппозной пневмонией были исследованы во время эпидемических вспышек весной в 1940 и 1941 г.г.

Во внеэпидемическое время осенью в 1937, 1939 и 1940 гг. изучались смазвы от больных спорадическим гриппом и насморком. Мы исследовали 30 носоглоточных смазков от таких больных.

Смазвы отделяемого носоглотки производились лечащими врачами в момент постановки диагноза. Для взятия смазков отбирались больные, у которых болезненные симптомы развились за

24 - 36 часов до посещения врача.

В качестве смывной жидкости употреблялся физиологический раствор поваренной соли. Смывная жидкость вводилась в нос больного стерильной пастеровской пипеткой в количестве 2-3 см³, после чего больной выплевывал ее в стерильную банку с бусами. Туда же присоединялась жидкость после полоскания горла небольшим количеством физиологического раствора (5 - 10 см³).

Носоглоточные смывы доставлялись в лабораторию для исследования на присутствие вируса не позже, чем через 2-3 часа после взятия от больных. К смывам добавлялось равное количество бульона. Полученная таким образом смесь встряхивалась с бусами до образования равномерной эмульсии, которая ^{фильтровалась} затем через свечи Шамберлена Лз, расщепленные вдвое пластинки Зейтца или градоколовые мембраны с порами величиной от 400 до 800 м μ . В предварительном опыте было установлено, что эти три вида ультрафильтров свободно пропускают частицы гриппозного вируса, задерживая бактериальную микрофлору.

Часто при фильтровании об"единялись смывы от 2 - 3 больных.

Каждый фильтрат проверялся на стерильность путем посева на обычные питательные среды. Стерильные фильтраты служили исходным материалом для культивирования вирусов с целью их выделения.

2. Методика культивирования вирусов.

Мы испытали два способа выделения вирусов: на мышах и на куриных эмбрионах.

Выделение вирусов на мышах. Как известно вирус гриппа

культивируется в организме мышей при последовательном пас-
сировании инфицированного материала. Местом размножения
вируса является легочная ткань мышей.

Согласно общепринятой методики мы заражали молодых мышей
фильтратами смывов носоглотки от больных людей. Зараже-
ние производилось интраназально под легким эфирным нарко-
зом. Для этого подопытных мышей помещали в закрытый ста-
кан с ватой, смоченной эфиром, на 1-2 мин.. После присту-
па возбуждения у мышей наблюдалась сонливость и они теря-
ли равновесие. Этот момент использовался для введения в
нос испытуемого материала. При равномерном дыхании удава-
лось инстиллировать в каждую ноздрю по 5 капель жидкости
из капилляра пастеровской пипетки, что составляло дозу
около $0,05 \text{ см}^3$. По прекращении действия наркоза восстанав-
ливалась свойственная мышам подвижность.

Интраназальное введение под наркозом бульона, не содер-
жавшего вируса, не оказывало никакого действия на здоровье
мышей. На основании этого мы считали, что эфирный наркоз
не являлся причиной пневмонии или других патологических
симптомов в дыхательном тракте подопытных мышей.

После интраназального заражения мышей материалом, в ко-
тором предполагалось обнаружить вирус, их помещали в прос-
торные банки. Мыши находились под наблюдением в течение
3-5 дней.

Всех мышей, погибших до истечения этого срока, вскры-
вали, тщательно исследуя легкие на наличие поражений. Мы-
шей, оставшихся живыми по истечении указанного срока, уби-

вали хлороформом, вскрывали и также тщательно осматривали их легкие. В протоколе отмечалось наличие или отсутствие изменений в легких. После бактриоскопического анализа мазков, приг^отовленных из кусочков легочной ткани, отбирались легкие, в которых не было обнаружено микробов. Мыш^инные легкие от каждого случая соединялись вместе, легочная ткань отделялась от трахеи и крупных бронхов и после взвешивания растиралась в ступке с стерильным песком. Из растертых легких приготавлилась 10% эмульсия *), которая подвергалась центрифугированию в течение 2-3 мин. для осаждения крупных кусочков ткани и песка. Центрифугат служил материалом для следующего пассажа на мыш^ах.

Последовательно пассируя исходный материал от больных гриппом мы наблюдали в некоторых случаях появление пневмонии у мыш^и. На аутопсии можно было видеть различную степень поражения легочной ткани от едва заметных невооруженным глазом очагов до сплошной гепатизации легких. Объем поражений мы отмечали крестами согласно обще-принятому способу описанному в литературном обзоре.

Если после 8-9 последовательных пассажей нефльтрованной взвеси легочной ткани не наблюдалось пневмонии у подопытных мыш^и, то пассирование прекращалось.

В каждом отдельном случае определялась специфичность пневмонии, как признака культивируемости вируса. Устанавли-

х) В течение всей работы разведения тканей, испытываемых на содержание вируса, производились на бульоне или на бульоне, разбавленном вдвое физиологическим раствором.

балась бактериологичная стерильность пораженной легочной ткани и фильтруемость возбудителя пневмонии.

Для этой цели эмульсия, предназначенная для очередного пассажа на мышах, пропускалась через один из вышеописанных ультрафильтров. Появление пневмонии после интраназального заражения фильтратом инфицированного легкого от предыдущего пассажа указывало на наличие культуры фильтрующегося вируса в организме мышей.

Последним этапом для доказательства идентичности вируса, выделенного на мышах, с вирусом Смита, Эндрюса и Лейдлоу, являлся опыт нейтрализации нового штамма противогриппозной иммунной сывороткой. Для этого взвесы легких, содержащих вирус, смешивалась с равным объемом антигриппозной лошадиной сыворотки, приготовленной против вируса инфлюэнцы типа А.

В целях стандартизации опыта нейтрализации предварительно определялся титр испытуемого вируса. Титром вируса мы называем то наивысшее разведение его культуры, которое вызывает смертельные поражения легочной ткани у 50% мышей при интраназальном заражении.

Производя 10-кратные разведения легочной ткани инфицированной вирусом и заражая этими разведениями свежих мышей мы наблюдали различную вирулентность отдельных штаммов. В большинстве случаев вирусы были патогенны для мышей в разведениях $1:10^6$ - $1:10^7$.

На основании развития поражений легочной ткани у мышей при заражении их различными разведениями вируса устанавливалась минимальная смертельная доза данного штамма (ИДМ). *ИДМ*

~~интравенно~~ ~~интравенно~~ ~~интравенно~~ ~~интравенно~~ (и/или). Минимальная смертельная доза вируса для мышей соответствовала его титру. Опыты нейтрализации всегда ставились при определенных условиях разведения вируса и сыворотки. Для целей идентификации вируса употреблялось разведение его, соответствующее 1000 ДЛМ, при разведении сыворотки 1/2 - 1/10.

В этих опытах мы пользовались сывороткой, которая была приготовлена нами против штамма "Сморозинцева". В качестве контроля служила также взвесь мышинных легких, но вместо иммунной сыворотки к ней прибавлялась нормальная лошадиная сыворотка. После 20-ти минутного выдерживания обеих смесей в термостате при 37⁰С они вводились свежим мышам интраназально под эфирным наркозом.

В течение 10 дней велось наблюдение за всеми мышами. Если при гибели контрольной группы с явлениями сплошной гепатизации легких подопытные мыши оставались живыми, то мы считали, что специфическая сыворотка нейтрализовала действие вируса. Положительный результат опыта нейтрализации являлся докательством того, что вновь выделенный штамм принадлежал к группе вирусов инфлюэнцы типа А.

Что^{бы} избежать случайного присоединения одного из вирусов, с которыми велась работа в лаборатории, все опыты по выделению новых штаммов на мышах проводились в отдельном боксе специально выделенным лаборантом.

На основании опыта работы по выделению вирусов от людей, больных гриппом, следует отметить некоторые особенности их культивирования на мышах. Мы разделили свои наблюде-

ния на три группы в зависимости от развития легочных поражений у подопытных мышей.

К первой группе мы отнесли опыты, при которых вирус легко адаптировался к мышам. В некоторых случаях с самого первого пассажа обнаруживалась специфическая пневмония у мышей. После второго пассажа мыши погибали с явлениями сплошной гепатизации легких через 3-4 дня после интраназального заражения. Этот срок развития смертельной пневмонии фиксировался во времени при дальнейшем серийном пассировании материала от больных мышей на здоровых. Поражала быстрота и легкость выделения таких штаммов. Однако в большинстве случаев адаптация происходила постепенно. После 2-3 инапарантных пассажей наблюдалось появление незначительных очагов поражения легочной ткани; в следующих пассажах размер поражений увеличивался до сплошной гепатизации легочной ткани со смертельным исходом на 3-4 день после заражения. В опытах первой группы один раз появившаяся смертельная пневмония легко воспроизводилась в серии пассажей. При этом источниками вируса могли служить, как легкие мышей, погибших с явлениями пневмонии, так и нормальные на вид легкие мышей, убитых на второй день после заражения.

Ко второй группе принадлежали случаи с отрицательным результатом опытов выделения вируса на мышах. При этом не наблюдалось никакого изменения легочной ткани у мышей. В серии пассажей легкие оставались совершенно нормальными при полном здоровье животных в течение неограниченно длительного времени.

В некоторых случаях мы наблюдали появление очагов поражения легочной ткани. Однако, при дальнейшем пассировании не удавалось добиться увеличения объема поражения легких; Наоборот, исчезали все признаки пневмонии. От этих случаев также не удавалось выделить вирус на мышах.

Наконец, в 3-й группе опытов наблюдалось более или менее значительное поражение легочной ткани при явлениях бактериальной инфекции. В некоторых случаях это была пневмония с очаговыми или сплошными поражениями легочной ткани; в других случаях наблюдалось образование абсцессов.

Бактериоскопическое исследование мазков и посевы на питательные среды кусочков пораженной ткани указывали на присутствие бактерий. В большинстве случаев это были грамположительные палочки типа дифтероидов или диплококки. Иногда удавалось доказать наличие смешанной инфекции и отфильтровать вирус из загрязненного материала. Чаще поражения легочной ткани имели не специфический характер. С удалением микрофлоры путем ультрафильтрации прекращалось развитие пневмонии у мышей в следующих пассажах.

Пользуясь методом последовательных пассажей на мышах мы выделили 21 штамм вируса из 141 пробы носоглоточных смывов, объединенных от 260 больных во время вспышек гриппа весной 1940 и 1941 г.г.

Применяя ту же методику в отношении спорадического гриппа нам не удалось выделить вирус ни от одного из 30 обследованных больных. Ни разу вирус не был выделен от больных гриппозной пневмонией.

Выделение вируса на куриных эмбрионах. В целях выделения вируса на куриных эмбрионах мы испытали метод хорион-аллантоисных культур Гудпасчера в модификации Шахмалиевой и Бауэр.

Исходным материалом в опытах выделения вируса на курином эмбрионе являлся фильтрат отделяемого носоглотки аналогичный с тем, которым мы пользовались для выделения вируса на мышах.

Для опыта культивирования вируса отбирались оплодотворенные яйца, которые предварительно инкубировались в течение 3-4 дней х). При просвечивании таких яиц обнаруживался развивающийся эмбрион.

Техника культивирования заключалась в следующем. Подготавливался бокс, в котором происходила вся работа по культивированию вируса на яйцах. Стены его и необходимые предметы обтирались 3% раствором карболовой кислоты. Тем же раствором производилась пульверизация помещения.

Заранее отобранные яйца переносились из инкубатора в бокс для заражения. Скорлупа яйца на том месте, куда яснее всего проектировалось изображение зародыша, обтиралась спиртом и иодом и фламбировалась на пламени горелки. В центре обесчешенного участка скорлупы делался прокол стерильной иглой. В отверстие вносился материал в количестве приблизительно $0,1 \text{ см}^3$ при помощи пастеровской пипетки. Отверстие

х) В качестве инкубатора использовался обычный термостат с температурой 38-39°C, снабженный приспособлениями для увлажнения воздуха.

заливалось растопленной смесью парафина с воском и яйцо переносилось в инкубатор.

В течение 4-х суток ежедневно изменялось положение зараженных яиц. Затем яйца извлекались из инкубатора и переносились в бокс для вскрытия.

Вскрытие яиц производилось со стороны противоположной той, на которой делался прокол скорлупы при введении испытуемого материала. После обеспложивания скорлупы тем же способом, который применялся при инокуляции яйца, она обрезалась стерильными ножницами и эмбрион переносился в стерильную чашку Петри.

Для получения субкультур употреблялись сосудистые оболочки инфицированных яиц. Оболочки отделялись от других тканей эмбриона и помещались в стерильную банку с бусами. Путем встряхивания с бусами из оболочек приготавлилась гомогенная кашица, которая затем эмульгировалась в небольшом количестве физиологического раствора поваренной соли (около 2-3 см³). Часть этой эмульсии употреблялась для следующего пассажа на новые яйца; другая часть засеивалась на питательные среды для контроля на стерильность.

Активность вируса в культуре на курином эмбрионе определялась его патогенностью для мышей. В случае достаточного размножения вируса на оболочках эмбриона можно было предполагать, что личная культура вируса будет служить причиной пневмонии у мышей. С этой целью мы вводили мышам интраназально эмульсию из оболочек инфицированного эмбриона. Мы наблюдали развитие очаговых и сплошных поражений.

легочной ткани у мышей при заражении их яичными культурами вируса.

Признаком активности яичных культур вируса также являлась задержка нормального развития зародыша во время инкубации инокулированного яйца.

В яичных культурах также как и в культурах на мышинных легких определялась фильтруемость полученного вируса, его титр и способность обезвреживаться противогриппозной иммунной сывороткой.

Как источник вируса для этих опытов мы брали центрифугат 10% взвеси сосудистых оболочек зародыша на физиологическом растворе поваренной соли. В качестве биологической модели использовались мыши при условии интраназального введения испытуемого материала.

Методом яичных культур мы выделили 6 штаммов вирусов от 8 больных насморком осенью 1937 г.. Попытка применить этот метод для выделения вирусов от больных эпидемическим гриппом оказалась неудачной. Однако, вирусы гриппа, выделенные на мышах легко культивировались при перенесении их на яйца.

Подробное изучение и свойства яичных культур вирусов гриппа будут описаны в гл. II.

3. Изучение вирусов, выделенных от больных гриппом людей.

Как указывалось выше нами были выделены на мышах новые штаммы вирусов от больных гриппом. Во время вспышки

весной 1940 г. было выделено 3 штамма и весной 1941 г. 18 штаммов вирусов.

Штаммы вирусов, выделенные в 1940 г., получили название "№ 4", "№ 5" и "№ 6" по порядковому номеру обследованного материала.

Штаммы вирусов 1941 г. были названы частью по номерам обследованных случаев, частью по фамилиям больных. Двойная цифра в названии вируса указывала на то, что данный штамм был выделен из смеси смывов от двух или более больных.

Выделяемость вируса в течение эпидемии. Приступая к

к изучению свойств вновь выделенных штаммов фильтрующихся вирусов мы попытались определить процент их выделяемости на мышах.

Эпидемия в начале апреля 1940 г. носила характер короткой вспышки и уже в последний день взятия смывов подходила к концу. Три штамма выделенных нами вирусов были получены из 8 образцов материала, об"единенного от 31 больного в первые два дня работы. В следующие 3 дня не было выделено ни одного штамма из 6 фильтратов носоглоточных смывов, об"единенных от 23 больных гриппом и из мокроты от 16 больных гриппозной пневмонией. Таким образом всего было обследовано во время эпидемии 1940 г. 70 больных.

На довольно большом материале 1941 г. мы изучали выделяемость вируса на протяжении 4-х месяцев от начала вспышки.

Эпидемия началась в первой декаде марта. При распределении по месяцам положительных находок вируса мы наблюдали, что наибольшее количество было выделено в начале вспышки. Несмотря на то, что в марте было исследовано всего 13 образцов смывов от 21 больного, мы выделили 9 штаммов вирусов, что составляло 70% положительных находок.

В апреле мы пытались выделить вирус из 67 фильтратов, об"единенных от 113 больных. Из этого количества было выделено 7 штаммов вирусов, что составляло около 10% положительных находок. В мае из 37 фильтратов носоглоточных смывов от 60 больных удалось выделить только 2 штамма, что составило 5% выделяемости. В июне из 10 проб от 12 гриппозных больных ни в одном случае не был выделен вирус. Таким образом было обследовано 206 больных.

На таблице 1 отражено падение процента выделяемости вируса в течение эпидемии 1941 г.

Табл.1

Выделяемость вируса в течение эпидемии.

Месяцы.	Выделение вирусов.		
	Из числа фильтратов	Количество положит. находок.	% находок.
М а р т	13	9	70 %
апрель	67	7	10 %
М а й	37	2	5 %
Июнь	10	0	0
Итого:	127	18	28 %

Несмотря на значительно большее количество смывов, обследованных в апреле по сравнению с мартом, в марте вирус был выделен в 70% случаев, а в апреле только в 10%.

Чем дальше отстояла дата наших опытов от начала эпидемии, тем ниже падал процент выделяемости вируса от больных с клиническим диагнозом "грипп".

В среднем вирусы были выделены в 1940 г. в 21% случаев при обследовании материала от 54 больных, объединенного в 14 пробах, и в 1941 г. в 28% из материала от 206 больных, объединенного при фильтрации в 127 пробах.

Все вновь выделенные вирусы были профильтрованы через ультрафильтры и проведены в 2-3 сериях пассажей прежде чем подверглись дальнейшему изучению.

Патогенность различных штаммов вируса для мышей.

В предыдущем разделе мы подвели итог выделяемости вируса на мышах из фильтратов ^Тоделяемого носоглотки гриппозных больных.

В целях сравнительного изучения патогенности этих вирусов для мышей мы определили титр каждого штамма по вышеописанной методике. При этом удалось установить некоторую зависимость между высотой титра и быстротой адаптации отдельных штаммов к мышам.

На табл. 2 приведены результаты опыта титрования вирусов с указанием даты получения соответствующих смывов от больных и числа пассажей, после которых устанавливалась постоянная гибель мышей с явле-

ниями смертельной пневмонии. Следует отметить, что с увеличением общего количества пассажей сглаживалась разница в титре у отдельных штаммов. Поэтому мы приводим данные титрования вирусов после нескольких первых пассажей на мышах.

Табл. 2.

Высота титра в связи с быстротой адаптации вирусов к мышам.

Название штаммов.	Дата получения смывов.	Колич. пассажей при адаптац. вирусов к мышам.	Титр вируса.
№ 4.	3/IV-40 г.	5	10^{-4}
№ 5	4/IV-40 г.	2	10^{-7}
№ 6	4/IV-40 г.	5	10^{-4}
Рубцов	10/III-41 г.	4	10^{-6}
Нахимова.	11/III-41 г.	3	10^{-7}
Лоскутова	13/III-41 г.	3	10^{-8}
№ 9	17/III-41 г.	4	10^{-7}
№ 10-11	18/III-41 г.	3	10^{-8}
№ 12	19/III-41 г.	5	10^{-3}
№ 13-14	21/III-41 г.	3	10^{-7}
№ 15	25/III-41 г.	3	10^{-8}
№ 23	31/III-41 г.	8	10^{-3}
№ 38	2/IV-41 г.	2	10^{-6}
Чумнов.	3/IV-41 г.	2	10^{-6}
№ 40	6/IV-41 г.	4	10^{-8}
№ 42-43	6/IV-41 г.	3	10^{-8}
Кашурин.	7/IV-41 г.	7	$<10^{-3}$
№ 54-55	9/IV-41 г.	3	10^{-6}
№ 56-58	9/IV-41 г.	5	$<10^{-3}$
№ 157	12/V-41 г.	3	10^{-7}
№ 191-194	24/V-41 г.	3	10^{-6}

При рассмотрении табл.2 мы отмечаем, что штаммы исследованных вирусов разделились по титру на две группы.

15 штаммов первой группы были активны в разведении от 10^{-6} до 10^{-8} ; 6 штаммов второй группы активны при разведении 10^{-4} - 10^{-3} и ниже. Штаммы с высоким титром быстрее адаптировались к мышам, чем штаммы с низким титром. Это свойство выявляется, если обратить внимание на то, что штаммы с высоким титром были выделены после 2 - 4 последовательных пассажей, а штаммы низкого титра адаптировались к мышам лишь после 5 - 8 пассажей.

При изучении дат получения смывов от больных в связи с выделением вирусов различного титра не удалось установить преимущественного появления более активных штаммов в какой-либо период эпидемии. Так из 18 вирусов 1941 г. в марте было выделено 7 штаммов с титром 10^{-6} - 10^{-8} и 2 штамма с титром 10^{-3} ; в апреле было получено 5 вирусов с титром 10^{-6} - 10^{-8} и 2 вируса с титром ниже, чем 10^{-3} ; в мае было выделено два вируса с титром 10^{-6} и 10^{-7} .

Идентификация новых штаммов с вирусом инфлюэнцы.

Как указывалось в методике выделения вирусов на мышах идентификация новых штаммов с ранее изученными штаммами основана главным образом на опытах нейтрализации этих вирусов специфическими антисыворотками.

Три штамма вирусов, выделенных в 1940 г., были идентифицированы с вирусом гриппа типа А. Они не нейтрализовались противогриппозной лошадиной сывороткой, приготовленной против вируса "Смординцева". При попытке идентифицировать штаммы

вирусов, выделенных в 1941 году, той же сывороткой мы получили другие результаты. На табл.3 представлены данные опыта нейтрализации противогриппозной сывороткой трех штаммов вируса, выделенных в 1940 году и 18 штаммов вируса, выделенных в 1941 году. В качестве контроля в опыт был включен штамм Смородинцева, который, как известно, был идентифицирован с вирусами Смита, Ондруса и Лейдлоу.

Свойство каждого вируса обезвреживаться противогриппозной сывороткой было испытано на 3-х мышах.

Табл.3.

Опыт нейтрализации вирусов 1940-41 г.г. противогриппозной иммунной сывороткой.

Вирусы	№ 4	№ 5	№ 6	Рубцов.	Пахомов.	Лоскутова.	№ 9	№ 10-11	№ 12	№ 13-14	№ 15	№ 23	№ 28	Чуинов.	№ 40	№ 42-43	Капурин.	№ 54-55	№ 56-58	№ 157	Т 191-194	Смородин.
Сыворотки.																						
Противогриппозная лошадиная.																						
Нормальная лошадиная.																						

Обозначения.  Мыши, погибшие с явлениями сплошной гепатизации легочной ткани.

 Мыши, у которых на вскрытии были обнаружены различные степени поражения легочной ткани.



 Мыши, у которых на вскрытии не наблюдалось никаких поражений легочной ткани.

Результаты опыта, изображенного на табл.3, показали, что три вируса 1940 г. и 12 вирусов 1941 г. были нейтрализованы более или менее полно противогриппозной иммунной сывороткой, приготовленной против штаммов инфлюэнцы типа А.

6 вирусов, выделенных в 1941 г., оказались неспособными к нейтрализации этой сывороткой. Мыши, зараженные вирусами №-12, №-28, Чумнова, №-40, № 42-43 и № 191-194 в смеси с противогриппозной сывороткой, пали с такими же поражениями легочной ткани, как и контрольные.

Данные этого опыта указывают на то, что только часть новых штаммов принадлежит к вирусам инфлюэнцы типа А.

С целью установления связи этих вирусов с заболеванием, которое клиницисты диагностировали, как грипп, был поставлен опыт нейтрализации вирусов сыворотками от нескольких реконвалесцентов.

Мы получили в период реконвалесценции 7 сывороток от тех лиц, у которых был выделен вирус во время заболевания гриппом. Эти сыворотки были взяты через 1-2 месяца после начала заболевания. Каждой смесью вируса с сывороткой было заражено по две мыши. Обозначения легочных поражений у мышей на табл. 4 такие же, как и на табл. 3. Каждый вирус был соединен с гомологичной сывороткой; в некоторых случаях вирусы подверглись действию гетерологичных сывороток. Именно, сыворотка Чумнова испытывалась только с вирусом Чумнова; сыворотка №-28 испытывалась тоже только с гомологичным вирусом № 28; сыворотки Некрасова и Егорова испытывались каждая в отдельности с вирусом № 54-55; сыворотка № 157 испытывалась с гомологичным вирусом № 157 и с гетерологичным вирусом № 40; сыворотка Афоненко

проверялась с вирусом № 191-194 и с вирусом № 42-43. В некоторых случаях рядом с наименованием сывороток реконвалесцентов помещены в скобках номера вирусов. Это сделано потому, что данный вирус был выделен из смеси смывов от нескольких больных, а сыворотка получена только от одного из реконвалесцентов.

Табл. 4.

Опыт нейтрализации вирусов сыворотками реконвалесцентов.

Сыворотки \ Вирусы	Чумнов	№ 28	№ 54-55	№ 157	№ 40	№ 10-11	№ 15	№ 191-4	№ 42-43
Чумнова	■								
Грачева /№ 28/		■							
Некрасова /№ 54-55/			□						
Егорова /№ 54-55/			□						
Драконова /№ 157/				■	■				
Коробейникова /№ 15/						□	□		
Афоненко /№ 191-4/								■	■

Как видно из табл. 4 сыворотки Некрасова и Егорова, от которых был выделен вирус № 54-55, полностью нейтрализовали свой вирус. Этот же вирус нейтрализовался противогриппозной лошадиной сывороткой. На основании нейтрализации этого вируса противогриппозной лошадиной сывороткой и сыворотками от обоих реконвалесцентов мы считаем, что вирус № 54-55 принадлежит к типу вирусов инфлюэнцы А и что он выделен от 2 больных гриппом.

Сыворотка больной Коробейниковой, от которой был выделен вирус № 15, кроме своего вируса нейтрализовала вирус № 10 - 11. Ввиду того, что оба эти вируса в предыдущем опыте были нейтрализованы противогриппозной лошадиной сывороткой, они также могут быть отнесены к вирусам инфлюэнцы типа А. Нейтрализация вирусов № 10 - 11 и № 15, идентифицированных с вирусом гриппа, сывороткой больного № 15 дает основание подтвердить ретроспективно правильность диагноза.

Сыворотка Драконова, от которого был выделен вирус № 157 не нейтрализовала свой вирус. Однако, этот вирус был нейтрализован противогриппозной лошадиной сывороткой. Этот случай может служить примером отсутствия антител в сыворотке реконвалесцента через полтора месяца после заболевания. В этой же сыворотке наблюдалось отсутствие антител к вирусу № 40, не принадлежавшему типу инфлюэнцы А.

Сыворотка Афоненко, одного из участников смеси, из которых был выделен штамм № 191 - 194, не нейтрализовала свой вирус. Этот вирус не нейтрализовался лошадиной сывороткой против вируса инфлюэнцы А. Отсутствие нейтрализующей способности этой сыворотки в отношении гомологичного вируса можно объяснить тем, что вирус № 191 - 194 был выделен не именно от этого участника смеси носоглоточных смывов.

Сыворотки двух больных, Чумнова и Грачева, не нейтрализовали своих вирусов. От больного Грачева был выделен вирус № 28, от больного Чумнова был выделен вирус под названием Чумнова. Оба вируса дали отрицательные результаты в опыте нейтрализации противогриппозной лошадиной сывороткой типа А. Неспособность этих вирусов нейтрализоваться сыворотками от соответствующих реконвалесцентов и типовой противогриппозной сывороткой давала повод сомневаться в их этиологической

роли при данном заболевании. Однако, результаты следующего опыта позволяют иначе истолковать это явление.

Для более полного изучения антигенного строения новых штаммов были приготовлены специфические кроличьи сыворотки против вирусов Чумнова, № 157 и № 15. Сыворотка против каждого из трех штаммов была получена на двух кроликах через 10-12 дней после однократного внутрибрюшинного введения эмульсии мышинных легкик, инфицированных соответствующими вирусами. Смесь сывороток от обоих кроликов соединялась с гомо- и гетерологичными штаммами и контрольным вирусом Смородинова. Каждой смесью заражалось по две мыши.

Табл. 5.

Опыт перекрестной нейтрализации вирусов кроличьими сыворотками.

Вирусы Сыворотки	№ 157	Чумнов	№ 15	Смородинова
Кроличья № 157				
Кроличья - Чумнов				
Кроличья - № 15				
Лошадиная - противогриппозная				
Кроличья - нормальная				

На табл. 5 представлены суммарные результаты опыта перекрестной нейтрализации на мышах. При рассмотрении таблицы видно, что все иммунные кроличьи сыворотки

нейтрализуют вирус Смородинцева. Опыт нейтрализации противогриппозной лошадиной сывороткой дал положительный результат со всеми вирусами кроме вируса Чумнова, как это отмечалось раньше.

Кроличьи сыворотки, приготовленные против штаммов № 157 и № 15, достаточно хорошо нейтрализуют эти вирусы в перекрестном опыте.

Иная картина представляется в отношении вируса Чумнова. Этот вирус не нейтрализуется ни гомо-, ни гетерологичными кроличьими сыворотками, ни лошадиной противогриппозной сывороткой. Как показано в предыдущем опыте вирус Чумнова не был нейтрализован собственной сывороткой реконвалесцента. Антигенные свойства этого вируса, повидимому, отличны не только по структуре антигена, но и по его способности стимулировать антитела в организме человека в период реконвалесценции и в организме кролика в результате искусственной иммунизации. Однако, это объяснение не согласуется с тем, что кроличья сыворотка против вируса Чумнова нейтрализует вирус Смородинцева и вирус № 15, которые были идентифицированы с вирусом инфлюэнцы А. Этот факт поднимает вопрос о существовании штаммов вирусов, которые неспособны к нейтрализации специфическими сыворотками подобно неагглютинабельным штаммам в мире видимых бактерий. Весьма вероятно, что наш штамм Чумнова приобрел бы способность нейтрализоваться специфическими сыворотками после более или менее длительного пассирования на мишах подобно тому, как в некоторых случаях свежевыделенные не агглютинабельные расы микробов становятся агглютинабельными после ряда пересевов на искусственные питательные среды.

Таким образом, при изучении смывов отделяемого носоглотки от людей больных гриппом были выделены фильтрующиеся вирусы, патогенные для мышей.

Эти штаммы были изучены в отношении выделяемости в течение эпидемии, установлен их титр и сделана попытка идентифицировать их с вирусом инфлюэнцы типа А.

При этом выяснилось, что в наибольшем проценте случаев вирус удавалось выделить в самом начале вспышки. В течение всего периода обследования выделялись штаммы, как более высокого, так и более низкого титра. При попытке идентифицировать полученные штаммы вируса с типом инфлюэнцы А мы столкнулись с фактом выделения ~~многих~~ различных вирусов в течение одной и той же эпидемии. Так при наличии вирусов, легко вступающих в реакцию с противогриппозной сывороткой, мы выделяли вирусы не нейтрализующиеся сывороткой против инфлюэнцы типа А.

4. Свойства вирусов, выделенных от людей, больных насморком.

Во внеэпидемическое время осенью 1937, 1939 и 1940 гг. мы делали попытки выделить вирус от больных спорадическим гриппом и насморком. Как указывалось выше из 30 обследованных случаев было выделено 5 штаммов вируса на куриных эмбрионах.

Вирус, полученный из материала во внеэпидемическое время, мы будем называть „вирусом насморка“ в отличие от описанных выше вирусов гриппа, выделенных во время эпидемических вспышек.

Приводим краткое описание свойств этих вирусов в культурах на яйцах и на мышах, а также опыт серологической идентификации их с вирусом гриппа.

Истощение вируса насморка при пассировании на яйцах.

При пассировании на куриных эмбрионах смывов от больных, среди которых трудно было дифференцировать случаи насморка от спорадического гриппа, мы наблюдали истощение вируса в культурах.

В течение 10 месяцев мы пассировали 40-50 раз исходный материал с яйца на яйцо по вышеописанной методике. При определении активности яичных культур на мышах только около $1/3$ - $1/2$ всех культур давали картину смертельной пневмонии. Заражение мышей остальными культурами оставалось безуспешным. При этом интересно отметить, что вирулентные для мышей культуры не следовали одна за другой в серии пассажей, а сменялись авирулентными. Подводя итоги количества вирулентных и авирулентных генераций в процессе всего опыта удавалось подметить некоторую закономерность в их появлении. Именно, в первых пассажах вирулентные культуры встречались чаще, чем в последующих.

На табл. 6 приведены данные вирулентности яичных культур вируса насморка для мышей.

Представленные на табл. 6 данные свидетельствуют о том, что в первых 10 генерациях было 6,3 вирулентных культур; от II до 20 генерации - 4,8; от 21 до 30 - 3,3; от 31 до 40 - 2,5 и в 10 культурах от 40 до 50 генера-

ции удалось обнаружить только по одной вирулентной культуре каждого штамма. Более продолжительное культивирование вело к полному исчезновению вируса из пас-

Табл. 6.

Вирулентность яичных культур вирусов насморка для мышей.

Наз-вание штаммов.	Общее колич.: пассажей	Вирулентные: генерации: колич.:	Вирулентные: %	Распределение вирулентных генераций в процессе культивир.				
				1-10	11-20	21-30	31-40	41-50
В	54	16	30	6	5	3	1	1
Г	50	24	48	9	7	3	4	1
М	44	15	34	5	4	4	1	1
А	45	15	33	5	3	4	2	1
Б	44	19	43	6	5	4	4	0
Д	44	23	52	7	5	6	3	2
Среднее количество вирулентных пассажей				6,3	4,8	3,3	2,5	1

сажного материала, на что указывало также нормальное развитие эмбрионов в культурах последних генераций.

Адаптация яичного вируса к мышам. При попытке пассировать яичный вирус насморка на мышам оказалось, что необходимо было адаптировать его к этим животным. В первых пассажах наблюдалась инанарантная инфекция, затем появлялись незначительные очаги поражения легочной ткани и только после 3 - 4 последовательных пассажей обнаруживалась смертельная пневмония у мышей.

После этого следовал непрерывный ряд пассируемых заболеваний. Легкие больных мышей содержали вирус в высокой концентрации с титром около 10^{-5} - 10^{-6} .

Адаптированные к мышам вирусы свободно фильтровались через свечи Чамберлена L_3 и другие ультрафильтры. "Мышинные" вирусы легко культивировались на яйцах, регулярно вызывая гибель эмбрионов и тех мышей, на которых испытывалась активность этих "вторичных" яичных культур.

Идентификация вирусов насморка с вирусом гриппа.

С целью изучения серологического родства между вирусами насморка и гриппа были получены иммунные сыворотки на кроликах против каждого из вновь выделенных штаммов и против гриппозного вируса Смородинцева.

В опытах перекрестной нейтрализации этих вирусов неразведенными сыворотками не удалось обнаружить серологической специфичности отдельных штаммов. Вновь выделенные вирусы насморка так же, как и вирус гриппа Смородинцева, одинаково полно нейтрализовались указанными кроличьими и противогриппозной лошадиной сыворотками.

Таким образом вирусы насморка, выделенные на яйцах, оказались весьма сходными с вирусами гриппа. При попытке пассировать эти вирусы на мышях наблюдалось такое же постепенное развитие пневмотропности, как при адаптации вирусов гриппа от человека к мышам. В опытах перекрестной нейтрализации вирусы насморка и вирус гриппа Смородинцева обладали одинаковым свойством обезвреживаться как гомо-, так и гетерологичными сыворотками.

4. Обсуждение результатов по главе I.

В этой главе мы изложили опыт выделения вирусов от больных гриппом людей во время двух эпидемических вспышек. Пользуясь методом последовательных пассажей через мышей, вирус был выделен в 28% случаев в течение эпидемии 1941 года.

Из 18 выделенных штаммов 12 были идентифицированы с вирусом инфлюэнцы А в опыте нейтрализации противогриппозной лошадиной сывороткой. Остальные 6 штаммов не удавалось нейтрализовать ни лошадиной противогриппозной сывороткой, ни человеческими сыворотками реконвалесцентов, ни гомологичными кроличьими сыворотками. Однако, кроличьи сыворотки, приготовленные против этих штаммов, обезвреживали вирус Смородинцева, т.е. вирус инфлюэнцы типа А.

Отсутствие способности вновь выделенных штаммов вступать в реакцию нейтрализации с специфическими антисыворотками мы рассматриваем как явление, аналогичное с отсутствием агглютинабельности у некоторых свежее выделенных штаммов в мире бактерий.

Мы не видим оснований, чтобы назвать эти штаммы новыми типами вирусов инфлюэнцы. Рассматривая их как дефективные с отсутствующей способностью нейтрализации специфическими антисыворотками мы предполагаем, что они принадлежат к группе вирусов инфлюэнцы типа А.

При анализе выделяемости вируса в течение эпидемии 1941 года мы отметили, что подавляющее количество

штаммов было изолировано в самом начале вспышки /март/. Этот факт может быть истолкован с двух точек зрения. Во первых, можно предполагать, что в марте происходит увеличение вирулентности инфекционного начала в связи с повышенным предрасположением людей к простудным заболеваниям. Увеличение вирулентности в этом случае можно рассматривать как обогащение вируса в процессе последовательных пассажей через более чувствительный, чем в другие сезоны, организм человека. Во вторых, сезонность выделяемости вируса может быть объяснена повышенной чувствительностью мышей к заражению вирусом в этот период.

Может быть необходима совокупность этих моментов для успешного переноса вируса от больного человека на мышей в максимальном проценте случаев.

Падение выделяемости вируса в течение 4 месяцев исследования при достаточном экспериментальном материале приводит к необходимости углубленного изучения методики выделения вируса на мышах. Очевидно этот метод эффективен при соблюдении каких-то оптимальных условий опыта.

Если бы мы рассматривали случаи заболевания гриппом в мае и июне как лихорадочные катарры верхних дыхательных путей, мы перешли бы на точку зрения авторов, отрицающих роль вирусов в этиологии простудных заболеваний.

Смит, Эдрисе и Лейдлоу, Стюарт-Гаррис, Смороданцев и другие делали безуспешные попытки выделить вирус от больных спорадическим гриппом и насморком.

На основании положительного опыта выделения вируса, серологически идентичного с вирусом инфлюэнцы А, от нескольких больных насморком мы предполагаем, что грипп и насморк этиологически идентичны.

Принимая во внимание различную выделяемость вируса во время эпидемии гриппа, мы делаем предположение, что выделяемость вируса от больных насморком также обусловлена совпадением ряда благоприятных моментов. Видимому наш опыт выделения шести штаммов вируса от больных насморком протекал в оптимальных условиях развития вируса в природе и в культурах.

Таким образом в своих опытах выделения вируса мы столкнулись с рядом противоречий, которые до сих пор затрудняли изучение этиологии гриппа.

Очередной задачей по изучению этиологии гриппа является усовершенствование методов выделения и культивирования вируса.

Г л а в а П. КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ВИРУСА ГРИППА НА ЯЙЦАХ.

Культивирование на яйцах, как метод выделения вирусов от больных гриппом, оказалось менее эффективно, чем культивирование на мышах. Даже при успешном выделении вирусов от спорадических случаев удавалось культивировать их только в первых пассажах. При продолжительном пассировании исходного материала наблюдалось полное истощение вируса.

Только после адаптации к мышам вирусы приобретали способность культивироваться на яйцах в бесконечной серии пассажей. Таким образом вирусы, выделенные любым способом и адаптированные к мышам, служили исходным материалом для культивирования на яйцах.

В настоящей главе мы изложили опыты по изучению яичных культур гриппозного вируса. Как указывалось выше мы пользовались методом аллантоисных культур Гудспачора в модификации Шахмалиевой и Бауер.

1. Изучение условий размножения вируса в яйце.

Распределение вируса в тканях куриного эмбриона.

Согласно теоретическим предпосылкам авторов размножение вируса происходит на сосудистых оболочках эмбриона. В приведенной выше методике выделения вирусов на куриных эмбрионах мы указывали, что пользовались хорроио-аллантоисными оболочками, как культурами вируса.

В опытах сравнительного титрования при переносе адаптированного к мышам вируса на яйца было установлено, что титр яичных культур был всегда приблизительно в 100

раз ниже, чем титр исходных культур в мышинных легких. Обычно вирус в мышинных легких обнаруживался при разведении 10^{-6} - 10^{-7} ; в оболочках эмбриона редко удавалось обнаружить вирус в более высоких разведениях, чем 10^{-4} - 10^{-5} .

На основании собственных наблюдений мы пришли к заключению, что не только сосудистые оболочки, но и другие ткани развивающегося яйца содержали большое количество вируса.

На схематических рисунках А и Б изображены эмбрионы на V и VIII - X дни насиживания. С помощью этих рисунков мы попытались представить себе поведение вируса, инокулированного в яйца различных сроков инкубации.

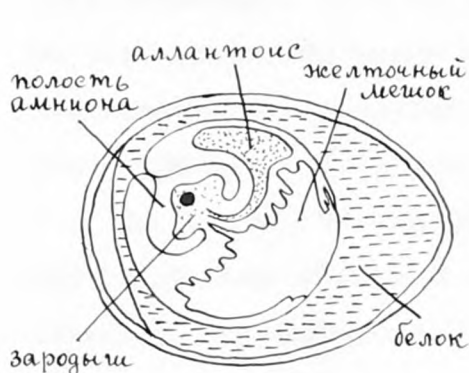


Рис. А

V день насиживания.



Рис. Б.

VIII-X дни насиживания.

Прежде всего остановимся на нормальном развитии хорин-аллантоиса, как предполагаемой субстанции для культивирования вируса.

Едва заметные следы развития оплодотворенного яйца появляются только на III-IV день инкубации в виде несколь-

ких переплетающихся веточек кровеносных сосудов. На V день насиживания, как изображено на рис. А, аллантоис представляет собой лишь небольшой вырост кишечного канала и только к X дню он разрастается в мощную оболочку, покрытую густой сетью кровеносных сосудов. Хорион-аллантоис на этой стадии развития со всех сторон окружает эмбриона, прилегая к стенке яичной скорлупы. По методу Гудпасчора вирус наносится на хорион-аллантоисную оболочку 10-12 дневного эмбриона через окошечко, выделенное в скорлупе яйца.

При культивировании принятым нами методом вирус вносится в желток яйца четырех дневной инкубации, т.е. в такой период развития, когда аллантоис еще не является оболочкой. Вряд ли удастся каждый раз нанести вирус на тот вырост кишечного канала, из которого впоследствии развивается хорион-аллантоисная оболочка, при слепом методе заражения яйца, предложенном Шахмалиевой и Бауер.

Мы думаем, что вирус, внесенный в желток, распределяется по всем тканям эмбриона благодаря энергичному обмену в развивающемся организме. Трудно определить, происходит ли размножение вируса во всех тканях одновременно или очагом размножения являются только некоторые из них.

Энергичное размножение вируса демонстрируется при вскрытии яйца после четырехдневного культивирования. Почти всегда наблюдается гибель эмбриона, на что указывает его размер, сероватый цвет, отсутствие кровообращения и аутолиз тканей. Ткани становятся однородными и

плавают в смеси, состоящей из крови, желтка, белка и околоплодной жидкости.

В целях определения концентрации вируса в различных тканях эмбриона мы поставили опыты раздельного титрования составных частей зараженного яйца.

Для титрования отдельных тканей эмбриона мы пользовались следующей методикой. Яйцо вскрывалось при соблюдении обычных правил стерильности и эмбрион со всеми оболочками и жидкостями извлекался в стерильную чашку Петри. Небольшие кусочки соответствующих тканей переносились на часовые стеклышки для взвешивания. Извешенный материал эмульгировался в 10-ти кратном объеме физиологического раствора поваренной соли при встряхивании в стерильной банке с бусами. Из полученной 10%-ной взвеси приготавливалась серия 10 - кратных последовательных разведений. Каждым разведением вируса заражались по две мыши с целью определения конечного титра по 50% гибели мышей с явлениями пневмонии. Отмечалось также разведение, при котором развивались явные поражения легочной ткани у мышей, убитых через 10 дней после введения вируса.

На табл. 7 мы привели опыты сравнительного титрования вируса в составных частях яйца. При этом мы исследовали отдельно оболочки, зародыш, белок и желток; кроме того смеси из зародыша с оболочками и смеси из жидких составных частей яйца. Последняя смесь состояла из желтка, белка и околоплодной жидкости.

В результате титрования оказалось, что титр взвеси, приготовленной из оболочек $/10^{-4.5}/$ выше, чем титр взвеси

из размельченного зародыша 10^{-4} . Меньше всего содержится вируса в белке $10^{-2,1}$. Титр желтка $10^{-4,2}$ находился между титрами оболочек и зародыша. При титровании смесей зародыша с оболочками и смесей из жидких составных частей яйца оказалось, что разница в титрах сгладилась.

Содержание вируса в первой смеси соответствовало разведению $10^{-4,3}$; титр вируса во второй смеси был равен $10^{-4,4}$. Повидимому титр этой смеси повысился за счет высокого содержания вируса в околоплодной жидкости.

Эти опыты привели нас к выводу, что культурой вируса являются не только эмбриональные сосудистые оболочки, но и все ткани развивающегося яйца. Следствием этого явилось изменение методики культивирования вируса на яйцах, которое предусматривало использование целого яйца как для получения культур, так и для опытов титрования.

Табл. 4

Сравнительное титрование составных частей яйца, зараженного вирусом.

Штамм вируса	Название составных частей яйца	Колич. опытов	Среднее содержание вируса
Вирус "Омородинцева"	Оболочки	6	$10^{-4,5}$
	Зародыш	6	$10^{-4,0}$
	Белок	6	$10^{-2,1}$
	Желток	6	$10^{-4,2}$
	Зародыш с оболочками	11	$10^{-4,3}$
	Белок, желток и проч. эмбр. жидкости . . .	11	$10^{-4,4}$

Изменение методики заключалось в том, что целое яйцо с культурой вируса выливалось в банку с бусами. При встряхивании получалась гомогенная масса, часть которой употреблялась для следующего пассажа на новое яйцо, а часть для титрования.

На табл. 8 приведены результаты титрования эмульсий целых яиц с указанием количества опытов в тех генерациях культур, которые вошли в опыты. На этой таблице представлены данные культивирования различных штаммов гриппозного вируса.

Табл. 8

Концентрация вируса в эмульсиях из целого яйца.

Название штамма	Количество опытов	№-№ пассажей	Средний титр
№ 4	16	I-15	10 ^{-4,2}
№ 5	20	I-16	10 ^{-4,5}
№ 6	20	I-14	10 ^{-4,7}
Смординцева	10	I-10	10 ^{-4,5}
- " -	10	II-23	10 ^{-4,6}
- " -	29	24-40	10 ^{-4,5}

Сопоставляя титры четырех штаммов, мы видим, что они почти не отличаются один от другого. По содержанию вируса этот материал не оказался менее ценным, чем материал, получавшийся нами ранее при пассировании инфицированных оболочек. Средний титр яичных культур оста-

вался на том же уровне, т.е. около 10^{-4} .

В опыте, представленном на табл. 8 приведены отдельно данные титрования яичных культур вируса Смородинцева в различные периоды культивирования. Он показал в 10 опытах титрования культур от I до X пассажа на яйцах, что средний титр их был равен $10^{-4/5}$; в следующих 10 опытах титрования культур от II до 23 пассажа и в 29 опытах от 24 до 40 пассажа средняя концентрация вируса оставалась прежней, $10^{-4/6}$ и $10^{-4/5}$.

Таким образом в процессе культивирования не наблюдалось ни истощения вируса, ни увеличения его концентрации.

Поведение вируса в неоплодотворенном яйце.

Ввиду того, что вирус успешно культивировался на яйцах самой ранней стадии насиживания, представлялось интересным культивировать его на неоплодотворенных яйцах. С этой целью было поставлено два опыта с вирусами Смородинцева и №-6. Схема этих опытов дана на рис. В и Г.

На схеме указан порядок культивирования обоих вирусов на оплодотворенных и неоплодотворенных яйцах в 4-5 генерациях. Вирус Смородинцева исследовался после того, как он был 20 раз пассирован на оплодотворенных яйцах; вирус № 6 исследовался после 30 пассажей на оплодотворенных яйцах. До переноса на яйца оба штамма длительно культивировались на мышах. Римскими цифрами на схеме показаны порядковые номера яичных генераций. Рядом со значком, указывающим на качество яйца /оплодотворено оно или нет/,

стоит цифра, обозначающая титр соответствующей яичной культуры. Степень в форме простой дроби имеет условное значение: числитель указывает на титр вируса по 50% смертности мышей, зараженных данной культурой, а знаменатель указывает на разведение, при котором еще наблюдались очаги поражения легочной ткани у мышей, убитых через 10 дней после интраназального заражения испытываемой культурой.

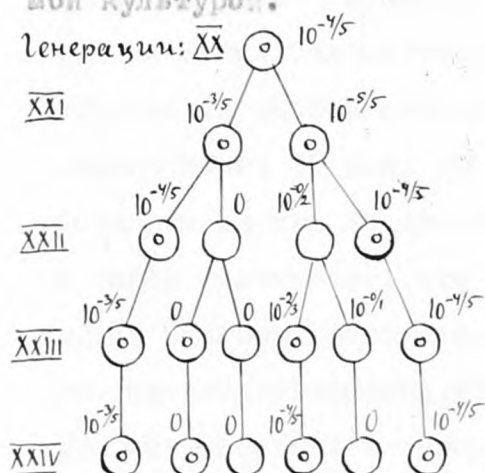


Рис. В.

Вирус Смородинцева

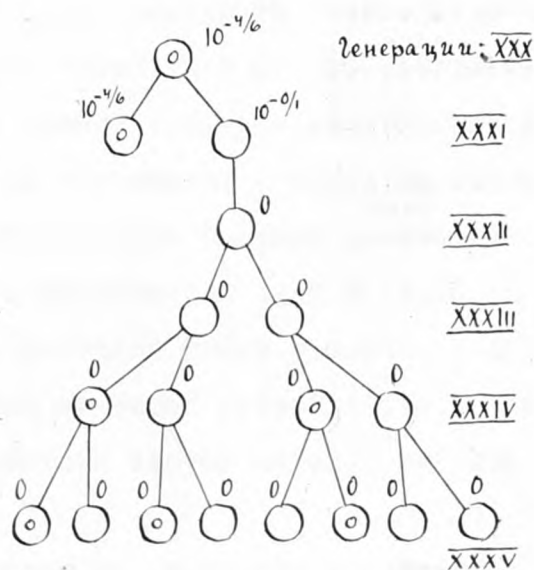


Рис. Г.

Вирус № 6.

Обозначения:

- - оплодотворенное яйцо.
- - неоплодотворенное яйцо.

В результате культивирования на неоплодотворенных яйцах наблюдалась гибель вируса.

Как видно на рис. В вирус Смородинцева при переносе на неоплодотворенные яйца после 21 пассажа на куриных эмбрионах дал резкое понижение титра. Из 4 яиц

XXII генерации два яйца содержали эмбрионов, а два яйца не были оплодотворены. Титр культуры на оплодотворенных яйцах остался обычным. Вирус содержался в достаточном количестве, чтобы убить 50% зараженных мышей в разведении 10^{-4} ; по очагам пневмонии, наблюдавшимся у мышей, убитых через 10 дней после заражения, можно было определить, что вирус еще содержался в культурах, разведенных $1:10^5$ и $1:10^6$. Титр культур на неоплодотворенных яйцах был настолько низок, что его не удавалось определить по 50% гибели мышей, т.к. все мыши остались живыми через 10 дней после заражения. В одном из неоплодотворенных яиц на правой половине рисунка В ^{вирус} содержался в таком количестве, что в разведениях $1:10$ и $1:100$ вызывал очаговые поражения легочной ткани у мышей. В другом неоплодотворенном яйце на левой половине рис. В не удалось определить присутствия вируса методом титрования на мышах.

В следующей XXIII генерации мы наблюдали понижение концентрации вируса при пассировании на неоплодотворенном яйце культуры, которая в XXII генерации содержала вирус в разведении 10^{-2} . В этой субкультуре концентрация вируса упала до $10^{-0/1}$, т.е. все зараженные мыши остались живыми и лишь у убитых мышей, зараженных яичной культурой, разведенной $1:10$, наблюдались очаговые поражения легочной ткани. Дальнейшее культивирование этой ветви на неоплодотворенных яйцах привело к потере вируса. На это указывал отрицательный результат титрования вируса, переносенного в третий раз на не-

оплодотворенное яйцо.

Другой результат был получен при переносе на эмбриона вируса с титром $10^{-0\frac{1}{2}}$, который всего один раз был пассирован на неоплодотворенном яйце. При последовательном культивировании этой ветви на двух оплодотворенных яйцах удалось восстановить вирус в культуре до первоначальной концентрации. В XXIV личной генерации эта культура вируса по своему титру была равноценна контрольной культуре на правой половине рис. В, которая непрерывно пассировалась на оплодотворенных яйцах. Именно, в разведении $1:10^4$ наблюдалась 50%-ая гибель зараженных мышей, а в разведении $1:10^5$ можно было обнаружить очаги пневмонии у мышей, убитых через 10 дней после заражения.

Левая ветвь схематического изображения этого опыта оказалась менее активной. Титр обычной культуры на оплодотворенных яйцах XXI ^{ГЕНЕРАЦИИ} оказался ниже среднего, именно, был равен $10^{-3\frac{1}{5}}$. В соответствии с меньшей активностью левой ветви рисунка В культивирование на неоплодотворенных яйцах сразу привело к потере вируса. Вирус не удалось восстановить в культурах на куриных эмбрионах после однократного пассажа на неоплодотворенном яйце. Левая контрольная культура содержала вирус с титром $10^{-3\frac{1}{5}}$ в XXIV генерации; соответствующие культуры, пассированные один раз и три раза на неоплодотворенных яйцах, оказались не активными.

Результат этого опыта показал, что в некоторых случаях наблюдалось переживание вируса в неоплодотворенном яйце с сохранением способности к полному восстановлению

активности при переносе на эмбриона. Вирус сохранялся только после однократного пассажа в неоплодотворенном яйце. В других случаях вирус погибал в неоплодотворенном яйце на первом пассаже.

Мы привели еще один опыт культивирования вируса гриппа на неоплодотворенных яйцах. Как указано на рис. "Г" штамм вируса № 6 был дважды пассирован на неоплодотворенных яйцах. После этого была сделана попытка к его восстановлению путем переноса на эмбриона. Этот опыт дал отрицательный результат.

Таким образом, данные культивирования вирусов Смородинцева и № 6 на неоплодотворенных яйцах привели к выводу, что вирус не размножается в этих условиях; в некоторых случаях он переживает, сохраняя способность к восстановлению активности при переносе на эмбриона.

Культивирование вируса на эмбрионах различного
возраста.

Следующим этапом работы было выяснение оптимального возраста эмбриона для получения яичных культур высокого титра.

С этой целью отбирались яйца от 3-х до 14 дней насиживания. Серии таких яиц инокулировались яичным вирусом обычным методом. Для сравнения были взяты 4 различных штамма вирусов: штамм Смородинцева, № 4, № 5 и № 6. Зараженные этими штаммами яйца с различными сроками предварительной инкубации культивировались в течение 4-х дней, затем вскрывались и титровались на мышах.

На табл. 9 приведен опыт сравнительного титрования культур вируса на эмбрионах различного возраста.

Табл. 9

Культивирование вируса гриппа на эмбрионах различного возраста.

Титры культур. штаммы вируса	В о з р а с т эмбрионов.					
	3 сут.	4сут.	5-6сут	7-8сут	9-12с.	13-14с.
Сморозинцева	10^{-4}	10^{-4}	$10^{-4,2}$	$10^{-4,3}$	10^{-4}	10^{-2}
№ 4.	$10^{-3,5}$	10^{-4}	$10^{-4,3}$	10^{-4}	10^{-4}	10^{-2}
№ 5	$10^{-4,1}$	$10^{-4,5}$	10^{-5}	10^{-5}	$10^{-4,2}$	10^{-2}
№ 6	10^{-5}	10^{-5}	$10^{-5,2}$	$10^{-4,4}$	$10^{-4,6}$	10^{-2}
В среднем	$10^{-4,7}$	$10^{-4,4}$	$10^{-4,7}$	$10^{-4,4}$	$10^{-4,2}$	10^{-2}

Средние титры культур на эмбрионах различного возраста показали, что оптимальное размножение вируса соответствовало культурам на 4-8 суточных эмбрионах. Средний титр в культурах трех суточных эмбрионов был равен $10^{-4,1}$, 4-х суточных эмбрионов - $10^{-4,4}$, культуры на 5-6 суточных эмбрионах содержали вирус с титром $10^{-4,7}$, на 7-8 суточных эмбрионах вирус развивался в количестве, которое измерялось разведением культуры $10^{-4,4}$; начиная с 9-12 суток и выше возраст эмбрионов становился менее благоприятным для культивирования вируса. Значительное понижение титра культур наблюдалось на эмбрионах 13-14 суточной инкубации. Эти культуры были активны лишь в разведении 1:100.

Таким образом, 5-6 суточные эмбрионы оказались наиболее благоприятной средой для культивирования вируса.

Мы не испытывали эмбрионов 1-2 суточного насиживания из-за того, что в этом возрасте невозможно отличить методом просвечивания оплодотворенные яйца от неоплодотворенных.

Для получения вируса в культурах, где имело значение количество материала от каждого яйца, было выгоднее пользоваться более молодыми эмбрионами. При разбивании бурами 3-5 суточных эмбрионов получалась гомогенная масса, которая легко эмульгировалась в физиологическом растворе. При приготовлении эмульсии из 7-12 суточных эмбрионов получалось большое количество отходов в виде хрящей, косточек и даже перьев. Поэтому при одинаковом содержании вируса в культурах на 3-х суточных и 9-12 ^{суточных} эмбрионах мы пользовались более молодыми эмбрионами, чтобы получить наибольший выход культуры.

Влияние сроков инкубации культур на активность вируса.

Помимо изучения оптимальных сроков предварительной инкубации эмбрионов были изучены сроки инкубации культур. Для этой цели были заражены вирусами № 5 и № 6 яйца 4-х суточной предварительной инкубации. По истечении различных сроков культивирования яйца вскрывались и производилось титрование культур. На табл. 10 приведены данные сравнительного титрования культур с различными сроками инкубации, после заражения 4-х суточных эмбрионов.

В этом опыте производилось одновременное заражение серии яиц. Все зараженные яйца укладывались в инкубатор. Ежедневно производилось вскрытие и титрование 2-3 яиц каждого штамма. Титр определялся в смеси, состоящей из 2-3

Табл.10.

Концентрация вируса в зависимости от сроков культивирования.

Титры культур Наз-вание штаммов.	Сроки культивирования						
	1 день	2 дня	3 дня	4 дня	5 дней	6 дней	10 дней
Вирус № 5 исходный титр 10^{-4}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	0
Вирус № 5 исходный титр 10^{-3}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-3}	10^{-2}	0

яиц данного штамма. Этим методом удалось установить, что размножение вируса происходило уже через 24 часа после заражения эмбрионов. Нарастание титра наблюдалось до 4-го дня инкубации культуры. Затем начиналось падение титра, которое становилось явным после 6-ти дней инкубации. Вирус полностью инактивировался в течение 10 дней при температуре 37°C.

На примере вируса № 6 с исходным титром 10^{-4} мы наблюдали, что вирус в однодневной культуре содержался в количестве соответствующем титру 10^{-3} ; титр вируса в двух- и трех-дневных культурах соответствовал разведению вируса 10^{-4} ; в четырех-дневной культуре титр вируса был наивысший, именно 10^{-5} . Таким образом, он увеличился в 10 раз против исходного.

После 5-ти дневной инкубации наблюдалось снижение титра до 10^{-4} , а культивирование в течение 6 дней приводило к явному истощению культуры, титр ее был равен 10^{-3} . В 10-ти дневно культуре не удавалось обнаружить живого вируса.

Титрование вируса № 5 дало повторение того же характера кривой: мы наблюдали нарастание титра до 4-го дня и явное понижение на 6-й день. Исходная культура вируса № 5 была слабая, ее титр был равен 10^{-3} . На этой модели особенно ясно демонстрировалось нарастание и падение титра с 1 до X-го дня инкубирования.

Таким образом, выбранные нами сроки инкубации яичных культур вируса гриппа (3-4 дня) вполне соответствовали оптимальным срокам культивирования.

2. Идентификация яичного вируса с вирусом, адаптированным к мышам.

Для идентификации вируса в яичных культурах с вирусом

ны
в мыших легких ставились многочисленные опыты нейтрализации этих вирусов противогриппозной лошадиной сывороткой. Учитывая то обстоятельство, что яичный вирус в 100 раз слабее мышинного, мы делали соответствующие разведения, чтобы количество минимальных смертельных доз во взвесах обоих вирусов было одинаковым. Обычно для опыта нейтрализации мы брали вирус в количестве 1000ДМ.

В качестве примера мы привели опыт нейтрализации лошадиной сывороткой яичного и мышинного вирусов штамма Смородинцева (табл.11).

Табл.11.*

Идентификация яичного и мышинного вирусов в опыте нейтрализации иммунной сывороткой.

В и р у с		Сыворотка.		Результат заражения мышей смесями вируса с сывороткой		
Название	разведение	Название	разведен.			
Яичная культура вируса Смородинцева. Титр 10^{-5}	1:100 = 1000ДМ	Имм.сыв. № 21 сер.2	1:200	0	0	0
	"	норм.сыв.	неразв.	+++	+++	+++
	"	"	1:200	+++	+++	+++
Мышинная культура вируса Смородинцева. Титр 10^{-7}	1:10000 = 1000ДМ	Имм.сыв. № 21 сер.П	1:200	0	0	0
	"	норм.сыв.	неразв.	+++	+++	+++
	"	"	1:200	+++	+++	+++

Обозначения: 0 Мышь жива через 10 дней после интраназального заражения.

+++ Мышь пала в течение 10 дней с явлениями сплошной гепатизации легких.

На табл.11 показано, что оба вируса в количестве 1000ДЛМ полностью обезвреживались при смешивании с иммунной лошадиной сывороткой разведенной 1:200. Каждой смесью были заражены по 3 мыши. После 10-ти дневного наблюдения все мыши остались живы. В качестве контроля те же количества обоих вирусов были соединены с нормальной лошадиной сывороткой, неразведенной и в разведении 1:200. Все контрольные мыши пали до истечения 10-ти дней с явлениями сплошной генатизации легких. Этот пример нейтрализации яичного вируса противогриппозной иммунной сывороткой показал, что яичная культура вируса идентична с мышинной культурой того же штамма.

3. Сохранение жизнеспособности яичных культур вируса.

Чтобы закончить характеристику яичных культур вируса гриппа, мы приводим некоторые данные об устойчивости культур при различных условиях хранения их.

Устойчивость к замораживанию. Мы испытали устойчивость яичных и мыш^{ны}их культур вируса к замораживанию жидким воздухом при темп^{ературе} -150°C . Культуры определенного титра находились в замороженном состоянии в течение трех часов, после чего они были вновь протитрованы на мышах.

На табл.12 мы привели данные сравнительного титрования до и после замораживания.

Табл.12.

Влияние замораживания на активность культур гриппозного вируса.

Название штаммов.	Титры культур	
	До замораживания.	После замораживания.
Яичный вирус Смородинцева	10^{-4}	10^{-4}
Яичный вирус № 6.	10^{-4}	10^{-4}
Мышиный вирус Смородинцева	10^{-7}	10^{-7}

Как видно на табл.12 титры культур двух штаммов яичного вируса и одного штамма мышинного вируса остались на той же высоте, на которой они находились до замораживания. Яичные вирусы были активны в разведении $1:10^4$, мышинный вирус Смородинцева сохранил свою активность в разведении $1:10^7$.

Таким образом, предельное, хотя и кратковременное замораживание не разрушило вирус независимо от того, к какому виду ткани он был адаптирован.

Консервация вируса в культурах. В работе с яичными культурами необходимо располагать способом сохранения вируса от любого яичного пассажа ввиду сезонных перебоев с доставкой оплодотворенных яиц.

Мы попытались найти способ консервации вируса в целях поддержания яичных культур в пассажах с длительными интервалами. Наши культуры сохранялись в рефрижераторе при постоянной температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Представлялось интересным сравнить различные способы хранения яичных культур при этой температуре. Для этого яйца, зараженные вирусом, после 4-х дней инкубации при темп. 37°C перемещались в рефрижератор; кроме того в рефрижераторе сохранялись нативные эмульсии яичных культур в пробирках и ампулах и 20%-ные эмульсии яичных культур, разведенные глицерином.

Наиболее удобным и эффективным способом хранения яичного вируса оказался простой способ перенесения в рефрижератор зараженных яиц после 4-х суточного культивирования. В случае необходимости эти яйца вскрывались обычным способом и употреблялись для дальнейшего культивирования или титрования.

Мы испытали активность яичных культур после хранения в рефрижераторе в течение 6-ти месяцев. На табл. 13 представлены титры яичных культур в зависимости от сроков хранения.

Титр исходных культур этого вируса был равен 10^{4-5} по 50% смертности мышей в течение 10-ти дней после заражения и 10^{6-7} по очагам пневмонии, наблюдавшейся у мышей, убитых через 10 дней после заражения. Титры по смертности и по очагам поражения легочной ткани обозначены в виде дроби, как это было указано в объяснении к рис. В и Г.

Табл. 13.

Активность яичных культур в зависимости от длительности и способа хранения.

Способ хранения \ Т и т р	С р о к и хранения.			
	20 дней	30 дней	3 мес.	6 мес.
Яйцо при темп. рефрижератора (+4°C)	10 ^{-4/6}	10 ^{-4/6}	10 ^{-2/5}	10 ^{-1/2}
Нативная эмульсия яичной культуры в ампулах и пробирках при темп. рефрижератора (+4°C)	10 ^{-4/6}	10 ^{-4/5}	10 ^{-2/3}	10 ^{-0/1}
20% глицериновая эмульсия яичной культуры в ампулах при темп. рефрижератор. (+4°C)	10 ^{-2/2}	10 ^{-0/1}	0	0
Контроль; яйцо при комнатной темп. (+20°C)	0	0	0	0

х) Нативной эмульсией в этом опыте мы называли содержимое вскрытого яйца, превращенного в гомогенную массу путем встряхивания в банке с бусами.

Неразведенные яичные культуры вируса гриппа почти в одинаковой степени сохранили свою активность в течение 3-х месяцев при темп. +4°C. При этом культура оставалась в целом невскрытом яйце или сохранялась в виде нативной эмульсии после вскрытия яйца в неразведенном состоянии в ампулах или пробирках. Титр этих культур почти не отличался от исходного при хранении в рефрижераторе в течение 30 дней. В целом яйце титр оставался на прежней

высоте $10^{-4/6}$; в нативных эмульсиях он изменился очень незначительно $10^{-4/5}$. После 3-х месячного хранения титр заметно понижился, как в яйце ($10^{-2/5}$), так и в эмульсиях ($10^{-2/3}$). По истечении 6-ти месяцев вирус еще сохранил свою жизнеспособность, хотя его титр в яйце упал до $10^{-1/2}$, а титр в эмульсиях упал до $10^{-9/1}$.

Менее успешно удавалось сохранить вирус в форме 20 % глицериновой эмульсии. В течение одного месяца глицериновая эмульсия вируса настолько утратила свою активность, что не убивала зараженных мышей и только по наличию очагов пневмонии у мышей, убитых через 10 дней после заражения, можно было судить о существовании живого вируса в этом материале. Через три месяца не удавалось обнаружить вирус в 20 %-ной глицериновой эмульсии.

В качестве контроля мы привели пример хранения вируса в не вскрытом яйце при комнатной темп., т.е. при 20°C . В этих условиях вирус инактивировался в течение 20 дней.

Наконец, мы испытали сохранение жизнеспособности вируса, высушенного в вакууме при одновременном замораживании. Культуры 3-х штаммов яичного вируса и одного штамма вируса в мышинных легких были подвергнуты высушиванию в аппарате Флосдорфа и Мэдда. Мы взяли яичные культуры вирусов Смородинцева, № 5 и № 6 и мышинные культуры вируса Смородинцева. Исходный титр смеси яичных культур был равен 10^{-4} , мышинный вирус был активен в разведении 10^{-6} .

Испытание активности высушенных вирусов было произведено через 1, 2 и 2,5 месяца. На табл.14 мы привели обобщенные результаты нескольких опытов титрования этих вирусов.

Табл.14.

Активность высушенных культур в зависимости от сроков хранения.

Название штаммов.	Вид культур.	Т и т р			
		В исходн. культур.		В высушен. культурах.	
			Через 1 мес.	через 2 мес.	через 2,5 месяца.
Смесь культур № 5, № 6 и Смородинцева	Яичные	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-3}
Смородинцева.	Мышинные	10^{-6}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-3}

Высушенные вирусы хранились при темп. $+4^{\circ}\text{C}$ в запаянных ампулах из стекла "пирекс".

Как видно на табл.14 яичный вирус полнее сохранил свою активность, чем мышинный. Высушенные яичные культуры вируса после хранения в течение одного месяца сохранили свой исходный титр (10^{-4}). Высушенные культуры мышиного вируса в течение одного месяца ослабели в 100 раз. Титр их с 10^{-6} в исходном материале упал до 10^{-4} в высушенном порошке из инфицированных мышиных легких. Через 2,5 мес. концентрация вируса в высушенной яичной культуре уменьшилась в 10 раз против исходной (титр упал от 10^{-4} до 10^{-3}); концентрация вируса в высушенной мышиной культуре за тот же срок понизилась в 1000 раз, титр ее упал от 10^{-6} до 10^{-3} .

Таким образом яичные и мышинные культуры стали одинаково активны в предельном разведении $1 : 10^3$. Учитывая первоначальное 100-кратное превосходство мышинных культур по сравнению с яичными по количеству вируса необходимо отметить благоприятное влияние яичной среды на вирус при его консервации методом высушивания.

4. Обсуждение результатов по главе II.

Выбранный нами метод культивирования вируса на куриных эмбрионах имеет свои преимущества перед классическим методом Гудпасчюра. Вследствие упрощения техники заражения эмбриона сокращается ряд манипуляций, которые могут оказывать неблагоприятное влияние на нормальное развитие эмбриона.

Основным преимуществом является то, что при этом методе целое яйцо является культурой вируса. Принимая во внимание, что куриное яйцо без скорлупы весит 30-40 грамм мы считаем, что располагаем методом массового приготовления яичных культур вируса гриппа.

При культивировании вируса классическим методом Гудпасчюра в качестве культуры вируса использовалась только хорион-аллантоисная оболочка эмбриона. Вес оболочки 12-14 дневного эмбриона не превышал 2-3 грамм. Таким образом, нам удалось повысить выход культуры в 10-20 раз против того количества, которое обеспечивалось при условии точного выполнения методики Гудпасчюра. Кроме того при использовании целого яйца в культуре сохранялись околоплодные жидкости, которые согласно данным Бернета и Нитг, Вильсон и Кроули особенно богаты вирусом. Наши исследования косвен-

но подтвердили эти данные. Сравнительное титрование жидких составных частей зараженного яйца без околоплодных жидкостей давало меньшие цифры, чем титрование тех же частей в смеси со всеми эмбриональными жидкостями. Титр эмульсии приготовленной из целого яйца, оказался равным титру оболочек, пови-
димому, за счет высокого содержания вируса в аллантоисной и амниотической жидкостях.

Попытка культивировать вирус в неоплодотворенных яйцах окончилась неудачей. Отсюда мы делаем вывод, что значительное содержание вируса в желтке оплодотворенного яйца объяснялось его диффузией из тканей эмбриона, в которых и происходило размножение вируса.

Присутствие эмбриона в самой начальной стадии развития стимулировало размножение вируса в яйце. Мы видели, что вирус обнаруживался в значительной концентрации при пассировании на 3-х суточных эмбрионах. В этот период эмбрион представляет собой комочек тканей, который составляет не более 1/100 веса целого яйца. Далее нами было установлено оптимальное развитие вируса на эмбрионах определенного возраста. Яйца после 12-14 дней насиживания оказались менее подходящей средой для культивирования вируса, чем более молодые. Вирус самого высокого титра был получен на эмбрионах 5-6 суточной инкубации. Следовательно особенно чувствительны к вирусу молодые эмбрионы.

Длительная инкубация культур при 37°C приводила к инактивации вируса в течение 10 дней.

Мы наблюдали гибель эмбрионов при успешном размножении

вируса. Продукты аутолиза мертвых эмбриональных тканей в свою очередь разрушали вирус.

Дочес с сотрудниками при культивировании вирусов гриппа и насморка в присутствии переживающих тканей куриного эмбриона наблюдали гибель культур и изучали методы консервации вируса. Авторы пришли к выводу, что вирус хорошо сохранялся в высушенном и замороженном состоянии с предварительным добавлением смолы акации. Этот метод предотвращал аутолиз тканей и устранял причину гибели вируса.

Наш метод культивирования вируса в целом яйце также требовал устранения губительного действия разлагающихся тканей на вирус. По видимому, хранение яичных культур при темп. $+4^{\circ}\text{C}$ способствовало консервации эмбриональных тканей. Столь же эффективным оказалось высушивание яичных культур в вакууме с одновременным замораживанием. Естественно, что наши культуры оказались более устойчивыми, чем культуры Дочеса, поскольку при культивировании вируса в живом яйце эмбриональные ткани травмировались значительно меньше, чем при культивировании на тканевых средах. С устранением условий, благоприятных для распада тканей, устранялась основная причина губительного действия среды на вирус.

Таким образом, при культивировании вируса гриппа в оплодотворенном яйце нам удалось выработать метод массового выхода культуры. Яичная культура вируса гриппа длительно сохраняла свою активность при следующих условиях: в не вскрытом яйце при темп. $+4^{\circ}\text{C}$ и после высушивания по методу Флосдорфа и Мэдда.

Г л а в а III. АКТИВНАЯ ИМУНИЗАЦИЯ ПРОТИВ ГРИППА.

Ежегодные вспышки гриппа, влекущие за собой опасность возникновения больших эпидемий и пандемий, ставят перед исследователями задачу выработать мероприятия по борьбе с этой инфекцией.

В литературе приведены многочисленные опыты активной иммунизации людей и животных. С каждым годом увеличивается количество всевозможных вакцин, предлагаемых авторами в надежде найти эффективный способ активной иммунизации людей.

В качестве вакцин были испытаны живые и убитые культуры вируса на тканях мышей, хорьков и куриных эмбрионов. Авторы изощрялись в изобретении различных способов приготовления вакцин и методов их введения. Вакцины против гриппа готовились не только из вирусов человеческой и свиной инфлюэнцы, но даже из вируса собачьей чумы. Такое разнообразие в поисках методов эффективной вакцинации указывает на неудовлетворительное состояние этого вопроса.

Мы поставили перед собой задачу изучить эффективность интраназальной вакцинации живыми яичными культурами гриппозного вируса.

В пользу интраназального применения живого вируса мы приводим следующие литературные данные.

Бернет в 1937 г. иммунизировал интраназально хорьков и мышей живым яичным вирусом гриппа против последующего заражения вирусом, адаптированным к мышам. Тот же

вирус, введенный интраназально трем волонтерам, стимулировал под"ем нейтрализующих антител у вакцинированных.

Итон и Бек (1940 г.) в опыте на мышах наблюдали появление иммунитета после интраназального введения гетерологического штамма вируса. Авторы называли гетерологическими штаммы, адаптированные к другому виду животных или культуре тканей. Например, если производилась иммунизация мышей, то автор считал гетерологической вакцину, приготовленную из легких хорьков, а гомологической вакцину, приготовленную из мышинных легких.

Эндрюс и Смит (1939 г.) указывали на то, что такие гетерологические вакцины эффективны только в живом состоянии.

Нас особенно интересовала эффективность местного воздействия живой вакцины на чувствительные ткани дыхательного тракта при интраназальном методе введения.

Сначала мы изучили эффективность интраназальной вакцинации на мышах, а потом приняли участие в большом эпидемиологическом опыте активной иммунизации людей.

1. Активная иммунизация мышей вирусом гриппа.

В опыте на мышах мы изучали эффективность интраназального метода вакцинации по сравнению с внутрибрюшинным. Иммунизация мышей производилась живыми мышинными и яичными культурами вируса. В качестве вакцины мы испытывали не только нативные, но и высушенные культуры вируса.

Мыши получали по две дозы вируса с 5-6 дневными интервалами. Каждым видом вакцины было обработано по 100

мышей. Через 15 дней после введения последней дозы производилось испытание иммунитета посредством интраназального заражения 100 ДЛМ мышинного и яичного вирусов. Для этого каждая партия мышей, вакцинированных определенным методом, разделялась на две равные группы. Одна группа испытывалась против мышинного вируса, другая против яичного.

На табл. 15 представлены результаты сравнительной вакцинации мышей живыми культурами мышинного и яичного вирусов.

Табл. 15.

Эффективность вакцин, приготовленных из мышинного и яичного вирусов.

Название вакцин	Способ вакцинации	Общее кол-во ДЛМ	Разведение культ. вируса	Эффективность вакцинации.	
				Против 100 ДЛМ мышин. вирус.	Против 100 ДЛМ яичног. вируса.
Нативная мышин.	ви/бр.	2000000	10^{-3}	96%	82%
" "	и/наз.	0,02	10^{-10}	0	0
" яичн.	ви/бр.	20000	10^{-1}	70%	80%
" "	и/наз.	0,02	10^{-7}	0	0
Высушенная мыш.	ви/бр.	200	10^{-2}	100%	10%
" "	и/наз.	0,02	10^{-6}	0	0
" яичная	ви/бр.	200	10^{-2}	10%	100%
" "	и/наз.	0,02	10^{-6}	0	0

В предварительном опыте была установлена активность нативных и высушенных культур мышинного и яичного вирусов.

Имея ввиду интраназальное применение живого вируса в качестве вакцины мы изменили методику титрования соответствующих культур на мышах. В этом опыте мы называли ми-

нимальной смертельной дозой вируса такое количество его, которое явилось причиной гибели одной из 10-ти зараженных мышей. Наблюдение над зараженными мышами продолжалось 15 дней.

Следуя этой методике за титр мышинного нативного вируса мы приняли разведение $1:10^8$; титр яичного нативного вируса был определен $1:10^5$; высушенные культуры мышинного и яичного вирусов были активны в разведении $1:10^4$.

В результате увеличения срока наблюдения с учетом 10%, а не 50% гибели мышей получилось кажущееся повышение активности мышинного и яичного нативных вирусов.

Пользуясь данными этих титрований мы делали соответствующие разведения культур для внутрибрюшинной и интраназальной вакцинации.

Как известно при внутрибрюшинном введении мыши переносят сотни смертельных доз вируса. По данным нашего опыта мыши, получившие, внутрибрюшинно в два приема 200.000 ДЛМ живого мышинного вируса остались здоровыми.

Для интраназального введения живого вируса с целью вакцинации мы делали высокие разведения живых культур. Разведения, принятые в данном опыте, составляли сотые доли ДЛМ. При введении десятых долей ДЛМ наблюдались случаи позднего развития смертельной пневмонии. Во избежание отхода некоторой части подопытных мышей в процессе вакцинации мы разводили вирус до 0,01 ДЛМ. За время 2-х кратной вакцинации каждая мышь получила интраназально по 0,02 ДЛМ живого вируса.

При анализе табл. 15, на которой приведены результаты этой вакцинации легко сделать вывод об эффективности внутрибрюшинного метода введения вакцин. Результаты внутрибрюшинной вакцинации необходимо рассматривать в связи с количеством полученного при этом вируса. Эффективность вакцинации находилась в прямой зависимости от вакцинирующей дозы вируса. Так 200.000 ДЛМ мышинного вируса почти в одинаковой степени иммунизировала против 100 ДЛМ мышинного и яичного вирусов. При введении 20.000 ДЛМ яичного вируса также не наблюдалось большой разницы в образовании иммунитета против испытательных доз мышинного и яичного вирусов.

Значение гомо- и гетерологичности вирусов в отношении их адаптации к мышам или куриным эмбрионам выявилось в опыте с высушенными вакцинами. Перекрестная иммунизация дозами в 200 ДЛМ высушенных культур мышинного и яичного вирусов дала четкую картину эффективности вакцинации против ^оодних и тех же штаммов. При 10% выживаемости мышей, вакцинированных гетерологичными вирусами, наблюдалась 100% выживаемость мышей, получивших те же дозы гомологичных вирусов.

Таким образом, эффективность перекрестной иммунизации находилась в зависимости от применения массивных доз вируса с целью вакцинации.

При сопоставлении результатов внутрибрюшинной вакцинации нативными и высушенными культурами вирусов наблюдалась преимущественная эффективность высушенных вакцин. Так при вакцинации нативным мышинным вирусом в разведении 1:10 мыши получили вирус в кол-^{ичест}ве 200.000 ДЛМ. После про-

верки иммунитета против 100 ДЛМ одноименного мышинного вируса выжило 70 % вакцинированных мышей.

При вакцинации сухим мышинным вирусом в разведении 10^{-2} мыши получили только 200 ДЛМ живого вируса. Однако, такая вакцина оказалась более эффективной, так как при проверке иммунитета выжило 100% опытных мышей.

Такое же соотношение наблюдалось при вакцинации нативной и сухой культурами личного вируса. При введении 20.000 ДЛМ нативного личного вируса в разведении 1:10 последовала 80% выживаемость мышей, зараженных 100 ДЛМ личного вируса. При введении 200 ДЛМ сухого личного вируса и проверке иммунитета 100 ДЛМ одноименного, нативного вируса выжило 100 % опытных мышей.

Можно предполагать, что более высокая эффективность сухих вакцин объяснялась наличием в них большой дозы антигена. Мы думаем, что в сухой культуре кроме антигена в виде живого вируса, количество которого определялось титрованием, содержалось значительное количество антигена в форме инактивированного вируса. Повидимому, при высушивании методом Флосдорфа и Мэдда сохраняются антигенные свойства вируса, утратившего в значительной степени свою патогенность для мышей.

Опыт интраназальной вакцинации мышей живыми культурами вируса дал отрицательный результат. Интраназальная вакцинация оказалась неэффективной, как в отношении гомологичных вирусов, так и в отношении гетерологичных. Выживаемость опытных мышей, обработанных интраназально различными видами вакцин, во всех случаях была равна нулю. При сопоставлении результатов такого рода вакцинации с дозами вируса, введенными с

профилактической целью, становится очевидной причина неудачи. Во всех случаях интраназального введения доза вируса при двукратной вакцинации составляла 0,02 ДЛМ.

Расчет на эффективность местного воздействия живого антигена на чувствительные ткани дыхательного тракта мышей оказался неправильным. Максимальные дозы вируса, переносимые мышами, оказались слишком ничтожны для создания активного иммунитета. Новидимому, механизм местного иммунитета основан на тех же законах прямой зависимости между профилактической и испытательной дозами вируса, на которых основан механизм общего иммунитета.

Таким образом, интраназальная вакцинация живым вирусом дала отрицательный результат на чувствительной модели. Увеличение дозы живого вируса при введении с профилактической целью влекло за собой развитие смертельной инфекции. Те дозы, которые были безвредны при интраназальном введении оказались слишком малы для целой иммунизации.

3. Опыт вакцинации людей яичными культурами гриппозного вируса.

В феврале 1940 года нами совместно с Хаит С.Л., Котиной Л.И. и Удельман Б.Е. был предпринят опыт активной иммунизации людей против гриппа. Мы решили испытать на людях интраназальный метод вакцинации живым яичным вирусом гриппа. Этот метод был выбран нами по следующим соображениям. 1) Личная

культура бактериологически стерильна, что особенно важно при работе с живым вирусом. 2) Человек мало чувствителен к вирусу, адаптированному к куриному эмбриону. Пользуясь этим можно было увеличить дозу вводимого вируса. 3) Интраназальный способ введения вакцины очень удобен благодаря простоте его применения. 4) Ввиду того, что Смородинцев проводил аналогичный опыт иммунизации людей вирусом, адаптированным к мышинным легким, представлялось интересным провести сравнение эффективности обоих методов во время ожидаемой вспышки.

Для приготовления вакцины использовалась культура вируса на курином эмбрионе с 4-х дневной инкубацией до и после заражения. В качестве источника вируса мы взяли штамм Смородинцева, который был получен нами от автора в культуре на мышинных легких. Этот вирус мы адаптировали к куриным эмбрионам. Вакцина представляла собой размельченные зародыши с прилегающими оболочками. Этот материал эмульгировался в физиологическом растворе с 0,3% глицерина. В 1 см³ вакцины содержалось 4000 минимальных смертельных доз вируса для мыши. При интраназальном введении каждый человек получал по 0,25 см³ яичной культуры, т.е. по 1000 ДМ вируса. Мы не наблюдали у людей никакой реакции в ответ на интраназальное введение такого количества вируса.

Опыт проводился в Москве на фабрике "Красная Роза" и на заводе "Оргаметалл". В опыт вошло 1616 человек, которые были 2-хкратно вакцинированы с интервалом в 5-7 дней. Для контроля было оставлено 1617 человек. Контрольная группа обрабатывалась одновременно с подопытной. Вместо вакцин каждый человек контрольной группы получал по 0,25 см³ эмульсии эмбриона без вируса.

Вакцинация была закончена за один месяц до начала вспышки гриппа. Результаты вакцинации оценивались по заболеваемости и по среднему количеству дней, проведенных каждым больным на бюллетене. Учитывались только те заболевания, которые были зарегистрированы через 15 дней после окончания вакцинации. Длительность периода наблюдения продолжалась 1,5 месяца. Данные, полученные по группе вакцинированных сравнивались с данными контрольной группы. Сопоставление заболеваемости привитых и непривитых не позволило сделать вывода в пользу эффективности испытанного нами метода вакцинации.

Табл. 16.

Оценка эффективности вакцинации по заболеваемости и по количеству дней проведенных на бюллетене.

Группы.	Общее колич. че- ловек.	Заболело.		Колич. дней нетрудосп.	
		Колич.	%	На всю группу	На 1 чело- в.
Вакциниров.	1572	267	16,9	1191	4,4
Контрольн.	1465	241	17,1	1170	4,8

На таблице 16 представлены данные сравнительной заболеваемости и количества дней нетрудоспособности в группе вакцинированных и контрольной группе. Через 15 дней после вакцинации заболело в течение 1,5 месяцев 267 человек из 1572 вакцинированных. Это количество заболеваний составило 16,9%. Из 1465 человек контрольной группы в течение того же времени заболело 241 человек, что составило 17,1%.

Если рассматривать эффективность вакцинации с точки зрения среднего количества дней, проведенных на бюллетене каждым больным, то и здесь не наблюдалось большой разницы между опытной и контрольной группами. На каждого больного в опытной группе пришлось по 4,4 дня нетрудоспособности; на каждого больного в контрольной группе 4,8 дней нетрудоспособных.

В обеих группах был произведен учет заболеваемости по полу и возрасту. В результате этого учета, данные которого представлены на таблице 17, оказалось, что наибольший процент заболеваемости пал на возраст до 20-ти лет и выше 50 лет независимо от пола.

Табл. 17.

Заболеваемость гриппом различных возрастных групп среди вакцинированных и контрольных.

Возраст	Группа вакцинированных.								Группа Контрольная.							
	Общ.		Мужчин.		Женщины.				Общ.		Мужчин.		Женщины.			
	кол.	ко-лич.	Заболел.	ко-лич.	Заболел.	ко-лич.			Заболел.	ко-лич.	Заболел.	ко-лич.	Заболел.			
			кол.	ко-лич.	кол.	ко-лич.					кол.	ко-лич.	кол.	ко-лич.		
До 20 л.	447	291	73	25	156	23	21	314	146	37	25	168	27	16		
21-30	496	182	31	17	314	46	14	496	168	34	20	328	50	15		
31-40	356	89	13	15	267	56	21	259	95	13	13	164	26	15		
41-50	166	38	4	10	128	24	19	168	45	7	15	123	19	15		
свыше 50	133	28	4	14	105	23	22	115	27	3	11	88	19	21		
без учета зан.воз.	18	10	2	20	8	2	25	155	34	8	33	131	58	44		
Всего:	1616	638	127	19,9	978	184	20,3	1517	515	102	19,7	1002	199	19,8		

При сравнении среднего процента заболеваемости среди мужчин и женщин не удалось отметить преимущественной поражаемости одного пола перед другим. В среднем заболело около 20% как мужчин, так и женщин в опытной и контрольной группах.

Таким образом, на основании опыта интраназального введения людям живого яичного вируса гриппа были сделаны следующие выводы. 1) Живой вирус гриппа, длительно культивированный на мышах, а затем адаптированный к куриному эмбриону безвреден для людей. 2) Двукратное введение этого вируса не оказало влияния на снижение заболеваемости гриппом в группе привитых по сравнению с контрольной.

3. Обсуждение результатов по главе III.

Мы поставили перед собой задачу изучить профилактические свойства яичной культуры вируса при интраназальном применении.

В опыте на мышах мы сравнили эффективность вакцин, приготовленных из яичных и мышинных вирусов.

При внутрибрюшном применении обеих вакцин не отмечалось разницы в их способности стимулировать иммунитет против соответствующих доз вируса. При эквивалентном содержании вируса в яичных и мышинных культурах наблюдалась одинаковая эффективность обеих видов вакцин.

Интраназальное введение живого вируса было ограничено предельной резистентностью мышей к инфекции. При попытке вакцинировать мышей интраназально удавалось ввести с профилак-

ческой целью не более 0,01 ДЛМ вируса. Независимо от способа его культивирования. После 3-х кратного введения этих доз, как личного, так и мышинного вирусов, не наблюдалось повышения устойчивости мышей к заражению смертельными дозами вируса.

В этом опыте нам не удалось подтвердить данных Итона и Бека, которые успешно иммунизировали мышей живым вирусом. После интраназального введения не инфекционных доз личного вируса эти авторы наблюдали развитие иммунитета у мышей.

При интраназальной вакцинации мышинным вирусом авторы наблюдали появление иммунитета у мышей только после явно выраженной специфической инфекции. Нам не удалось установить такой тонкой границы между инфицирующей и смертельной дозами вируса. Для проверки иммунитета авторы пользовались 1 ДЛМ вируса. В более жестких условиях опыта при проверке иммунитета 100 ДЛМ вируса мы не наблюдали никакого иммунитета у мышей, вакцинированных интраназально. Мы не считаем эту дозу чрезмерно высокой; напротив, она оказалась совершенно достаточной, чтобы можно было сделать отчетливые выводы об эффективности внутрибрюшной вакцинации.

В противоположность данным Итона и Бека наши личные культуры были также патогенны для мышей, как и мышинные. Дозировка личиных культур была так же затруднительна в отношении подбора вакцинирующей, а не смертельной, доз вируса, как и дозировка мышинных культур.

Таким образом данные нашего опыта на мышах вполне подтверждали данные Френсиса о решающем значении количества вируса для создания прочного иммунитета. При вакцинации дозой

вируса не менее, чем в 100 раз превышавшей испытательную дозу, мы наблюдали перекрестный иммунитет против яичного и мышинного вирусов. Уменьшение вируса в вакцине влекло за собой ослабление иммунитета. Понижение напряженности иммунитета выразилось в сохранении устойчивости вакцинированных мышей только к гомологичному штамму.

Безуспешность интраназальной вакцинации мышей мы объяснили недостаточной дозой вируса, которую они получили с целью профилактики. Повышение дозировки было ограничено высокой чувствительностью мышей к гриппозному вирусу.

Ввиду того, что человек мало чувствителен к вирусу гриппа, адаптированному к тканям животных, мы попытались вакцинировать людей большими дозами яичного вируса. В качестве вакцины мы взяли 2000 ДЛМ вируса, который вводился людям интраназально в два приема. Это количество в 100.000 раз превышало количество вируса введенного мышам.

Однако, этой дозы оказалось недостаточно, т.к. опыт на людях дал отрицательный результат.

Отрицательные результаты опыта активной иммунизации людей можно толковать не только с точки зрения количества яичного вируса, но и качества вакцины.

В опыте на мышах была установлена равноценность вакцин, приготовленных из яичных и мышинных культур, при внутрибрюшинном методе введения. Следовательно наша вакцина была достаточно антигенной. По качеству своему в отношении адаптации вируса к тканям куриного эмбриона соответствовала вакцинам ^{она} Стюарт-Гарриса, Бернета, Френсиса и Меджилла, Хорсфойла и др.

Останавливаясь на методе введения вакцины мы видим, что интраназальный метод в нашем опыте оказался не более эффективным, чем подкожный метод в опыте Стюарт-Гарриса. Неудачу своего опыта Стюарт-Гаррис объяснял тем, что мероприятие было проведено с опозданием. Начало вакцинации совпало с началом эпидемии. В нашем опыте вакцинация была закончена за один месяц до начала вспышки. Таким образом, срок вакцинации в нашем опыте был вполне достаточным для образования иммунитета.

Для объяснения отрицательных результатов своего опыта Стюарт-Гаррис привел предположение о возможном несоответствии антигенных свойств вируса в вакцине и вирусов, явившихся причиной вспышки. Во время эпидемии 1940 года, когда была произведена оценка эффективности интраназального метода вакцинации яичным вирусом, мы выделили три штамма вируса гриппа. Эти штаммы были совершенно идентичны с вирусом Смородинцева, который был взят нами для приготовления вакцины. Таким образом неудачу своего опыта мы не можем объяснить антигенным различием штаммов вируса в вакцине и вирусов, циркулировавших во время эпидемии.

После рассмотрения всех условий опыта мы пришли к заключению, что наша попытка профилактики гриппа в человеческом коллективе оказалась столь же неэффективной, как и многие другие о которых упоминалось в литературном обзоре.

Глава IV. ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОТИВОГРИППОЗНЫХ ИММУННЫХ СЫВОРОТОК.

Лейдлоу, Смит, Эндрюс и Рэнкин в 1935 году, Смородинцев в 1938 году, Хейр в 1939 году получили противогриппозные сыворотки при иммунизации лошадей культурой вируса на хорьковых и мышечных легких.

Шахмалиева в 1941 году сообщила о получении активной сыворотки в результате иммунизации лошади культурой вируса гриппа на куриной эмбрионе.

На основании работ этих авторов трудно сделать вывод о сравнительной эффективности предложенных ими методов иммунизации. При отсутствии общей методики количественного определения вирус нейтрализующих свойств противогриппозных сывороток невозможно произвести качественную оценку методов иммунизации.

Мы попытались получить иммунные сыворотки при обработке животных яичными и мышечными культурами вируса. Кроме того мы предложили методику титрования противогриппозных сывороток. Пользуясь этой методикой мы провели сравнение активности сывороток, полученных в результате иммунизации антигенами из мышечных и яичных культур вируса.

1. Методика получения и титрования сывороток.

Виды антигена. Для иммунизации животных с целью получения противогриппозных сывороток мы пользовались живыми культурами вируса гриппа. Мы испытали яичные и мышечные культуры вируса. В дальнейшем изложении мы будем называть яичным или мышечным антигенами соответствующие культуры вирусов.

Личный антиген представлял собой эмульсию из целого оплодотворенного яйца, зараженного вирусом гриппа. Для каждой инъекции готовилась свежая порция антигена из яиц, заранее вскрытых и проверенных на стерильность. В ожидании ответа после посева на стерильность яичные культуры сохранялись в банке с бусами при $T + 4^{\circ}\text{C}$. Перед введением животному к культуре добавлялся физиологический раствор в таком количестве, чтобы получилась 20-30%-ная эмульсия. После осаждения крупных частиц тканей эмбриона эмульсия использовалась в качестве антигена для подкожной, внутрикожной или внутрибрюшинной инъекций.

Методика приготовления антигена из мышинных легких заключалась в следующем. Мыши зараженные интраназально массивными дозами вируса, погибали через 48 часов после заражения. Легкие стерильно вскрытых мышей растирались в ступках с песком. Из растертой массы делались посевы на стерильность на пластинки кровяного агара. До получения результатов контроля на стерильность ступки с легкими хранились в холодильнике. Стерильные растертые легкие эмульгировались в физиологическом растворе с таким расчетом, чтобы получилась 10 %-итная взвесь. Центрифугат этой взвеси служил антигеном для иммунизации животных. Этот антиген мы называли "мышинным".

Временная методика титрования противогриппозных сывороток.

Активность иммунных сывороток определялась в работах различных авторов опытами нейтрализации на мышах. При этом удавалось доказать, что такие сыворотки нейтрализовали вирус, а также обладали в большей или меньшей степени профилак-

тическими и лечебными свойствами. На основании этих опытов, поставленных в различных условиях, трудно было сделать об"ективную оценку качества отдельных сывороток.

Совместно с С.И. Хаит мы выработали временную методику титрования противогриппозных сывороток. Эта методика была утверждена в 1941 году Сывороточно-вакциной комиссией НКЗ СССР. Методика титрования заключается в следующем. Делается ряд разведений сыворотки с коэффициентом 2. Например, 1:25, 1:50, 1:100 и т.д. К разведенной таким образом сыворотке добавляется равный об"ем гриппозного вируса, $1/20 \text{ см}^3$ которого содержит приблизительно 2000 минимальных смертельных доз для мыши. После 20-ти минутного контакта в термостате или 1-часового контакта при комнатной температуре эта смесь в количестве $0,05 \text{ см}^3$ (состоящая из $0,025 \text{ см}^3$ сыворотки и $0,025 \text{ см}^3$ вируса) вводится интраназально мышам под легким эфирным наркозом. Каждое разведение сыворотки в смеси с вирусом испытывается на 4-х мышах. Учитывается наибольшее разведение сыворотки, дающее переживание 75% зараженных мышей к 10-му дню и по его числовому выражению определяется вирус нейтрализующий титр сыворотки. Например, $1/40 \text{ см}^3$ ($0,025 \text{ см}^3$) сыворотки, разведенной в 100 раз способна предохранить 75% мышей от 1000 ДЛМ вируса. Следовательно 1 см^3 не разведенной сыворотки нейтрализует 4.000.000 ДЛМ вируса. Титр сыворотки определяется по следующей формуле: $1000 \times 40 \times \text{на разведение сыворотки}$.

Одновременно с установлением титра сыворотки и в обязательном порядке проверяется ДЛМ вируса, с которым титруется сыворотка. За 1 ДЛМ мы принимаем то наибольшее разведение вируса, которое при интраназальном введении в количестве $0,05 \text{ см}^3$

даст 50 % гибель мышей к 10-му дню.

Все разведения сыворотки и вируса делаются отдельными пипетками на бульоне pH 7,2.

Качество всех сывороток, полученных нами от кроликов и лошадей, мы определяли по их способности нейтрализовать наибольшее количество ДЛН вируса согласно только, что описанной методики.

2. Приготовление сывороток на кроликах.

Изучение антигенных свойств яичных культур вируса было проведено нами сначала на кроликах. Мы получили на кроликах штаммоспецифические и гипериммунные противорриппозные сыворотки.

Штаммоспецифические кроличьи сыворотки. Мэдвилл и Френсис иммунизировали кроликов тканевыми культурами вируса с целью получения сывороток, специфичных против отдельных штаммов.

Мы попытались приготовить сыворотки против штаммов Смо-родинцева, № 4, № 5 и № 6, иммунизируя кроликов яичными культурами вирусов.

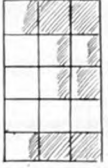
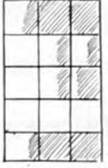
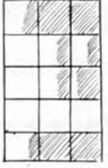
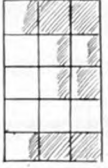
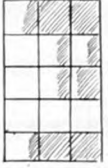
Для сравнительной оценки иммуногенных свойств яичного вируса мы иммунизировали часть кроликов мышинным вирусом Смо-родинцева. Иммунизация производилась путем чередования подкожных и внутрикожных инъекций культур вируса. Кролики получали по три подкожных и внутрикожных инъекции с 2-3 дневными интервалами.

Подкожно было введено по 0,5 - 1,0 - 1,5 см³ антигена последовательно; внутрикожно по 0,25 - 0,3 - 0,5 см³. Каждым видом антигена было иммунизировано по два кролика. У каждого кролика была взята кровь до начала иммунизации. Мы убедились в предварительном опыте, что эти сыворотки не обладали способностью нейтрализовать вирус. На таблице 18 представлены суммарные результаты нескольких опытов перекрестной нейтрализации. Одноименные сыворотки от 2-х кроликов были соединены вместе. В разведениях 1:5 они были смешаны с яичными культурами всех 4-х штаммов и с мышинной культурой штамма Смородинцева. Каждой смесью вируса было заражено по три мыши.

Данные этих опытов показали, что мышинный и яичный штаммы Смородинцева совершенно идентичны. Сыворотка против мышинного штамма Смородинцева одинаково нейтрализовала мышинный и яичный одноименные вирусы. В опыте поставленном на трех мышках, по две мыши остались живыми с совершенно неповрежденными легкими; у каждой третьей мыши были обнаружены различные степени поражения легких.

Табл.18.

Перекрестная нейтрализация вирусов штаммоспецифическими кроличьими сыворотками.

Вирусы в колич. 100 дЛл	Сыворотки в развед. 1:5 против:				
	Мыш. Смор.	Яичн. Смор.	Яичн. № 4.	Яичн. № 5.	Яичн. № 6.
Мыш. Смородинц.					
Яичн. Смородинц.					
Яичн. № 4.					
Яичн. № 5.					
Яичн. № 6.					

В опыте с этой же сывороткой и вирусами № 4, № 5 и № 6 по одной мыши из трех остались живыми со здоровыми легкими; по две мыши оказались больными с различной степенью поражения легких, обнаруженной на аутопсии.

В опыте нейтрализации тех же вирусов сывороткой, приготовленной против яичного штамма Смородинцева оказалось, что эта сыворотка также эффективна против мышинного вируса Смородинцева, как и сыворотка, приготовленная специально против мышинного штамма. В отношении всех штаммов яичного вируса эта сыворотка оказалась более активной, чем сыворотка против мышинного штамма Смородинцева.

Сыворотка, приготовленная против яичного штамма № 4 оказала едва заметное защитное действие в отношении гомологичного штамма. Осталась в живых одна ~~мышь~~ из трех мышей, зараженных смесью вируса № 4 с одноименной сывороткой, при гибели всех остальных мышей, зараженных смесями этой сыворотки с гетерологичными штаммами.

Сыворотка против яичного штамма № 5 почти в одинаковой степени нейтрализовала яичные вирусы Смородинцева и № 4. Все мыши остались в живых и только по очагам пневмонии, обнаруженным на вскрытии, можно было отличить этих мышей от мышей, зараженных смесью этой сыворотки с гомологичным штаммом вируса. В отношении гомологичного штамма наблюдалось полное обезвреживание вируса: на аутопсии у всех 3-х мышей, убитых через 10 дней после заражения, были обнаружены здоровые легкие. Эта сыворотка оказала слабое нейтрализующее действие на мышинный вирус Смородинцева и яичный вирус № 6. В этих группах по две мыши из 3-х пали с явлениями сплошной гепатизации легких; у каждой третьей мыши,

оставшейся в живых, были обнаружены очаги пневмонии.

Сыворотка против яичного вируса № 6 хорошо нейтрализовала все штаммы выделенные во время эпидемии 1940 года, т.е. вирусы № 4, № 5 и № 6. Все мыши, зараженные смесями этих вирусов с сывороткой против штамма № 6, остались живыми; на аутопсии у них были обнаружены здоровые легкие. В отношении вируса Смородинцева, яичного и мышного штаммов, было обнаружено едва заметное отличие, которое выразилось в том, что по одной из трех выживших мышей оказались больными: у них были отмечены частичные поражения легочной ткани.

При общей оценке сывороток наблюдалась различная нейтрализующая способность их независимо от специфичности. Так сыворотка против вируса № 6 обладала более сильным нейтрализующим действием в отношении гомо-и гетерологичных штаммов, чем все остальные сыворотки. По своим свойствам эта сыворотка более соответствовала гипериммунной, чем штаммоспецифической.

Наоборот, сыворотка против вируса № 4 оказалась слабой. Она оказала едва заметное защитное действие в отношении гомологичного штамма.

Наиболее специфической являлась сыворотка против штамма № 5.

Мы считаем, что различная сила полученных сывороток находилась в зависимости от различной антигенности штаммов. Таким образом опыт показал, что, во-первых, яичные культуры гриппозных вирусов могут служить антигеном для приготовления штаммоспецифических сывороток; во-вторых, в опыте перекрестной нейтрализации вирусов этими сыворотками можно выявить

некоторые отличия, существующие между штаммами очень близкими по антигенной структуре.

Гипериммунные кроличьи сыворотки. Мы поставили перед собой задачу получить противогриппозную сыворотку, иммунизируя лошадей яичным антигеном. Прежде чем приступить к иммунизации лошадей мы изучили динамику нарастания антител у кроликов при обработке их яичным вирусом. Известно, что кролики, как и лошади, не чувствительны к вирусу гриппа; поэтому мы считали, что они являлись подходящей моделью для предварительного опыта в лабораторных условиях.

В опыте на кроликах мы сравнивали эффективность яичного и мышинного антигенов. Эффективность антигенов оценивалась по качеству полученной сыворотки. Качество сыворотки определялось по ее способности нейтрализовать максимальное количество ДМ-вируса. Для установления нейтрализующих свойств 1 см³ сыворотки мы пользовались вышеописанной методикой титрования противогриппозных сывороток.

В опыте, результаты которого изображены на таблице 19, мы определяли нейтрализующие свойства сывороток, полученных при иммунизации кроликов яичным и мышинным антигенами. Иммунизация производилась подкожным методом пятикратно с недельными интервалами. Каждым видом антигена обрабатывалось по 3 кролика. Нейтрализующие свойства испытывались в смеси сывороток от 3-х кроликов, иммунизированных тем или другим видом антигена.

Как показано на таблице 19, сыворотки кроликов, обработанных обоими видами антигенов, в одинаковой степени нейтрализовали одноименные вирусы. В 1 см³ каждого вида сывороток содержалось такое количество антител, которое было способ-

но нейтрализовать по 800.000 ДЛМ одноименных вирусов.

Табл. 19.

Нейтрализующие свойства кроличьих сывороток, полученных в результате ^{иммунизации} яичным и мышинным антигенами.

№ № кроликов от которых получена сыворотка.	Антиген	Колич. подкож. ин"екций	Нейтрализующие свойства 1 см ³ сыворотки.	
			Против яичн. вируса.	Против мышинного вируса.
321, 359, 378	яичный вирус.	5	800.000	400.000
399, 6950, 6992	мышин. вирус	5	200.000	800.000

В перекрестном опыте эти сыворотки нейтрализовали меньшее количество ДЛМ вирусов. Сыворотки, приготовленные против яичного вируса, нейтрализовали мышинный вирус в количестве 400.000 ДЛМ; сыворотки против мышинного вируса нейтрализовали яичный вирус в количестве 200.000 ДЛМ.

В следующем опыте мы наблюдали динамику нарастания антител в сыворотках в результате иммунизации обоими видами антигенов. В этом опыте мы иммунизировали кроликов внутрибрюшинно с целью получения сывороток высокого титра. В качестве антигенов были взяты яичные и мышинные культуры штамма Смородинцева. Нейтрализующие свойства сывороток испытывались против мышинного вируса Смородинцева. Сыворотки всех кроликов до иммунизации не обладали способностью нейтрализовать вирус.

Как показано на таблице 20 наблюдалось явное нарастание антител с увеличением количества иммунизирующих доз вируса. Нарастание количества антител наблюдалось в сыворотках кроликов, иммунизированных обоими видами антигенов.

Табл. 20.

Увеличение нейтрализующей способности сывороток в процессе иммунизации.

№ кроликов, от которых получена сыворотка.	Антиген	Нейтрализующие свойства 1 см ³ сывороток.	
		После 1 ин"екции.	После 3 ин"екций.
324	яичный.	4.000	4.000.000
381	"	4.000	4.000.000
318	мышиний.	4.000	400.000
337		40.000	20.000.000

После однократного введения антигенов у всех кроликов была взята сыворотка. Две сыворотки кроликов, обработанных яичным антигеном и одна сыворотка кролика, обработанного мышинным антигеном нейтрализовали вирус в количестве около 4.000 ДМ. Сыворотка кролика № 337, получившего одну ин"екцию мышинного антигена приобрела способность нейтрализовать 40.000 ДМ вируса.

После 3-й ин"екции вновь была собрана сыворотка от всех 4-х кроликов. В результате титрования этих сывороток обнаружилось значительное повышение их нейтрализующей способности. Так в ~~сыворотке~~ 1 см³ сывороток кроликов № 324 и № 381 содержалось такое количество антител, которое нейтрализовало 4.000.000 ДМ вируса. Таким образом после 3-х ин"ек-

ций личного антигена наблюдалось увеличение титра этих сывороток в 1000 раз по сравнению с титром после первой инъекции. На примере 3-х кратной внутрибрюшинной иммунизации кроликов мышинным антигеном мы наблюдали увеличение титра сывороток в 100 и 500 раз против титра после однократных инъекций. 1 см³ сыворотки кролика № 318 после первой инъекции нейтрализовал 4000 ДЛМ вируса, после 3-й инъекции - 400.000 ДЛМ того же вируса.

Количество антител в сыворотке кролика № 337 после первой инъекции определялось способностью 1 см³ этой сыворотки нейтрализовать 40.000 ДЛМ вируса. После 3-й инъекции антигена в 1 см³ этой сыворотки содержалось такое количество антител, которое нейтрализовало 20.000.000 ДЛМ вируса.

Таким образом все 4 кролика дали значительный подъем антител, нейтрализующих вирус в процессе иммунизации. Сыворотки этих кроликов могут быть отнесены к гипериммунным по количеству антител, нейтрализующих вирус. Некоторые колебания в титре этих сывороток мы не связываем с характером антигена. Различное повышение титра сывороток, от 100 до 1000 раз, мы относим за счет индивидуальности кроликов.

3. Приготовление гипериммунных сывороток на лошадях.

После ободрающих результатов опыта получения иммунных сывороток на кроликах мы перешли к иммунизации лошадей. Работа по изучению методов иммунизации лошадей была проведена нами совместно с С.Д.Хант. В соответствии с поставленной за-

дачей мы изучали эффективность метода иммунизации лошадей яичным антигеном по сравнению с мышинным.

Схема иммунизации: Перед началом иммунизации у каждой ло-

шади была взята проба крови для того, чтобы убедиться в отсутствии способности нейтрализовать вирус. Иммунизация мышинным антигеном производилась подкожно с интервалами в 4-6 дней возрастающими дозами от 40 см³ до 150 см³. Яичный антиген вводился комбинированным методом. Подкожные инъекции чередовались с внутрикожными. Подкожно вводилось от 50 до 200 см³ антигена; внутрикожно по 3 см³. Инъекция яичного антигена производилась с 2-3-дневными интервалами.

Первый цикл иммунизации продолжался 50 дней. После чего было сделано кровопускание. Через 1 месяц после кровопускания был проведен второй цикл иммунизации. Всего мы профели 6 циклов, каждый из которых продолжался от 1 до 1 1/2 месяцев с соблюдением интервалов от 3-х до 6-ти недель. Через 5-6 дней после окончания каждого цикла бралась проба крови для определения качества сыворотки. Если сыворотка в количестве 1 см³ обладала способностью нейтрализовать не меньше 5.000.000 ДМ вируса, то делалось кровопускание с целью получения иммунной сыворотки.

Титрование сыворотки производилось по временной методике утвержденной Сывороточно-вакциной комиссией НСЗ СССР.

В нашем распоряжении было 6 лошадей. На табл. 21 приведены данные опыта с указанием циклов иммунизации, видов антигена и нейтрализующих свойств полученных сывороток.

Две лошади, № 22 и № 23, только в первом цикле получили мышинный антиген. Лошадь № 22 пала от случайной причины, а лошадь № 23 в дальнейшем была переведена на иммунизацию смешанным антигеном. Во втором и третьем циклах она получала мышинный и яичный антигены в следующем порядке: один раз в неделю производилась подкожная ин"екция мышинного антигена, в течение следующей недели иммунизация велась яичным антигеном подкожно - внутрикожно с 2-3 дневными интервалами. Затем следовала новая подкожная ин"екция мышинного антигена и т.д.. В 4-м - 5 циклах эта лошадь была переведена полностью на иммунизацию яичным антигеном. 4 лошади, №№ 19, 21, 341 и 344, в первом и во втором циклах получали яичный антиген, по вышеописанной схеме. Лошадь № 19 в течение 3-го и 4-го циклов иммунизировалась смешанным антигеном в том же порядке, который был указан для лошади № 23. В 5-м цикле она получала яичный антиген. Лошади №№ 21, 341 и 344 с самого начала до конца иммунизировались яичным антигеном.

Наращение антител в процессе иммунизации. Мы наблюдали появление антител у всех лошадей после первого цикла иммунизации. В соответствии с данными таблицы 21 уровень антител в этот период не превышал такого количества, при котором 1 см³ сыворотки был способен нейтрализовать не более 10.000.000 ДЛМ вируса. После второго цикла наблюдалось 5-ти - 10-ти кратное повышение нейтрализующей способности 1 см³ сывороток у лошадей №№ 19, 21 и 23. Сыворотки лошадей № 341 и 344 остались на прежнем уровне после второго цикла иммунизации. Сыворотка лошади № 341 нейтрализовала 4.000.000 ДЛМ вируса, сыворотка лошади № 344 нейтрализовала 8.000.000 ДЛМ

Т а б л и ц а 21

Нейтрализующие способности лошадиных сывороток в зависимости от видов антигенов и циклов иммунизации.

Имм. Лоша- дей.	Цикл:	I		II		III		IV		V		VI	
		антиг. рот.	сыво- рот.	антиг. ген.	сыво- рот.	антиг. ген.	сыво- рот.	антиг. ген.	сыво- рот.	антиг. ген.	сыво- рот.	антиг. ген.	сыво- рот.
19	лич.	1600000	лич.	5 мил.	смеш.	2 мил.	смеш.	2 мил.	лич.	400 тыс.	-	-	-
21	лич.	8 мил.	лич.	80 мил.	лич.	80 мил.	лич.	20 мил.	лич.	40 мил.	лич.	80 мил.	-
22	мыш.	8 мил.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	мыш.	6400000	смеш.	40м.	смеш.	40мил.	лич.	20мил.	лич.	80 мил.	лич.	40 мил.	-
341	лич.	4 мил.	лич.	4 мил.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
344	лич.	8 мил.	лич.	8 мил.	-	-	-	-	-	-	-	-	-

вируса, как это отмечалось и после первого цикла.

максимума

после II Вирус нейтрализующий титр сывороток достигал своего цикла иммунизации. По нашим наблюдениям второй цикл определял качество лошади, как продуцента. В процессе гипериммунизации не удавалось поднять титр сыворотки значительно выше уровня, достигнутого во втором цикле. Таким образом мы стремились сохранить этот титр в течение дальнейшей иммунизации.

Как видно на таблице 21 наблюдались колебания нейтрализующих свойств сывороток. Мы отметили значительное понижение титра сывороток у лошадей № 21 и № 23 после 4-го цикла иммунизации. Это падение титра совпало с жаркой погодой после перерыва в течение полутора месяцев между 3 и 4 циклами. После 5 и 6 циклов титр сывороток у этих лошадей установился на своем максимальном уровне.

Сравнение методов иммунизации яичным и мышинным антигенами.

На примере иммунизации лошадей № 21 и № 23 мы сравнили эффективность яичного и мышинного антигенов.

Кривая на рисунке Д, составленная по данным таблицы 21 отразила колебания уровня антител у этих двух лошадей.

Лошадь № 21, первоначально получавшая мышинный антиген, после первого цикла была переведена на иммунизацию смешанным антигеном. На месте инъекции мышинного антигена часто появлялись абсцессы и отмечалась общая реакция с повышением T до 40°C и выше. Ввиду реактивности мышинного антигена мы отказались от него. Во 2 и 3 циклах мы проводили смешан-

ную иммунизацию, т.е. инъекции мышечного антигена сменялись инъекциями яичного антигена. В 4-5-6 циклах лошадь № 23 получала исключительно яичный антиген. Лошадь № 21 иммунизировалась только яичным антигеном.

Мы имели возможность сравнить эффективность яичного и мышечного антигенов в процессе 3-х первых циклов иммунизации.

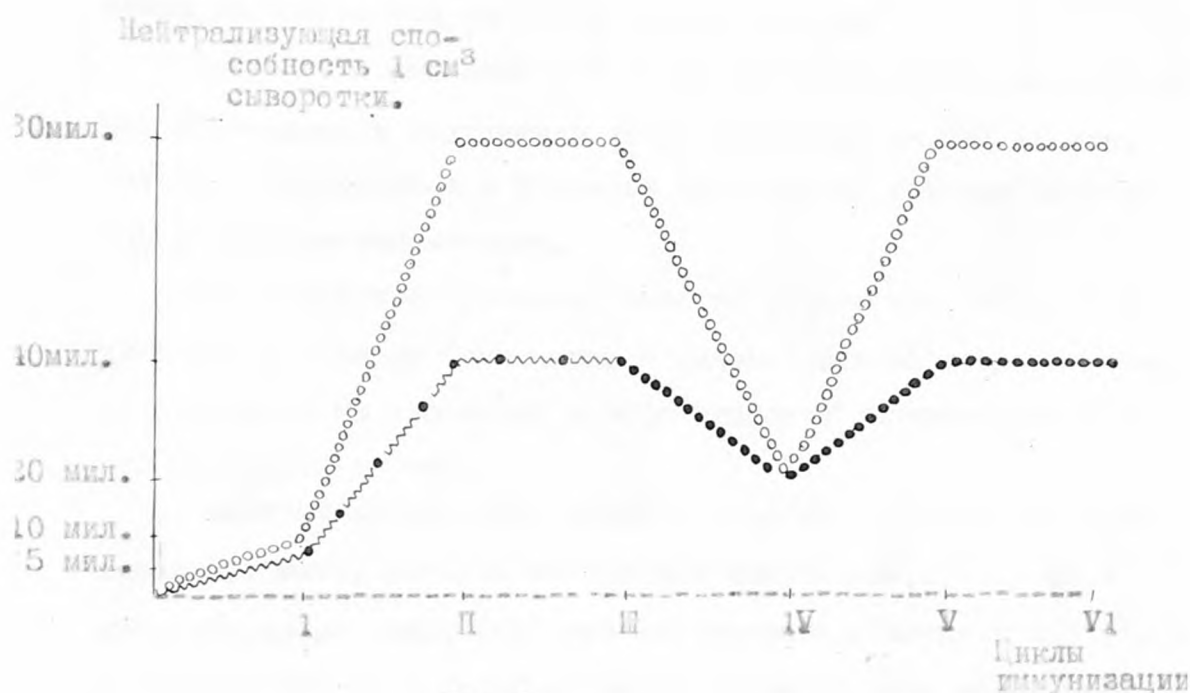


Рис.Д.

Колебания уровня сывороточных антител при иммунизации лошадей яичным и мышечным антигенами.

Обозначения ○○○○○○ яичный антиген, лошадь № 21
 ~~~~~ мышечный } антигены лошадь № 23.  
 ●●●●● яичный }

После первого цикла мы наблюдали параллельное нарастание антител в сыворотках обеих лошадей. После второго цикла был отмечен максимальный подъем нейтрализующей способности обеих сывороток. Сыворотка лошади № 21 в количестве 1 см<sup>3</sup>

нейтрализовала 80.000.000 ДЛМ вируса; сыворотка лошади № 23 - 40.000.000 ДЛМ вируса. ~~Исследованиями~~. На этом уровне сыворотки оставались до 4-го цикла. Как указывалось выше в этот период наблюдалось падение нейтрализующих свойств сывороток у обеих лошадей.

Таким образом при иммунизации мышинным и яичным антигенами наблюдалось параллельное нарастание антител и сохранение их количества на определенном уровне.

После перевода лошади № 23 на иммунизацию яичным антигеном мы наблюдали сохранение титра сыворотки на той высоте, которая установилась в процессе иммунизации мышинным антигеном с добавлением яичного.

На примере иммунизации лошадей яичным антигеном сравнительно с мышинным (смешанным с яичным) и независимо от этого сравнения мы убедились в эффективности иммунизации яичной культурой вируса.

Нейтрализующий титр наших сывороток во много раз превышал тот титр, который мы считали допустимым, приступая к иммунизации лошадей. Согласно исследованиям Смородинцева для профилактических и лечебных целей пригодна лишь такая противогриппозная сыворотка, которая в количестве одного см<sup>3</sup> нейтрализует не меньше 5.000.000 ДЛМ вируса. Наша сыворотка от лошади № 21 оказалась в 16 раз активнее требуемой.

#### 4. Обсуждение результатов по главе IV.

В соответствии с поставленной задачей нам удалось получить противогриппозные сыворотки при иммунизации животных личными культурами вируса. Мы испытали эффективность личного антигена при приготовлении штаммоспецифических сывороток на кроликах и гипериммунных сывороток на кроликах и лошадях.

Для контроля эффективности личного антигена часть животных была иммунизирована мышинным антигеном. Во всех случаях сыворотки, полученные в результате иммунизации <sup>животных</sup> личным вирусом, были не менее активны, чем сыворотки животных, иммунизированных мышинным вирусом.

При сравнительной иммунизации лошадей обоими видами антигена мы наблюдали большую реактивность мышинного антигена; яичный антиген был ареактивен.

Бендрас и Смит изучали влияние чужеродных тканевых экстрактов на эффективность антигена. По данным этих авторов экстракты нормальных мышечных тканей производили неблагоприятное влияние на иммунизацию хорьков вакциной из хорьковых легких против повторного заражения вирусом инфлюэнцы.

Прибавление к той же вакцине экстракта не зараженных тканей куриного эмбриона в меньшей степени и не постоянно препятствовало нормальному развитию иммунитета. При иммунизации лошадей яичным и смешанным антигенами мы наблюдали меньшую реактивность личного антигена. Кроме того мы отметили несколько более высокое накопление антител в сыворотке лошади № 21, иммунизированной яичным антигеном, чем в сыворотке лошади № 23, которая частично получала мышинный антиген. Этот пример

может быть объяснен с точки зрения препятствующего действия мышинных тканей на стимуляцию антител.

Для оценки полученных нами сывороток мы пользовались временной методикой титрования противогриппозных сывороток.

Стюарт-Гаррис для той же цели пользовался методом сравнения нейтрализующей вирус способности своих сывороток со стандартной сывороткой. В качестве стандарта он вводил в каждый опыт лошадиную сыворотку ДН-2, которая была получена в 1935 году Лейдлоу, Смитом, Индрессом и Дэнкином.

Мы считаем, что предложенный нами метод титрования дает конкретное представление о нейтрализующей способности <sup>сыворотки.</sup> 1 см.<sup>3</sup> При пользовании этим методом исследователь не зависит от наличия и качества стандарта.

По аналогии с общепринятыми методами титрования анти-токсических сывороток было бы удобнее оценивать качество противогриппозных сывороток по количеству антител в 1 см.<sup>3</sup>. Однако поскольку в вирусологической практике не установлено термина, соответствующего антитоксической единице, мы предпочитали оценивать свои сыворотки по количеству ДМ вируса, которое нейтрализовалось 1 см.<sup>3</sup> испытуемой сыворотки.

Таким образом, методом иммунизации лошадей личинки культурами вируса была получена активная противогриппозная сыворотка. Ее титр определялся согласно временной методике, утвержденной Сывороточно-вакциной комиссией Наркоматрза СССР.

Концентрация антител в полученных нами лошадиных сыворотках более, чем в 10 раз превышала то количество антител, которое по данным Смородинцева являлось достаточным для применения противогриппозной сыворотки с профилактическими и лечебными целями.

---ooo000ooo---

### З а к л ю ч е н и е.

Резюмируя результаты своих опытов по изучению свойств гриппозного вируса <sup>должны</sup> мы отметить следующие основные этапы проделанной работы.

Мы начали свои исследования с того, что пользуясь каждой вспышкой гриппа, пытались выделить вирус от больного человека на мышах или куриных эмбрионах. При этом нам удалось выделить вирус не только от больных эпидемическим гриппом, но и от больных насморком.

При изучении свойств выделенных штаммов оказалось, что большинство их принадлежало к группе вирусов инфлюэнцы типа А. <sup>мы</sup> Далее перешли к изучению культур гриппозного вируса на куриных эмбрионах. При этом мы отметили, что вирус, адаптированный к мышам, легко культивировался на куриных эмбрионах в бесконечной серии пассажей.

По нашим наблюдениям все ткани оплодотворенного яйца, зараженного вирусом, после кратковременной инкубации содержали большое количество вируса. Пользуясь тем, что целое яйцо являлось культурой вируса мы разработали метод массового получения вируса на яйцах.

Личные культуры вируса являются ценным материалом в руках экспериментатора. В естественных условиях ткани оплодотворенного яйца стерильны. В противоположность этому дыхательные органы мышей или хорьков, являющиеся средой для размножения вируса, пассивируемого на животных, часто загрязнены не только различными сапрофитами, но и патогенными



микробами. Таким образом куриный эмбрион можно рассматривать, как питательную среду на которой размножается только инокулированный вирус.

Мы использовали личные культуры вируса в качестве вакцины для активной иммунизации людей и животных против гриппа.

В опыте на мышах мы проверили эффективность интраназальной и внутрибрюшинной вакцинации живыми культурами вируса. При этом вакцины, приготовленные из яичных культур вируса, сравнивались с вакцинами, приготовленными из легких мышей, инфицированных вирусом.

Интраназальная вакцинация привела к отрицательному результату из-за большой чувствительности мышей к живому вирусу. С профилактической целью удавалось ввести мышам интраназально только ничтожные дозы живого вируса. Мы успешно иммунизировали мышей против 100 ДЛМ вируса методом внутрибрюшинного введения больших количеств живого антигена.

В опыте активной иммунизации мышей яичный и мышный вирусы оказались равноценными.

В виду того, что человек не чувствителен к интраназальному введению живого вируса мы сделали попытку вакцинировать этим методом людей против гриппа. Опыт активной иммунизации людей дал отрицательный результат в условиях естественной эпидемии гриппа.

Последним этапом нашей работы было приготовление иммунных противогриппозных сывороток на кроликах и лошадях.

Мы получили на кроликах иммунные сыворотки, которые в начальном периоде иммунизации обладали некоторой специфич-

ностью против отдельных штаммов вируса. При повторном введении антигена наблюдалось значительное нарастание антител, нейтрализующих вирус.

После благоприятных результатов опыта на кроликах мы приступили к иммунизации лошадей. При этом мы сравнивали эффективность иммунизации яичным и мышинным вирусами гриппа.

Мы получили сыворотку, титр которой был значительно выше того, который являлся допустимым для ее применения с целью терапии и профилактики.

Результаты приведенных опытов обязывают нас сделать следующие выводы:

В Н В О Д Н.

1. Во время двух вспышек гриппа был выделен на мышах 11 штамм вируса от больных людей. Во внеэпидемический период было выделено на куриных эмбрионах еще 6 штаммов вируса.

2. Из 21 штамма вирусов, выделенных от больных гриппом, 15 штаммов были идентифицированы с вирусом инфлюэнцы типа А. Идентификация проводилась на основании опыта нейтрализации этих вирусов противогриппозной лошадиной сывороткой.

Остальные 6 штаммов вирусов не вступали в реакцию нейтрализации с этой сывороткой. Еще 6 вирусов, выделенных во внеэпидемическое время, были идентифицированы с вирусом инфлюэнцы типа А.

3. На примере эпидемии гриппа 1941 года была отмечена преимущественная выделяемость вируса в начале вспышки.

4. Вирус, выделенный любым способом и адаптированный к мышам, легко культивировался на куриных эмбрионах. После продолжительного культивирования на яйцах вирус сохранял свою способность нейтрализоваться иммунной сывороткой, приготовленной против мышинных культур.

5. Изучая распределение вируса в различных тканях оплодотворенного яйца мы нашли, что наиболее богаты вирусом ткани, прилегающие к зародышу. В наименьшей концентрации вирус содержался в белке.

Практически целое оплодотворенное яйцо, зараженное вирусом, после непродолжительной инкубации являлось культурой вируса.

6. Вирус, инокулированный в неоплодотворенные яйца не размножался в них. В некоторых случаях мы наблюдали переживание вируса в неоплодотворенных яйцах.

7. Наиболее благоприятной средой для размножения вируса гриппа являлись оплодотворенные яйца, содержавшие зародыш в возрасте от 3 до 12 дней.

8. Активность яичных культур вируса гриппа зависела от оптимальных сроков инкубации зараженных яиц. Наиболее активными были яичные культуры, инкубированные в течение 3-4 дней.

9. Яичные культуры устойчивы к замораживанию и высушиванию в условиях вакуума.

10. Вирус, культивированный на курином эмбрионе и в легочной ткани зараженных мышей, может служить антигеном для иммунизации животных.

11. Вакцины, приготовленные из живых яичных и мышечных культур вируса, оказались одинаково эффективны<sup>ми</sup> в опыте на мышах. При внутрибрюшинном введении достаточных доз вируса вакцинированные мыши обнаружили наличие перекрестного иммунитета против 100 ДЛМ обоих вирусов.

12. Интраназальная вакцинация мышей живым вирусом гриппа возможна при условии введения этим путем ничтожных доз вируса. Такой способ вакцинации оказался не эффективным против последующего заражения массивными дозами вируса.

13. При интраназальном введении людям живого личного вируса в количестве 2000 доз смертельных для мыши не было обнаружено признаков инфекции.

14. Интраназальная вакцинация людей живым яичным вирусом гриппа оказалась неэффективной в условиях эпидемии.

15. Иммунизация не чувствительных к гриппу животных велела к накоплению в их сыворотках антител, способных нейтрализовать вирус.

16. С целью определения активности иммунных противогриппозных сывороток была выработана методика титрования этих сывороток. Качество иммунных сывороток оценивалось по способности 1 см<sup>3</sup> сыворотки нейтрализовать определенное количество ДМ вируса.

17. При иммунизации кроликов яичными и мышинными культурами вируса были получены иммунные сыворотки, способные обезвреживать вирус.

18. С целью получения гипериммунных сывороток производилась иммунизация лошадей яичными и мышинными культурами вируса. При иммунизации обоими видами антигена были получены сыворотки высокого титра..

19. Не уступая по антигенности мышинному личный антиген оказался менее реактивным.

20. Предстоит большая работа по изучению и усовершенствованию методики выделения вирусов от больных гриппом.

Особенный интерес представляют случаи заболевания во вне-эпидемическое время с точки зрения этиологической роли вируса при спорадическом гриппе, как возможном резервуаре вируса в межэпидемические периоды.

Остались не разрешенными вопросы о единстве или множественности возбудителей гриппа, о причинах его возникновения в пандемической, эпидемической или эндемической формах.

-----

ЛИТЕРАТУРНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ.

1. АГАПОВ. О патогенных свойствах вирусов инфлюэнцы свиней и человека. ММЭИ 1936, 17, 4, 543.
2. АГАПОВ. К эпизоотологии и эпидемиологии инфлюэнцы свиней и гриппа человека. ММЭИ 1937, 18, 3, 478.
3. БЕРДЯЕ. Определитель микробов. 1936 г.
4. ГАМАЛЕН Н.Ф. О предупреждении гриппа. Доклад в Биологическом отделении АН СССР. 1940 г.
5. ГАМАЛЕН Н.Ф. Теоретические основы мыльной профилактики гриппа. Доклад на конференции Вирусологического сектора ЦИЭИ. 1941 г.
6. ГАМАЛЕН Н.Ф. Грипп и борьба с ним. Изд. Акад. Наук, 1941 г.
7. ГЛИНЧИКОВ В.И. Эпидемический грипп. Курс инфекционных болезней. Под ред. Златогорова и Плечнева. 1932 г.
8. ГЛИНЧИКОВ В.И. Эпидемический грипп. Курс инфекционных болезней. При участии Аркавина, Аствацатурова и др. 1938 г.
9. ДМИТРИЕВ С.Ф. Очерк современной методики исследования фильтрующихся вирусов. 1937 г. Биомедгиз.
10. ДРОВИШЕВИКА А.И. К этиологии сезонного /мезо-эпидемического, спорадического/ гриппа. Тезисы докладов Всес. конф. микр., эпид. и инфекц. Москва, 1939 г.
11. ЗЕНТЕНОВ Н.А. Культивирование вируса эпидемического гриппа на курином эмбрионе. Арх.биол.наук 1940 г.
12. КОЗОВАН. Материалы о фильтрующемся вирусе гриппозных вспышек в Киеве и восприимчивости некоторых видов животных к экспериментальному гриппу. Тезисы докладов Всес. конф. микр., эпидем. и инфекционных. Москва, 1939 г.
13. ЛЕЧАЗЬ, КОРИЗНОВА и БОРУ. Оценка лечебного действия ингаляций противогриппозной иммуносыворотки при эпидемическом гриппе. Арх. биол. наук 1938, 52, I, 155.
14. ОСТРОВСКАЯ, ЧАЛКИНА и ОЛЕХНИВИЧ. Устойчивость вируса гриппа к различным физическим и химическим агентам. Арх. биол. наук. 1938, 52, I, 19.



15. СМОРОДИНЦЕВ А.А. Проблема этиологии и специфической профилактики эпидемического гриппа в свете новейших данных. Арх. биол. наук 1938, 52, 1, 3.

16. СМОРОДИНЦЕВ А.А. Этиология, патогенез, специфическая профилактика и терапия эпидемического гриппа. Тезисы докладов Всес. конф. микр., эпидем. и инфекц. Москва, 1939 г.

17. СМОРОДИНЦЕВ А.А., ГУЛАНОВ А.Г. и ЧАЛКИНА О.Н. Этиология гриппа и сезонных катарров дыхательных путей. Тезисы доклада в Комитете по борьбе с гриппом Ученого Медицинского Совета НКЗ РСФСР, 1941 г.

18. СМОРОДИНЦЕВ А.А., ОСТРОВСКАЯ и ДРОБЛЕВСКАЯ. Распределение вируса инфлюэнцы в организме восприимчивых животных. Арх. биол. наук 1938, 52, 1, 46.

19. СМОРОДИНЦЕВ А.А. и ШИШКИНА О.Н. Экспериментальный анализ профилактического и лечебного действия гриппозной иммунсыворотки на вирусную инфекцию мышей при различных способах ее инкуляции. Арх. биол. наук 1938, 52, 1, 132.

20. СМОРОДИНЦЕВ А.А. и ШИШКИНА О.Н. Современные данные по иммунологии гриппа. Тезисы докл. в Ком. по борьбе с гриппом Уч. Мед. Сов. НКЗ РСФСР. 1941 г.

21. ТИШЧЕНСКИЙ. О клинике и номенклатуре гриппа. Тезисы докладов Всес. конф. микроб., эпидем. и инфекц. Москва, 1939 г.

22. ЗАЛКОВИЧ Л.И. Профилактика и терапия гриппа в свете новейших данных. Докл. в Ком. по борьбе с гр. Уч. Мед. Сов. НКЗ РСФСР. 1941 г.

23. ЗАЛКОВИЧ Л.И. и АРХИНА. Изучение вируса эпидемического гриппа. Сообщение I. О методе выделения вируса гриппа из организма человека. ЗМОН 1937, 18, 4, 554.

24. ЗАЛКОВИЧ Л.И. и АРХИНА. Изучение вируса эпидемического гриппа. Сообщение II. Экспериментальная иммунизация мышей вирусом гриппа. Тр. Моск. обл. На-та инфек. болезней им. Мечникова 1939 г.

25. ЗАЛКОВИЧ, ИСАТОВА, ПИСКУНОВА и АРХИНА. Изучение вируса эпидемического гриппа. Сообщение III. Опыт вакцинации людей вирусом гриппа. Тр. Моск. обл. На-та инфекц. бол. им. Мечникова 1939 г.

26. ПАХМАЛИНОВА Э. А. и БАУЕР Е.Н. О культивировании вируса гриппа. Предварительное сообщение. ЗМОН 1936, 17, 4, 548.

27. НАХМАЛИЕВА Э.К. Опыт иммунизации лошадей гриппозным вирусом. Научные работы ЦИОМ. Москва, 1941 г.

28. ШИШКИНА О.И. Экспериментальные материалы к оценке эффективности различных методов активной иммунизации против вирусной гриппозной инфекции мышей. Арх. биол. наук 1938, 52, 1, 108.

29. ЧАЛКИНА О.М. Иммунологические изменения в крови людей, вакцинированных вирусом гриппа. Архив биол. наук 1938, 52, 1, 126.

30. ADAMS J. Primary virus pneumonia with cytoplasmic inclusion bodies. Study of an epidemic involving thirty - two infants with nine deaths. J. am. med. Ass. 1941, 119, 10, 225.

31. ANDREWES. Influenza. Four years progress. Brit. med. J. 1937, 11, 513.

32. ANDREWES, LAIDLAW a. SMITH. The susceptibility of mice to the viruses of human and swine influenza. Lancet, 1934, 959.

33. ANDREWES, LAIDLAW a. SMITH. Influenza: Observation on the recovery of virus from man and swine on the antibody content of human sera. Brit. J. exp. Path. 1935, 18, 6, 566.

34. ANDREWES a. SMITH. Influenza: Further experiments on the active immunization of mice. Brit. J. exp. path. 1937, 18, 1, 48.

35. ANDREWES a. SMITH. The effect of foreign tissue extracts on the efficacy of influenza virus vaccines. Brit. J. exp. Path. 1939, 20, 4, 305.

36. BAENR a. LOEWE. Arch. intern. med. 1923, 30, 307. Цитир. по Scott.

37. BENDA. Цитир. по Schmidt u. Kairies.

38. BIJL a. DOMMISE. Ned. Tijdsch. hyg. 1936, 3, 2. Цитир. по Stuart-Harris, Andrewes a. Smith, 1938.

39. BRANHAM. J. inf. Dis. 1927, 41, 203. Цитир. по Scott.

40. BRIGHTMAN a. TRASK. Am. J. Dis. Child. 1939, 62, 6 - 7. Цитир. по Stuart-Harris, Andrewes a. Smith, 1938.

41. BURNET. Influenza virus on the developing egg. I Changes associated with the development of an egg - passage strain of virus. Brit. J. exp. path. 1936, 17, 4, 222.

42. BURNET. Influenza virus on the developing egg: IV. The pathogenicity and immunizing power of egg virus for ferrets and mice. Brit. J. exp. Path. 1937, 18, 1.

43. BURNET. Med. J. Austr. 1936, 2, 651. Цит. по Stuart-Harris, Andrewes a. Smith 1938.

44. BURNET. Distribution of the human influenza virus in the tissues and fluids of the developing chick embryo. Brit. J. exp. Path. 1940, 21, 147.

45. BURNET a. LUSH. Influenza virus on the developing egg: VII the antibodies of experimental and human sera. Brit. J. exp. Path. 1938, 19, 1, 17.

46. BURNET, LUSH a. Jackson. Brit. J. exp. Path. 1939, 20, 377.

47. CLAMPIE a. GORDON. Recovery of influenza virus from the Chicago epidemic. Proc. S. exp. Biol. a. Med. 1937, 36, 747.

48. CUNHA, MAGALHAES, FONSECA. Memorias Instituto O. Cruz 1918 Dec. Цитир. по Dujarric de la Riviere.

49. DETTWILLER, HUDSON a. WOOLPERT. Influence of age on the susceptibility of the guinea pig to the virus of epidemic influenza. J. Bact. 1940, 39, 1, 54.

50. DIETRICH. Цитир. по Schmidt u. Kairies.

51. DOCHEZ, MILLS a. KNEELAND. Study of the virus of the common cold and its cultivation in tissue medium. Proc. Soc. exp. Biol. a. Med. 1930-31, 28, 513.

52. DOCHEZ, MILLS a. KNEELAND. Studies on the common cold. VI Cultivation of the virus in tissue medium. J. exp. Med. 1936, 63, 4, 559.

53. DOCHEZ, MILLS a. KNEELAND. Studies on the etiology of influenza Proc. S. exp. Biol. a. Med. 1932-33, 30, 101.

54. DOCHEZ, MILLS a. KNEELAND. A study of the etiology of influenza. Proc. soc. exp. Biol. a. Med. 1934, 32, 406.

55. DOCHEZ, MILLS a. KNEELAND. Studies on the virus of influenza. J. exp. Med. 1936, 32, 581.

56. DOCHEZ, MILLS a. MULLIKEN. A virus disease of swiss mice transmissible by intranasal inoculation. Proc. S. exp. B. a. Med. 1937, 36, 5, 683.

57. DOCHEZ, SHIBLEY a. MILLS. Proc. S. exp. Biol. a. Med. 1929, 26, 562.

58. DOCHEZ, SHIBLEY a. MILLS. Studies on the common cold. IV. Experimental transmission of the common cold to antropoid apes and human beings by means of a filtrable agent. J. exp. Med. 1930, 52, 5, 701.

59. DOPFER. La grippe. Epidemiologie. 1925, v. 19, p. 520.

60. DORSET, MC BRYDE a. NILES. Цитир. по Laidlaw.

61. DUJARRIC de la RIVIÈRE. Etiologie et prophylaxie de la grippe. 1929.

62. DUJARRIC de la RIVIÈRE et CHEVE. Bull. Acad. Med. 1937, 117, 183. Цитир. по Stuart-Harris, Andrews a. Smith. 1938.

63. DUNKIN a. LAIDLAW. Studies in dog-distemper. I Dog-distemper in the ferret. J. comp. Path. a. Ther. 1928, 39, 201. Цитир. по Scott u Naagen u. Mauer.

64. EATON a. BECK. Experimental immunization of mice with the virus of epidemic influenza. I Quantitative studies on the antigenicity of active and inactive virus. J. Immunol. 1940, 39, 1, 43.

65. EATON a. BECK. Experimental immunization of mice with the virus of epidemic influenza. II. Immunity after intranasal inoculation of mouse-passage, tissue-culture and ferret-passage strains. J. Immunol. 1940, 39, 1, 57.

66. EATON M. Transmission of epidemic influenza virus in mice by contact. J. Bact. 1940, 39, 3, 229.

67. ELFORD, ANDREWES a. TANG. The sizes of the viruses of human and swine influenza as determined by ultrafiltration. J. exp. Path. 1936, 17, 1, 51.

68. ELKELES. Experimentelle Untersuchungen zur Ätiologie der Influenza. Med. Inst. praev. Geneesk. 1934, 30. Цитир. по Shope a. Francis, 1936.

69. FEJES. Die Ätiologie der Influenza. Dtsch. med. Wschr. 1919, 653. Цитир. по Naagen u. Mauer.

70. FOSTER. A study on the etiology of the common cold. J. inf. Dis. 1917, 21, 451.

71. FRANCIS. Recent advances in the study of influenza. 1935, 106, 251.

72. FRANCIS. Epidemiological studies in influenza. Am. J. publ. Health 1937, 27, 211.

73. FRANCIS. Quantitative relationships between the immunizing doses of epidemic influenza virus and the resultant immunity. J. exp. Med. 1938, 69, 2, 283.

74. FRANCIS. Inactivation of epidemic influenza virus by nasal secretions of human individuals. J. Bact. 1940, 39, 1, 54.

75. FRANCIS. Differentiation of influenza A and influenza B by the complement fixate reaction. Proc. S. exp. Biol. a. Med. 1940, 45, 3, 361.

76. FRANCIS. The new type of virus from epidemic influenza. Science 1940, 91, 2392, 92.

77. FRANCIS a. MAGILL. Immunological studies with the virus of influenza. J. exp. Med. 1935, 62, 4, 505.

78. FRANCIS a. MAGILL. Cultivation of human influenza virus in an artificial medium. Science 1935, 82, 353.

79. FRANCIS a. MAGILL. Vaccination of human subjects with virus of human influenza. Proc. S. exp. B. a. M. 1935/36, 33, 304.

80. FRANCIS a. MAGILL. The incidence of neutralizing antibodies for swine influenza virus in the sera of human beings of different ages. J. exp. med. 1936, 63, 655.

81. FRANCIS a. MAGILL. The antibody response of human subjects vaccinated with the virus of human influenza. J. exp. med. 1937, 65, 251.

82. FRANCIS a. MAGILL. Direct transmission of human influenza virus to mice. Proc. S. exp. B. a. M. 1937, 36, 2, 132.

83. FRANCIS a. MAGILL. Direct isolation of human influenza virus in tissue culture medium and on egg membrane. Proc. S. exp. B. a. M. 1937, 36, 2, 134.

84. FRANCIS a. MAGILL. Antigenic differences in strains of epidemic influenza virus: II. cross - immunization tests in mice. Brit. J. exp. Path. 1938, 19, 5, 284.

85. FRANCIS a. SHOPE. Neutralization tests with sera of convalescent or immunized animals and the viruses of swine and human influenza. J. exp. Med. 1938, 63, 5, 640.

86. FRANCIS, MAGILL, RECH a. RICKARD. Studies with human influenza virus during the influenza epidemic of 1936/37. J. Amer. med. Ass. 1937, 109, 566.

87. FRANCIS, MAGILL, RICKARD a. BECK. Etiological and serological studies in epidemic influenza. Am. J. publ. Health 1937, 27, 1141.

88. FRIEDBERGER u. KONITZER. med. Klinik 1919, 15, 108. Цитир. по Dujarric de la Riviere.

89. FRIEDMANN. Цитир. по Schmidt u. Kairies.

90. GIBSON, BOWMAN a. CONNOR. A filtrable virus as the cause of early stage of the present epidemic of influenza. Brit. med. J. 1918, 643. Цитир. по Duj. de la Riv.

91. GORDON, FREEMAN a. CLAMPIT. A pneumonia - producing filtrable agent from stock mice. Pros. S. exp. B. a. M. 1937, 37, 10, 512.

92. GOTSCHLICH. Цитир. по Schmidt u. Kairies.

93. GRANTZ. Die Aetiologie der Influenzaepidemie von 1918. Münch. med. wscrh. 1919, 28.

94. GREENWOOD. Influenza. Epidemics and crowd-diseases. 1935, 12, 820. London.

95. GUIRE MAC a. REDDEN. J. am. med. Ass. 1919, 72, 709. Цитир. по Laidlaw, Smith, Andrewes a. Dun-kin.

96. HAAGEN u. MAUER. Influenza. Handbuch der Viruskrankheiten von Gildemeister, Haagen u. Waldmann 1929 Band II.

97. HARE R. Fluctuations in the titer of neutralizing antibody for influenza virus in human beings. J. Bact. 1940, 39, 1, 52.

98. HARE R. The effect of passive immunization on experimental virus influenza in mice. J. Path. a. Bact. 1939, 49, 2, 411.

99. HERZBERG. Untersuchungen über Influenza. III Mitteilung. Darstellung des filtrierbaren Pneumonie - Erregers. Zbl. Bakt. I Orig. 1940, 146, 177.

100. HERZBERG u. GROSS. Untersuchungen über Influenza. II Mitteilung. Isolierung eines filtrierbaren Pneumonie - Erregers durch den Mäuseversuch. Zbl. Bakt. I. 1940, 146, 129.

101. HIRSCHBERG. Цитир. по Haagen u. Mauer.

102. HORSFALL F. Present status of Knowledge concerning Influenza. Am. J. publ. Health. 1940, 30, 11, 1303.

103. HORSFALL a. LENNETTE. The reinfection of ferrets convalescent from influenza. J. Bact. 1940, 31, 1, 56.

104. HORSFALL, LENNETTE a. RICKARD. A complex vaccine against influenza A virus. Quantitative analysis of the antibody response produced in man. J. exp. Med. 1941, 72, 325.

105. HORSFALL, LENNETTE, RICKARD and ANDREWES, SMITH a. STUART-HARRIS. A new nomenclature of influenza. Lancet 1940, 412, 6110.

106. HOTTINGER. Цитир. по Scott.

107. HOYLE a. FAIRBROTHER. Brit. med. J. 1937, 1, 665. Цитир. по Stuart-Harris, Andrewes a. Smith 1938.

108. HYDE a. CHAPMAN. The behaviour of certain filterable agents from cases of colds and influenza isolated directly from man to chick membrane. Am. J. Hyg. 1937, 26, 1, 116.

109. INTOSH MAC. Lancet 1918 11, 665. Цитир. по Dujarric de la Rivière.

110. INTOSH MAC a. SELBIE. The pathogenicity to animals of viruses isolated from cases of human influenza. Brit. J. exp. Path. 1937, 18, 4, 334.

111. ISCHIWARA. Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 1923, 90, 55. Цитир. по Scott.

112. KNEELAND, MILLS a. DOCHEZ. Cultivation of the virus of the common cold in the chorio-allantoic membrane of the chick embryo. Proc. S. exp. B. a. M. 1936, 35, 2, 213.

113. KÜBE. Цитир. по Haagen u. Mauer.

114. KOLLE. Цитир. по Schmidt u. Kairies.

115. KOEN. Цитир. по Laidlaw.

116. KRUSE. Die Erreger von Husten und Schnupfen. Münch. med. Wschr. 1914, 1547. Цитир. по Foster.

117. LAIDLAW. Epidemic influenza: A virus disease. Lancet. 1935, 1, 19, 1118.

118. LAIDLAW, SMITH, ANDREWES a. DUNKIN. Influenza: The preparation of immune sera in horses. Brit. J. exp. Path. 1935, 16, 3, 275.



119. LESCKE. Untersuchungen zur Ätiologie der grippe. Berl. klin. Wschr. 1919, II. Цит. по Haagen u. Mauer.

120. LEVINTHAL. Цитир. по Schmidt u. Kairies.

121. LI a. RIVERS. J. exp. Med. 1920, 52, 465. Цитир. по Dochez, Mills a. Kneeland.

122. LISTER a. TAYLOR. Experimental investigation of epidemic influenza at Durban. Publ. S. afric. Inst. med. Res. 9, 1919. Цитир. по Haagen u. Mauer.

123. LÖRWE a. ZEMAN. J. am. med. ass. 1921, 76, 686. Цитир. по Scott.

124. LONG a. DOULL. Etiologie of acute upper respiratory infection (common cold). Proc. S. exp. B. a. M. 1930, 28, 53.

125. LUBARSCHE. Цитир. по Schmidt u. Kairies.

126. MAGILL a. FRANCIS. The action of immune serum on human influenza virus in vitro. J. exp. Med. 1937, 65, 861.

127. MAGILL a. FRANCIS. The antibody response of human subjects vaccinated with the virus of human influenza. J. exp. Med. 1937, 65, 251.

128. MAGILL a. FRANCIS. Antigenic differences in strains of human influenza virus. Proc. S. exp. B. a. M. 1936, 35, 3, 423.

129. MAGILL a. FRANCIS. Antigenic differences in strains of epidemic influenz-virus: I Cross - neutralizing tests in mice. Brit. J. exp. Path. 1938, 19, 5, 273.

130. MAITLAND a. MAITLAND. Lancet 1928, 2, 396. Цитир. по Dochez, Mills a. Kneeland.

131. MOORE a. FRANCIS. Neurotropic influenza virus. J. Bact. 1940, 39, 1, 64.

132. MULDER. The influenza epidemic of february - march 1939 in the garrison at Groningen. Zbl. Bact. Ref. 1941, 139, 7/8. Acta med. Scand. 1940, 104, 481.

133. MULDER, van den BERG en van KOLLEN. De influenza epidemic van Februari - maart in het garnizoen te Groningen. II (bacteriologie). Zbl. Bact. Ref. 1941, 139, 7/8. Nederl. Tydsch. Geneesk. 1940, 84, 1, 214.

134. NAKAJIMA. Sci. Rep. Gov. Inst. Infect. Dis. 1923, 2, 125. Цитир. по Scott.

135. NICOLLE et LEBAILLY. Цит. по Dujarric de la Riviere.

136. NIGG C., WILSON D. & CROWLEY J. Studies on the cultivation of influenza virus. Am. J. of Hyg. 1941. 34, 3, 132.

137. NOBLE A. BRAINARD. A note on the susceptibility of ferrets to the virus of the common cold. J. bact. 1935, 28, 4, 407.

138. OAKLEY A. WARRACK. Immunity and antibody to influenza in mice. J. Path. & Bact. 1940, 50, 1, 37.

139. OELLER. Zur Ätiologie der Influenza. med. klin. 1919, 1933. Цитир. по Naagen u. Mauer.

140. OLITSKY A. GATES. Experimental studies of the nasopharyngeal secretions from influenza patients I. Transmission experiments with nasopharyngeal washings. J. exp. med. 1921, 33, 125. Цитир. по Naagen u. Mauer (81).

141. OLITSKY A. GATES. II. Filterability and resistance to glycerol. J. exp. med. 1921, 33, 261. Цитир. по Naagen u. Mauer (81).

142. OLITSKY A. GATES. III. Studies on the concurrent infections. J. exp. med. 1921, 33, 373. Цит. по Naagen u. Mauer (81).

143. OLITSKY A. GATES. IV. Anaerobic cultivation. J. exp. med. 1921, 33, 712. Цитир. по Naagen u. Mauer (81).

144. OLITSKY A. GATES. V. Bact. pneumosintes and concurrent infections. J. exp. med. 1921, 34, 1. Цит. по Naagen u. Mauer (81).

145. OLITSKY A. GATES. VI. Immunity reactions. J. exp. med. 1922, 35, 1. Цит. по Naagen u. Mauer (81).

146. OLITSKY A. GATES. VII. Serological reactions. J. exp. med. 1922, 35, 553.

147. OLITSKY A. GATES. VIII. The recurrence of 1922. J. exp. med. 1923, 36, 501. Цит. по Naagen u. Mauer (81).

148. OLITSKY A. GATES. IX. The immunizing effects in rabbits of subcutaneous infections of killed cultures of B. pneumosintes. J. exp. med. 1923, 36, 685.

149. OLITSKY A. GATES. X. Antibodies in the blood after recovery from epidemic influenza. J. exp. med. 1923, 37, 303.

150. OLITSKY a. GATES. XI. The effects of subcutaneous infections of vaccines of b. pneumosintes in man. J. exp. med. 1923, 37, 471. Цит. по Haagen u. Mauer (91).

151. OLITSKY a. MAK CARTNEY. J. exp. med. 1923, 38, 427. Цит. по Scott.

152. PFEIFFER. Цит. по Duj. de la Riviere.

153. PFEIFFER. Deutsch. med. Wschr. 1926, 51, 10. Цитир. по Scott.

154. PLESSCH. Über die pandemische Grippe. Z. ärztzl. Fortbild. 1919, 7.

155. PREIN. Zur Influenzaepidemie 1918 auf Grund bacteriologischer, pathologisch - anatomischer und epidemiologischer Beobachtungen. Zbl. f. Hyg. 1920, 90, 65.

156. RICKARD a. FRANCIS. The demonstration of lesions and virus in the lungs of mice receiving large intraperitoneal inoculations of epidemic influenza virus. J. exp. med. 1930, 27, 3, 553.

157. ROSENAU. J. Am. med. Ass. 1919, 73, 311. Цит. по Haagen u. Mauer.

158. ROUX. Цит. по Duj. de la Rivière.

159. SAHLI. Über die Influenza. Korresp. bl. Schweiz. Ärzte. 1919, 1, 193.

160. SCHAEFFER a. LEIDER. Daily fluctuations in antibodies neutralizing influenza virus. J. Bact. 1940, 39, 1, 153.

161. SCHMIDT. Цит. по SCHMIDT u. KAIRIES.

162. SCHMIDT u. JENTSCH. Z. Hyg. Infect. Kr. 1922, 98, 123. Цит. по Scott.

163. SCHMIDT u. KAIRIES. Neue studien zum Problem der Influenza bei Mensch und Tier. 1936.

164. SCHMÖRL. Цит. по Schmidt u. Kairies.

165. SCHOTTMÜLLER. Zur Aetiologie der Influenza. Dtsch. med. Wschr. 1919, 795. Цит. по Schmidt u. Kairies.

166. SCHÜRMANN. Цит. по Schmidt u. Kairies.

167. SCOTT. The influenza group of bacteria. The "filter-passer" hypothesis. A system of bacteriology in relation to medicine. London 1929, v. II, 326.

168. SHOPE. Swine influenza. I. Experimental transmission and pathologie. J. exp. Med. 1931, 54, 349.

169. SHOPE. The infection of ferrets with swine influenza virus. J. exp. Med. 1934, 60, 49.

170. SHOPE. Immunization experiments with swine influenza virus. J. exp. Med. 1936, 64, 1, 47.

171. SHOPE. The incidence of neutralizing antibodies for swine influenza virus in the sera of human beings of different ages. J. exp. Med. 1936, 62, 669.

172. SHOPE a. FRANCIS. The susceptibility of swine to the virus of human influenza. J. exp. Med. 1936, 64, 5, 791.

173. SELTER. Zur Aetiologie der Influenza. Dsch. med. Wachr. 1918, 932. ЦИТ. ПО Dujarric de la Rivier.

174. SMITH W. Cultivation of the virus of influenza. Brit. J. exp. Path. 1935, 16, 6, 509.

175. SMITH W. The complement - fixation reaction in influenza. Lancet 1936, 2, 12563

176. SMITH a. ANDREWES. Serological races of influenza virus. Brit. J. exp. Path. 1938, 19, 5, 293.

177. SMITH, ANDREWES a. LAIDLAW. A virus from influenza patients. Lancet, 1933, 2, 66.

178. SMITH, ANDREWES a. LAIDLAW. Influenza: Experiments on the immunization of ferrets and mice. Brit. J. exp. Path. 1936, 16, 291.

179. SMITH, and STUART-HARRIS. Influenza infection in man from the ferret. Lancet, 1936, 121.

180. STOCK a. FRANCIS. The inactivation of the virus of epidemic influenza by soaps. J. exp. Med. 1940, 71, 5, 661.

181. STOKES, Mc GUINESS, LANGNER a. SHAW. Vaccination against epidemic influenza (a two years study). Am. J. med. Sci. 1937, 194, 739. ЦИТ. ПО Haagen u. Mauer.

182. STOKES, CHENOWETH, WALTZ, GLADEN a. SHAW. Results of immunization by means of active virus of human influenza. J. clin. Invest. 1937, 16, 237.

183. STUART-HARRIS. The transmission of influenza virus to hedgehogs. Brit. J. exp. Path. 1936, 17, 324.

194. STUART-BARRIS. J. Path. Bact. 1935, 22, 1, 161.  
Цитир. по Moore a. Francis.

195. STUART-BARRIS, ANDREWS a. SMITH. A study of epidemic influenza with special reference to the 1926-27 epidemic. Medical research council. 1939, № 228.

196. TANG. The transmission of influenza virus "WS" to the chinese mink and the David's squirrel. Brit. J. exp. Path. 1939, 19, 179.

197. THOMSON D. a. THOMSON R. Influenza. 1934, 16, 1. An. Pickett-Thomson. Research Laborat. Monography.

198. TSURUMI a. OGASAWARA. Studies on influenza virus. A minute corpuscle in lung lesion of mice infected by influenza virus. Zbl. Bact. Bf. 1941, 199, 7/8. Jap. J. med. Sci. Bacter. 1940, 1, 158.

199. UNLENNHUT. Цитир. по Schmidt u. Kairies.

200. WANL, WHITE a. LYALL. Some experiments on the transmission of influenza. J. inf. Dis. 1919, 26, 419.

201. WASSERMANN. Deutsch med. Wschr. 1900, 26, 446. Цит. по Scott.

202. WEIR a. NORSEFALL. The recovery from patients with acute pneumonitis of a virus causing pneumonia in the mongoose. J. exp. Med. 1940, 72, 595.

203. WOODRUFF a. GOODPASTURE. Am. J. of. Path. 1931, 7, 209. Цитир. по Burnet.

204. JAMANOUCI, IWASHINA a. SAKAKAMI. Etude sur la grippe epidemique. C. R. Acad. de Sci. 1919, Juin. Цитир. по Dujarric de la Riviere.

-----  
-----