

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ОРЕНБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1. Б.18. Вирусология

Направление подготовки 06.03.01 Биология

Профиль образовательной программы «Биоэкология»

Форма обучения очная

СОДЕРЖАНИЕ		
1.	Конспект лекций	3
1.1	Лекция № 1 Введение в вирусологию	3
1.2	Лекция № 2 Физическая структура и химический состав вирусов	5
1.3	Лекция № 3 Репродукция вирусов	7
1.4	Лекция № 4 Репродукция вирусов	11
1.5	Лекция № 5 Принципы систематики вирусов. Характеристика ДНК-содержащих вирусов	13
1.6.	Лекция № 6 Характеристика ДНК-содержащих вирусов	17
1.7	Лекция № 7 Характеристика РНК-содержащих вирусов	19
1.8	Лекция № 8 Характеристика РНК-содержащих вирусов	21
1.9	Лекция № 9 Бактериофаги	23
2	Методические указания по выполнению лабораторных работ	27
2.1.	Лабораторная работа № ЛР-1 Правила работы с вирусодержащим материалом. Учет и хранение вирусов в лаборатории.	27
2.2.	Лабораторная работа № ЛР-2 Правила получения и транспортировки вирусодержащего материала. Методы консервирования	29
2.3	Лабораторная работа № ЛР-3 Действие на вирусы физических и химических факторов.	31
2.4	Лабораторная работа № ЛР-4 Методы диагностики вирусных болезней	33
2.5	Лабораторная работа № ЛР-5 Индикация вирусов в патматериале путем обнаружения вирионов и телец-включений	37
2.6	Лабораторная работа № ЛР-6 Использование лабораторных животных в вирусологии	40
2.7	Лабораторная работа № ЛР-7 Использование куриных эмбрионов в вирусологической практике	41
2.8	Лабораторная работа № ЛР-8 Культуры клеток - характеристика, получение, использование. Растворы и питательные среды для культур клеток	46
2.9	Лабораторная работа № ЛР-9 Индикация вирусов в культуре клеток	50
2.10	Лабораторная работа № ЛР-10 Титрование вирусов	51
2.11	Лабораторная работа № ЛР-11 Методы индикации вирусов в объектах окружающей среды	53
2.12	Лабораторная работа № ЛР-12 Серологические свойства вирусов. Клеточные вирусспецифические антигены. Иммуноглобулины. Реакции антиген-антитело	58
2.13	Лабораторная работа № ЛР-13 Использование в вирусологии РТГА	63
2.14	Лабораторная работа № ЛР-14 Реакция диффузной преципитации в геле. Принцип и техника постановки	65
2.15	Лабораторная работа № ЛР-15 Метод флюоресцирующих анти	67
2.16	Лабораторная работа № ЛР-16 Использование в вирусологии метода иммуноферментного анализа. Принцип, схемы и методика постановки ИФА	71
2.17	Лабораторная работа № ЛР-17 Использование в вирусологии полимеразной цепной реакции. Принцип ПЦР, возможности, достоинства и недостатки	72
2.18	Лабораторная работа № ЛР-18 Метод ДНК-зондов – сущность, постановка	74

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. 1 Лекция № 1. (2 часа).

Тема: «Введение в вирусологию»

1.1.1 Вопросы лекции:

1. История открытия вирусов. Предмет изучения вирусологии. Связь вирусологии с другими науками.
2. Отличие вирусов от других инфекционных агентов. Уникальность вирусов.
3. Свойства вирусов как организмов и как веществ. Определения «вируса».

1.1.2 Краткое содержание вопросов:

1. История открытия вирусов. Предмет изучения вирусологии. Связь вирусологии с другими науками.

Вирусология - наука о вирусах, сверхмикроскопических внутриклеточных паразитах человека, животных, растений, простейших, бактерий, насекомых. Часть открытия вирусов принадлежит русскому ученому Дмитрию Иосифовичу Ивановскому, который впервые в 1892 г. доказал существование нового типа возбудителя инфекционных болезней на примере мозаичной болезни табака.

Предположение о том, что возбудитель имеет корпускулярную природу он делает на основании микроскопического исследования клеток пораженных растений, в которых он постоянно обнаруживает кристаллические включения, т.е. скопления возможных инфекционных корпускул, что подтвердилось с созданием электронного микроскопа. В последующие годы была установлена вирусная этиология ящура - Ф. Леффлер и П. Фрош, 1898 г.; саркомы Рауса - П. Раус, 1911 г. В 1917 г. Ф. д'Эррель открыл вирусы, поражающие бактерий - бактериофаги; Бергольд в 1958 г. - вирусы насекомых; Холменгс в 1962 г. – вирусы грибов; Шнейдер с сотрудниками в 1964 г - вирусы сине-зеленых водорослей; Горлейн в 1971 г. – вирусы микоплазм; Даймонд в 1972 г. – вирусы простейших.

В настоящее время установлено, что вирусы способны поражать все существующие формы жизни на Земле.

Связь вирусологии с другими науками.

В настоящее время вирусология это одна из ведущих биологических наук. Возникнув как ветвь патофизиологии человека и животных с одной стороны и фитопатологии с другой, вирусология в настоящее время представляет собой науку, прогресс которой определяется как требованиями практики, так и логикой внутреннего развития. Она теснейшим образом связана с рядом биологических наук, используя достижения одних и помогая решать проблемы других. Так вирусология тесно связана с микробиологией - общностью методов исследования, и объектов исследования. Вирусология связана с биохимией, химией белков, физической химией – используя методы этих наук для изучения размеров вирусных частиц, их однородности, плотности и т.д. Вирусология связана с молекулярной биологией, используя её методы для изучения субклеточных объектов, структура и организация которых лежит на макромолекулярном уровне. Вирусология связана с генной инженерией, она представила векторы для некоторых генно-инженерных операций. Используя методы молекулярной биологии были установлены молекулярная организация многих вирусов; химический состав вирусных антигенов; были химическим путем синтезированы антигены; созданы вакцины в том числе и синтетические, на основе природных синтетических антигенов и их фракций; изучена роль вирусов в иммунопатологиях; разработаны новые способы диагностики вирусных болезней.

2. Отличие вирусов от других инфекционных агентов. Уникальность вирусов.

Со времени открытия вирусов по настоящее время представления о природе вирусов претерпели значительные изменения.

Д. И. Ивановский и другие исследователи того времени подчеркивали два свойства вирусов, позволившие выделить их из общей массы микроорганизмов: фильтруемость через бактериальные фильтры и неспособность размножаться на всех искусственных питательных средах. Позже выяснилось, что эти свойства не абсолютны, так как были обнаружены фильтрующиеся (L) формы бактерий и микоплазмы, растущие на искусственных питательных средах, по размерам приближающиеся к наиболее крупным вирусам (вирусы оспы человека и животных).

Внутриклеточный паразитизм вирусов также оказался не абсолютным критерием, ограничивающим их от остальных микроорганизмов. Внутриклеточными паразитами являются не только вирусы, но и некоторые бактерии (гонококки, менингококки) и простейшие (малярийный плазмодий). С развитием знаний о вирусах были найдены более надежные критерии, отличающие их от других инфекционных агентов, а именно:

1. Носителем генетической информации у вирусов может быть как ДНК, так и РНК.

2. В состав вирусной частицы входит лишь одна нуклеиновая кислота (либо ДНК, либо РНК).

3. Вирус не имеет своей белоксинтезирующей системы. Он использует белоксинтезирующий аппарат клетки для создания вирусного потомства.

4. Для вирусов не существует понятие «роста» т.е. размеры вируса не меняются.

5. Для вирусов характерна дизъюнктивная (разобщенная) репродукция т.е. синтез составных частей вирусной частицы происходит в разных участках клетки хозяина и затем сборка этих фрагментов в одном месте.

6. Вирус имеет вне клеточную форму существования - вирион.

Вирусы сверхмикроскопичны, линейные размеры вирусов измеряются в нм или в Ангстремах (\AA) $1\text{\AA}=10^{-10} \text{ м}$ (рис.2), а молекулярная масса измеряется в Да尔тонах $1\text{Д}=1,67 \cdot 10^{-24} \text{ г}$.

3. Свойства вирусов как организмов и как веществ. Определения «вируса».

В связи с вышеизложенным не раз возникали дискуссии по поводу того, что же такое вирусы – живое или не живое, организмы или не организмы. Безусловно, вирусы обладают основными свойствами всех других форм жизни – способностью размножаться, наследственностью, изменчивостью, приспособляемостью к условиям внешней среды; они занимают определенную экологическую нишу, на них распространяются законы эволюции органического мира на земле. Поэтому к середине 40-х годов XX века сложилось представление о вирусах как о наиболее простых микроорганизмах. Логическим развитием этих взглядов было введение термина «вирион», обозначавшего внеклеточный вирусный индивидуум. Однако с развитием исследований по молекулярной биологии вирусов стали накапливаться факты, противоречащие представлению о вирусах как организмах.

Отсутствие собственных белоксинтезирующих систем, дизъюнктивный способ репродукции, интеграция с клеточным геномом, существование вирусов сателлитов и дефектных вирусов, феноменов множественной реактивации и комплементации – все это мало укладывается в представление о вирусах как организмах. Представление это еще более теряет смысл, когда мы обратимся к вирусоподобным структурам – плазмидам, вирионам и агентам типа возбудителя скрепи.

Определение С.Лурия: «Вирусы - это объекты, геном которых представлен одной нуклеиновой кислотой ДНК или РНК, эта нуклеиновая кислота реплицируется в живых клетках, и используя их синтетический аппарат, заставляет клетки синтезировать специализированные частицы (вирионы), содержащие геном вируса и способные передавать его в другие клетки. Вирион – это внеклеточная форма вируса».

Таким образом вопрос о том являются ли вирусы объектами живой или неживой природы остается открытым.

1. 2 Лекция №2 (2 часа).

Тема: «Физическая структура и химический состав вирусов »

1.12.1 Вопросы лекции:

1. Архитектура вирусов: а) принципы строения вирусных частиц; б) кубический тип симметрии; в) спиральный тип симметрии.
2. Химический состав вирусов: а) нуклеиновые кислоты – ДНК, РНК;
б) белки: структурные и неструктурные;
в) липиды и углеводы.

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. Архитектура вирусов: а) принципы строения вирусных частиц; б) кубический тип симметрии; в) спиральный тип симметрии.

Изучение строения вирионов привело к заключению, что их формирование подчиняется строгим математическим законам построения пространственных структур – от кристаллов до архитектурных сооружений – законам, основанным на образовании структур с наименьшим уровнем свободной энергии. Обязательным структурным элементом вирусов является капсид – белковая оболочка, окружающая вирусную нуклеиновую кислоту. Простые (простоустроенные) вирусы, такие как пикорнавирусы и парвовирусы, состоят из капсида, окружающего одну молекулу нуклеиновой кислоты. Сложные (сложноустроенные) вирусы имеют еще дополнительную внешнюю оболочку – суперкапсид. Морфологическими субъединицами капсида, видимыми в электронный микроскоп, являются капсомеры. Структурными единицами капсида являются белковые субъединицы, состоящие из одной, или нескольких молекул белка. Структурная единица вируса табачной мозаики состоит из одной молекулы белка, вируса полиомиелита – из четырех молекул белка, вирус оспы состоит более чем 100 структурных белков

Принципы построения вирусных частиц диктуются теми биохимическими свойствами которыми должен обладать вирус для того чтобы удовлетворить требование эффективной и безошибочной сборки при репродукции вируса с одной стороны и регулируемой разборки при проникновении вируса в клетку-хозяина с другой стороны.

Существуют два типа строения капсидов вирионов, которые обеспечивают образование структуры с минимумом свободной энергии - спиральный тип симметрии и кубический тип симметрии. При спиральном типе симметрии капсомеры соединяются с геномом образуя спиралевидную или винтообразную структуру. При кубическом типе симметрии капсомеры соединяются друг с другом в правильные многогранники в центре которого расположен геном. Форма ДНК- и РНК - содержащих вирусов может быть разнообразной: сферической (у вируса ринопневмонии, ящура, болезни Ауески); палочковидной (у вируса бешенства, везикулярного стоматита), кирпичевидной (вируса оспы).

Простоорганизованные вирусы представляют собой нуклеопротеиды или нуклеокапсиды и состоят из нуклеиновой кислоты (РНК или ДНК) и нескольких кодируемых ею белков, формирующих вирусную оболочку вокруг нуклеиновой кислоты – капсид.

Сложноорганизованные вирусы содержат дополнительные оболочки, белковые или липопротеидные, и имеют более сложный химический состав. Помимо нуклеиновой кислоты и белков, они содержат липиды в наружных оболочках и углеводы в составе

белков наружных оболочек (гликопротеидов). Обычно липиды и углеводы имеют клеточное происхождение. В составе некоторых вирусов обнаружаются также клеточные нуклеиновые кислоты и белки.

2. Химический состав вирусов: а) нуклеиновые кислоты – ДНК, РНК; б) белки: структурные и неструктурные; в) липиды и углеводы.

Вирусные нуклеиновые кислоты характеризуются поразительным разнообразием форм. Вирусный геном может быть представлен как однонитчатыми, так и двунитчатыми молекулами РНК и ДНК. ДНК может быть как линейной, так и кольцевой молекулой, РНК – как непрерывной, так и фрагментированной и кольцевой молекулой.

Вирусные ДНК.

Молекулярная масса вирусных ДНК варьирует в широких пределах от 2МД у цирко- и парвовирусов до 375 МД у поксивирусов. В геномах, представленных двунитчатыми ДНК, информация обычно закодирована на обеих нитях ДНК. Это свидетельствует о максимальной экономии генетического материала у вирусов, что является неотъемлемым свойством их, как генетических паразитов. В связи с этим оценка генетической информации не может быть проведена по молекулярной массе молекул.

Вирусные РНК

Из нескольких сотен известных в настоящее время вирусов человека и животных РНК-геном содержит около 80 % вирусов. Способность РНК хранить наследственную информацию является уникальной особенностью вириуса. РНК может обладать инфекционной активностью в зависимости от своей структуры. Структура вирусных РНК чрезвычайно разнообразна. У вирусов обнаружены однонитчатые и двунитчатые, линейные, фрагментированные и кольцевые РНК. РНК-геном в основном является гаплоидным, но геном ретровирусов – диплоидный, т.е. состоит из двух идентичных молекул РНК.

Однонитчатые РНК. Молекулы однонитчатых вирусных РНК существуют в форме одиночной полинуклеотидной цепи со спирализованными ДНК-подобными участками. При этом не комплементарные нуклеотиды, разделяющие комплементарные участки, могут выводиться из состава спирализованных участков в форме различных «петель» и «выступов».

Вирусы, содержащие однонитчатые РНК, делятся на две группы: «плюс-нитевые» вирусы, или вирусы с позитивным геномом и «минус-нитевые» вирусы, или вирусы с негативным геномом.

Существуют вирусы, содержащие как «плюс-нитевые», так и «минус-нитевые» РНК гены (амбисенс-вирусы). К ним относятся аренавирусы.

Двунитчатые РНК. Этот необычный для клетки тип нуклеиновой кислоты, впервые обнаруженный у реовирусов, широко распространен среди вирусов животных, растений и бактерий. Вирусы, содержащие подобный геном, называют «диплорнавирусы».

В зараженной клетке вирусный геном кодирует синтез двух групп белков:

- 1) структурных, которые входят в состав вирусных частиц потомства;
- 2) неструктурных, которые обслуживают процесс внутриклеточной репродукции вируса на разных его этапах, но в состав вирусных частиц не входят.

Структурные белки делятся на 2 большие группы: 1) капсидные белки; 2) суперкапсидные белки.

Неструктурные белки изучены гораздо хуже, чем структурные, поскольку их выделяют не из очищенных препаратов вирусов, а из зараженных клеток, и возникают трудности в их идентификации и очистке от клеточных белков.

К неструктурным белкам относятся:

- 1) предшественники вирусных белков;
- 2) ферменты синтеза РНК и ДНК (РНК- и ДНК-полимеразы), обеспечивающие транскрипцию и репликацию вирусного генома;

- 3) белки-регуляторы;
- 4) ферменты, модифицирующие вирусные белки, например протеиназы и протеинкиназы.

Липиды и углеводы вирусов.

Липиды и углеводы входят в состав суперкапсидной оболочки сложно организованных вирусов. Содержание липидов может быть различно, например у РНК-содержащих вирусов они составляют от 15 до 35 % от сухого веса. Из РНК-содержащих вирусов суперкапсидную оболочку имеют : ортомиксовирусы, парамиксовирусы, рабдовирусы, тогавирусы, ретровирусы, буньявирусы, аренавирусы, коронавирусы.

Из ДНК-содержащих вирусов липиды содержат вирусы оспы, герпеса и гепатита Б. Примерно 50-60 % липидов в составе вирусов представлено фосфолипидами, 20-30 % составляет холестерин.

Липидный компонент стабилизирует структуру вирусной частицы. Экстракция липидов органическими растворителями, обработка вирусной частицы детергентами или липазами приводит к деградации вирусной частицы и потере инфекционной активности.

Углеводы.

Углеводный компонент вирусов находится в составе гликопротеидов. Основной функцией гликопротеидов является взаимодействие со специфическими рецепторами клеточной поверхности. Благодаря этим белкам осуществляется распознавание специфических клеточных рецепторов и прикрепление к ним вирусной частицы. Обычно углеводы, в составе гликопротеидов представлены фруктозой, сахарозой, маннозой, галактозой, нейраминовой кислотой, глюкозамином. Количество сахаров в составе гликопротеидов составляют 10-13 % от массы вириона. Химическая специфичность их полностью определяется клеточными ферментами, обеспечивающими перенос и присоединение соответствующих сахарных остатков. Подобно липидам, углеводный компонент определяется клеткой-хозяином, благодаря чему один и тот же вирус, репродуцирующий в клетках разных видов, может значительно отличаться по составу сахаров в зависимости от специфичности клеточных гликозилтрансфераз.

1. 3 Лекция № 3 (2 часа).

Тема: «Репродукция вирусов»

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Первый этап репродукции вирусов – начало инфекции:
 - а) адсорбция вируса на клетке
 - б) проникновение вируса в клетку
 - в) раздевание или депротеинизация вируса
2. Второй этап репродукции – экспрессия вирусного генома:
 - а) транскрипция
 - б) трансляция
 - в) репликация
 - г) сборка вирусных частиц и выход вируса из клетки

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Первый этап репродукции вирусов – начало инфекции:
 - а) адсорбция вируса на клетке
 - б) проникновение вируса в клетку
 - в) раздевание или депротеинизация вируса

Первый этап репродукции начинается с адсорбции вируса на поверхности клетки.

Адсорбция – т.е. прикрепление вирусных частиц к клеточной поверхности. Прикрепление представляет собой специфическое связывание вирионного белка

(антирецептора) с элементами клеточной поверхности (рецепторами). Адсорбция может быть обратимой и необратимой.

Начальные этапы адсорбции могут носить неспецифический характер - обратимая адсорбция. Он определяется силами электростатического взаимодействия, возникающими между разноименно заряженными группами, расположенными на поверхности клетки и вируса. В этом процессе участвуют заряженные положительно аминные группы вирусного белка и фосфатные, сульфатные и карбоксильные группы клеточной поверхности, имеющие отрицательный заряд.

Необратимая адсорбция процесс специфический, основанный на узнавании клеточных рецепторов вирусными белками, ведущий к прикреплению вирусной частицы к клетке. Белки на поверхности вируса, узнающие специфические рецепторы клетки и взаимодействующие с ними и обуславливающие прикрепление к ним вирусной частицы, называются прикрепительными белками. Количество прикрепительных белков может быть различным, например, у вируса Семлики -240 молекул гликопротеида, у вируса гриппа 300-450 гемагглютинирующих субъединиц, у реовируса - 24 молекулы белка σ-1, у адено-вирусов - 12 фибр. Прикрепительные белки входят у простоорганизованных вирусов в состав капсида, у сложноорганизованных вирусов в состав суперкапсида, у фага в состав отростка. Рецепторы клетки могут иметь разную химическую природу и представлять собой: белки, липиды, углеводный компонент белков или липидов. Специфические рецепторы играют роль не только в прикреплении вируса к клеточной поверхности, но и во внутриклеточном транспорте, где вирус способен инициировать инфекционный процесс. Вирус может прикрепиться и к неспецифическим рецепторам и даже проникнуть в клетку, но только прикрепление к специфическим рецепторам приведет к возникновению инфекции. Необратимая адсорбция – это множественное, мультивалентное взаимодействие вирусных прикрепительных белков (антирецепторов) с элементами клеточной поверхности (рецепторами).

Стабильное связывание происходит вследствие свободного перемещения рецепторов в липидном бислое плазматической мембранны, и образования **рецепторных полей**. (Количество рецепторов в участке адсорбции доходит до 3000).

Количество специфических рецепторов на 1 клетке колеблется от 10^4 до 10^5 . Для одних вирусов наличие специфических рецепторов ограничено одним видом животных, для других многими видами. Например, для вируса гепатита В чувствительные клетки располагаются лишь в организме человека и приматов, для вируса гриппа типа А – в организме человека, многих видов животных и птиц, для тогавирусов - чувствительны клетки позвоночных и членистоногих.

Адсорбция вируса на клетках происходит в широком диапазоне температур.

Адсорбированные вирусные частицы могут иметь различную судьбу:

- 1) сползают с поверхности клетки, при этом они повреждаются, так как теряют способность к реадсорбции другими клетками и не инфицируют их;
- 2) проникают в клетку и подвергаются дезинтеграции;
- 3) остаются интактными.

Проникновение вирусов в клетку возможно 2 способами:

- 1) путем виропексиса или рецепторного эндоцитоза
- 2) путем слияния вирусной и клеточной мембран.

«Виропексис» (термин предложенный в 1948 г. Фазекасом де Сен Гро) – означает что вирусная частица попадает в цитоплазму в результате инвагинации плазматической мембраны и образования вакуоли, которая содержит вирусную частицу.

Виропексис - частный случай рецепторного эндоцитоза – обычный путь поступления в клетку питательных веществ. Происходит в специализированных участках цитоплазматической мембраны. В этих участках концентрируются вирусные рецепторы, образуется ямка, покрытая со стороны цитоплазмы особым белком - клатрином. После мультивалентного прикрепления вириона – ямка углубляется, мембрана втячивается

внутрь клетки. В результате инвагинации образуется замкнутая вакуоль, содержащая вирусную частицу (в течение 1 минуты возникает до 2000 вакуолей).

Покрытые вакуоли сливаются с другими более крупными вакуолями, образуя рецепторосомы. Рецепторосомы – содержат рецепторы, но не содержат клатрин. Рецепторосомы сливаются с лизосомами.

Эндоцитоз обеспечивает транспорт вирусной частицы в соответствующие внутриклеточные участки (таким путем ядерные вирусы попадают в ядро, а ревирорусы в лизосомы).

Второй способ проникновения вируса в клетку – слияние вирусной и клеточной мембран.

У сложноорганизованных вирусов слияние происходит за счет точечного взаимодействия вирусного белка слияния с липидами клеточной мембранны. В результате внутренний компонент вируса оказывается в клетке. Белком слияния является один из его поверхностных белков. К настоящему времени этот белок идентифицирован лишь у парамиксовирусов и ортомиксовирусов. У парамиксовирусов этот белок (F-белок) представляет собой один из двух гликопротеинов, находящихся на поверхности вирусной частицы.

Функцию белка слияния у вируса гриппа выполняет малая гемагглютинирующая субединица, НА2.

У простоорганизованных вирусов один из поверхностных белков капсида взаимодействует с липидами клеточных мембран и внутренний компонент вируса оказывается в клетке. Вирусы вызывают два типа слияния клеток: 1) «слияние снаружи» и 2) «слияние изнутри»

«Слияние снаружи» происходит при высокой множественности инфекции и обнаруживается в течение первых часов после заражения. Такой тип слияния описан для парамиксовирусов, обусловлен белками заражающего вируса и не требует внутриклеточного синтеза вирусных компонентов. «Слияние изнутри» происходит при низкой множественности инфекции, обнаруживается на сравнительно поздних стадиях инфекционного процесса и обусловлено вновь синтезированными вирусными белками. «Слияние изнутри» описано для многих вирусов: вирусов герпеса, онковирусов, возбудителей медленных инфекций и др. Этот тип слияния вызывают те же вирусные гликопротеиды, которые обеспечивают проникновение вируса в клетку.

Раздевание вируса. Проникшие в клетку вирусные частицы должны раздеться, чтобы вызвать инфекционный процесс. Раздевание заключается в удалении защитных оболочек. Конечными продуктами раздевания могут быть сердцевины, нуклеокапсиды, нуклеиновые кислоты. Эти продукты для разных вирусов могут быть разными. Например, конечным продуктом раздевания пикорнавирусов является РНК, ковалентно связанная с белком VP_g, конечным продуктом раздевания адено-вирусов, вируса полиомы и SV40 является ДНК, ковалентно связанная с одним из внутренних вирусных белков.

В ряде случаев способность вирусов вызывать инфекционный процесс определяется возможностью их раздевания в клетке данной системы. Тем самым эта стадия является одной из стадий, лимитирующих инфекцию.

Раздевание ряда вирусов происходит в специализированных участках внутри клетки (лизосомах, структурах аппарата Гольджи, окколоядерном пространстве, ядерных порах на ядерной мембране). При слиянии вирусной и клеточной мембран проникновение в клетку сочетается с раздеванием.

Раздевание и внутриклеточный транспорт являются взаимосвязанными процессами: при нарушении правильного внутриклеточного транспорта к местам раздевания вирусная частица попадает в лизосому и разрушается лизосомальными ферментами.

Промежуточные стадии при раздевании. Раздевание вирусной частицы осуществляется постепенно в результате серии последовательных реакций. Например, в

процессе раздевания пикорнавирусы проходят ряд стадий с образованием промежуточных субвирусных частиц с размерами от 156 S до 12 S. Раздевание вирусов ЕСНО имеет следующие стадии: вирионы (156 S) А-частицы (130 S) РНП и пустые капсиды (80 S) РНК с терминальным белком (12 S). Раздевание адено-вирусов происходит в цитоплазме и ядерных порах, и имеет по крайней мере 3 стадии: 1- образование субвирусных частиц с большей плотностью, чем вирионы; 2 - образование сердцевин, в которых отсутствует 3 вирусных белка; 3 - образование ДНК-белкового комплекса, в котором ДНК ковалентно соединена с терминальным белком. Вирус полиомы в процессе раздевания теряет наружные белки и превращается в субвирусную частицу с коэффициентом седиментации 48 S. Затем частицы связываются с ядерными белками (гистонами) и формируется комплекс (с коэффициентом седиментации 190 S), способный вызвать инфекционный процесс. Вирус гриппа вначале теряет липопротеидную оболочку и превращается в субвирусную частицу, из которой после удаления М-белка освобождается нуклеокапсид.

2. Второй этап репродукции – экспрессия вирусного генома:

- а) транскрипция
- б) трансляция
- в) репликация
- г) сборка вирусных частиц и выход вируса из клетки

Согласно центральному постулату молекулярной генетики поток генетической информации направлен от ДНК через РНК к белку.

ДНК → РНК → белок.

В хранении и передаче информации участвуют 3 основных процесса:

репликация – копирование ДНК с образованием идентичных дочерних молекул;
транскрипция – процесс переписывания генетической информации с ДНК на РНК с последующим переносом её к рибосомам;

трансляция – процесс перевода информации в специфическую аминокислотную последовательность белка.

Репликация. Репликация ДНК в клетке происходит в результате разделения двух цепей родительской ДНК и последующего синтеза на обеих цепях одновременно двух новых (дочерних) молекул с соблюдением принципа комплементарности, т.е. аденин - тимин, цитозин - гуанин. Это так называемый матричный механизм репликации, то есть каждая нить родительской ДНК является матрицей для синтеза копии параллельной цепи. Следовательно, новая молекула ДНК состоит из 1 нити родительской и 1 нити вновь синтезированной. Такой способ репликации называется полуконсервативным.

У вирусов отмечается полуконсервативный и консервативный способ репликации. Процесс осуществляется с участием ферментов ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы, эндодезоксирибонуклеазы. Процесс репликации начинается с определенного сайта, для полимеразы необходима затравка – РНК.

Репликация генома ДНК-содержащих вирусов в основном катализируется клеточными ферментами и механизм ее сходен с механизмом репликации клеточной ДНК.

У вирусов, содержащих кольцевые двунитчатые ДНК (папилломавирусы, полиомавирусы), разрезается одна из нитей ДНК, что ведет к раскручиванию и снятию супервитков на определенном участке молекулы.

При репликации однонитчатых ДНК (семейство парвовирусов) происходит образование двух нитчатых форм, которые представляют собой промежуточные репликативные формы.

Транскрипция. Процесс транскрипции происходит с участием фермента ДНК-зависимой РНК-полимеразы. РНК строится на участке одной нити ДНК, которая в этом месте расплетается. Механизм выбора матрицы для синтеза РНК неизвестен. РНК синтезируется из рибонуклеозид 5' трифосфатов.

Трансляция. Трансляция – перевод генетической информации в аминокислотную последовательность белка, осуществляется в цитоплазме с участием рибосом, информационной РНК, транспортных РНК, аминокислот, инициирующих факторов. Каждая аминокислота кодируется триплетом (тремя нуклеотидами или кодоном). Генетический код вырожден, то есть каждая аминокислота (кроме триптофана и метионина) кодируется более чем одним кодоном. Генетический код универсален для всей живой природы (лев и одуванчик используют одни и те же кодоны для соответствующих аминокислотных остатков). Процесс трансляции состоит из 3 фаз: 1) инициации, 2) элонгации, 3) терминации. Инициация трансляции – это процесс, основанный на узнавании рибосомой иРНК и связывании с её особым участком. Рибосома узнает иРНК благодаря «шапочке» на 5' конце и скользит к 3' концу. Трансляция иРНК начинается с инициаторного кодона АУГ, (или ГУГ, кодирующего метионин) расположенного на 5' конце, а заканчивается терминирующим кодоном. С метионина начинается синтез всех полипептидных цепей. Элонгация – это процесс удлинения полипептидной цепи, основанный на присоединении новых аминокислот

1. 4 Лекция №4 (2 часа).

Тема: «Репродукция вирусов»

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Особенности репродукции ДНК-содержащих вирусов размножающихся в ядре и в цитоплазме.
2. Особенности репродукции РНК-содержащих вирусов с позитивным и негативным геномом.
3. Особенности репродукции ретровирусов.

1.4.2 Краткое содержание вопросов:

1. Особенности репродукции ДНК-содержащих вирусов размножающихся в ядре и в цитоплазме.

У ДНК-содержащих вирусов, репродуцирующихся в ядре (герпес; адено-папиллома-, полиомавирусов) формула переноса генетической информации такая же, как в клетке.

Экспрессия генома для вирусов этих семейств осуществляется по следующей схеме:

ДНК – иРНК - белок

Для осуществления процесса репродукции используется клеточный фермент ДНК-зависимая РНК-полимераза.

Для ДНК содержащих вирусов размножающихся в цитоплазме (поксвирусы – вирусы оспы; асфавирусов – вируса африканской чумы свиней) – фермент, осуществляющий транскрипцию должен быть вирусспецифичным.

При репликации 1 нитчатых ДНК (парвовирусы) происходит образование 2-нитчатой формы – являющейся промежуточной репликативной формой. 2-нитчатые ДНК создаются с помощью вирусспецифического фермента ДНК-зависимой ДНК-полимеразы.

Родительская РНК этих вирусов связывается с рибосомами и транслируется в гигантский белок предшественник, который после синтеза нарезается на зрелые, функционально активные компоненты. Для осуществления трансляции рибосомы должны узнать иРНК. Узнает она благодаря сар - белку связанному с 5' концом иРНК.

2. Особенности репродукции РНК-содержащих вирусов с позитивным и негативным геномом.

У 1-нитевых РНК-содержащих вирусов с позитивным геномом экспрессия осуществляется по следующей схеме: РНК-белок

Родительская РНК этих вирусов связывается с рибосомами и транслируется в гигантский белок предшественник, который после синтеза нарезается на зрелые, функционально активные компоненты. Для осуществления трансляции рибосомы должны узнати иРНК. Узнает она благодаря сай - белку связанному с 5' концом иРНК.

Репродукция ретровирусов У вирусов с негативным геномом (ортомиксовирусов, парамиксовирусов, буньявирусов, ареновирусов, рабдовирусов) для осуществления процесса репродукции необходима транскрипция с геномной РНК на информационную РНК. Для транскрипции используется вирионная транскриптаза. Образованная + матричная РНК кодирует синтез одного белка. Репликацию начинают новосинтезированные белки. Они катализируют синтез полной + цепи. Полная «плюс» цепь служит матрицей для синтеза геномной «минус» РНК.

У 1-нитевых РНК-содержащих вирусов с негативным геномом схема экспрессии генома выглядит следующим образом:

РНК- иРНК - белок

Матричная РНК кодирует синтез одного белка, однако, присутствие сигналов сплайсинга в определенных участках может обеспечить формирование нескольких матричных РНК (каждая из которых кодирует особый белок) с одного и того же участка генома.

3. Особенности репродукции ретровирусов.

Ретровирусы имеют уникальный путь передачи генетической информации. РНК этих вирусов с помощью вирионного фермента (РНК-зависимой ДНК-полимеразы или обратной транскриптазы) - ревертазы переписывают генетическую информацию на одноНитевую ДНК. Далее идет построение комплементарной ДНК нити. Образованная 2-нитевая ДНК объединяется (интегрирует) с геномом хозяина. Последующая экспрессия не обязательна. Если экспрессия происходит, то интегрированная ДНК (иДНК) – транскрибируется транскриптазой клетки хозяина. Образуются матричные РНК разной длины, они транслируются с образованием полипротеинов. Полипротеины расщепляются на отдельные вирусные белки. В состав вирионов входят транскрипты, содержащие весь геном.

РНК – ДНК – иРНК - белок

При изучении процессов транскрипции обращает на себя внимание экономия генетического материала, особенно у РНК-содержащих вирусов. Транскрипция может осуществляться несколькими способами:

1. Двукратное считывание одной и той же мРНК, но с разных инициирующих кодонов, что дает возможность синтезировать два белка с одной мРНК;

2. Сдвиг рамки считывания. Рамка считывания – это область нуклеотидов в мРНК, с которой считывается информация при синтезе белка. При сдвиге рамки считывания на один или два нуклеотида, происходит синтез нового белка.

3. Сплайсинг со сдвигом рамки считывания. Сплайсинг (от англ. splice - соединять, сращивать концы каната) - это процесс вырезания инtronов и сшивания экзонов. В результате сплайсинга с одного участка генома транскрибируются разные матричные РНК.

В зараженной вирусом клетке происходит снижение синтеза клеточных нуклеиновых кислот и белков. Рассмотрим механизмы воздействия вируса на клеточный аппарат.

Во-первых, некоторые вирусы могут ингибировать активность одного из основных факторов инициации транскрипции (TFIID), происходит это за счет протеазной

активности вирусных белков, которые расщепляют одну из субъединиц фактора TFIID. Такой механизм использует полиовирус, а вирус везикулярного стоматита оказывает опосредованное действие, на клеточные факторы ингибиции транскрипции. Кроме того, вирусные белки способны ингибировать транспорт клеточных мРНК в цитоплазму, снижать активность клеточных РНК-полимераз.

Во-вторых, вирусы способны ингибировать экспрессию отдельных клеточных генов, следствием чего является снижение антивирусного ответа клетки на внедрение вируса.

Для вирусов гриппа характерен сплайсинг.

Вирус гриппа способен блокировать сплайсинг клеточных РНК, но это не отражается на сплайсинге вирусных мРНК, поскольку они устойчивы к ингибиции сплайсинга за счет содержащихся в геноме нуклеотидных остатков, усиливающих сплайсинг.

Вирусные ферменты в зараженной клетке способны блокировать инициацию трансляции. Ингибиция происходит за счет расщепления фактора инициации трансляции вирусной протеазой. Подобная ингибиция не влияет на процесс трансляции вирусных белков, так как они содержат протяженные некодируемые последовательности на 5 конце, включающие рибосом-связывающий сайт, что способствует инициации трансляции вирусных белков. Такой механизм используют пикорнавирусы, вирус везикулярного стоматита, вирус гриппа.

Сборка вирусных частиц.

Образование вирусной частицы возможно лишь в том случае, если нуклеиновые кислоты и белки обладают способностью к самосборке.

В основе самосборки лежит специфическое белок-нуклеиновое и белок-белковое узнавание, которое может происходить в результате гидрофобных, солевых и водородных связей.

Сборка РНК – содержащих простоустроенных вирусов осуществляется путем соединения генома с капсидными белками с образованием нуклеокапсида.

У сложноустроенных РНК – содержащих вирусов процессы сборки разобщены. Первоначально формируется нуклеокапсид, который мигрирует к месту сборки вириона. (Для корона-, рео- покс-вирусов – это цитоплазматическая мембрана, для гепресвирусов – это ядерная мембрана).

Выход вирусов из клетки.

Существуют 2 способа выхода вирусного потомства из клетки.

1) Путем «лизиса» (взрыва)- при этом способе нарушается целостность клетки, в результате чего вирионы оказываются в окружающей среде. Такой способ характерен для простоорганизованных вирусов (пикорнавирусы, реовирусы, парвовирусы, адено-вирусы, папиллома-и полиомавирусы).

2) Путем «почкования» - этим способом выходят вирусы, содержащие липопротеидную оболочку, которая является дериватом клеточных мембран. При этом способе клетка может длительное время сохранять жизнеспособность, пока не истощится.

1. 5 Лекция №5 (2 часа).

Тема: «Принципы систематики вирусов. Характеристика ДНК-содержащих вирусов»

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Принципы систематики вирусов.
2. Характеристика Poxviridae
3. Характеристика Asfaviridae и

4. Характеристика Негреспиривиды
5. Характеристика Нерадновириды

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. Принципы систематики вирусов.

Первые классификации вирусов основаны на сходстве их патогенных свойств, на тропизме, на общности экологического статуса и т.д.

В результате совершенствования методов изучения вирусов, накопления данных, полученных с помощью биохимических методов, рентгеноструктурного анализа в 50-х годах была предпринята попытка объединить все вирусы в группы исходя из их физико-химических свойств. В это же время было открыто огромное количество новых вирусов животных, человека, растений и т.д. и соответственно созданы новые классификационные схемы.

В 1966 году на международном микробиологическом конгрессе в Москве был учрежден Международный комитет по номенклатуре вирусов (МКНВ) микробиологи и вирусологи пришли к единому мнению о том, что сотни вирусов, выделенных из различных биосистем, населяющих планету, следует классифицировать как единую группу организмов, отдельно от всех других биологических объектов. Было предложено все вирусы выделить в единое царство Vira и создать нисходящую иерархию групп по типу нуклеиновой кислоты, симметрии капсида, наличию или отсутствии наружной мембранны, стратегии репликации и иным структурным особенностям вириона.

Схема предложенная А.Львовом-Хорном-Турнье, стала основой универсальной системы классификации вирусов.

Система базируется на условно-выбранных иерархических уровнях, соответствующих семейству, подсемейству, роду, виду.
(Иерархия - последовательное расположение таксономических единиц. Таксон – любая единица в системе: семейство, подсемейство, род, вид). Более низкие иерархические уровни (подвид, штамм, вариант) устанавливаются международными специализированными комиссиями.

Таксономические единицы системы классификации вирусов.

1. Порядок – VIRALES
2. Семейство – VIRIDAE
3. Подсемейство – VIRINAE
4. Род – VIRUS

В основу современной классификации положены следующие критерии:

1. Тип нуклеиновой кислоты, ее структура (количество нитей); ±
2. Наличие суперкапсида
3. Тип симметрии, морфология вириона, его размер
4. Стратегия вирусного генома
5. Феномены генетического взаимодействия (интеграция: полная, частичная)
6. Круг восприимчивых хозяев
7. Патогенность (в т.ч. патологические изменения в клетках, наличие телец-включений)
8. Географическое распространение
9. Способ передачи
10. Антигенные свойства

Деление на семейства производится на основании первых 3 критериев. Деление на подсемейства, род, вид по всем остальным.

Общее число исследованных и охарактеризованных в настоящее время вирусов животных превышает 4000, а количество штаммов и разновидностей, имеющих значение для эпизоотологии, эпидемиологии и инфекционной патологии около 30000.

В 70-х годах прошлого века Адриан Гиббс и Брайан Харрисон предложили для наглядной характеристики отдельных семейств использовать криптограммы (греч тайнопись, смысл знаков которой известен только посвященным). Сведения об основных свойствах вирусов семейства закодированы в виде пар символов.

2. Характеристика Poxviridae

Многие поксивирусы позвоночных вызывают папулезную, везикулярную сыпь после системной или локальной инфекции. Распространяется – аэрозольно, контактно, переносчиками. Вируса млекопитающих и птиц образуют ацидофильные, цитоплазматические включения

Характеристика вирусов: сложноорганизованные, геном представлен ДНК, 2-нитевой, с ковалентно замкнутыми концами, кодирует 150-300 белков, из них 100 – структурные. Репродукция вирусов происходит в цитоплазме. Проникновение в клетку – эндоцитозом. Выход из клетки – путем почкования через мембранны аппарата Гольджи.

Вирион плейоморфной формы, чаще в виде параллелипипеда 220-450X140-260 нм, возможно овоидная форма. В центре двояковогнутый нуклеоид (ядро)- состоящий из ДНК и белков. Между оболочкой и кором в вогнутостях 2 латеральных тела. Липопротеидная оболочка образована из мембранны аппарата Гольджи.

Организация генома и репликация

Репликация вируса происходит в цитоплазме. Синтез ранних м.РНК происходит с обеих цепей ДНК с помощью ферментов сердцевины (кора) , включая вирусспецифическую ДНК-зависимую РНК-полимеразу. Затем образованные РНК-транскрипты (иРНК) выходят из кора и транспортируются к рибосомам, где идет синтез ранних вирусных протеинов. При этом ингибируется синтез клеточных макромолекул.

Вирусспецифические промоторы регулируют транскрипцию 3 классов генов:

1 класс – экспрессируются с частично раздетого вириона до репликации ДНК

2 класс – экспрессируются Во время репликации ДНК и необходимы для поздней транскрипции

3 класс - кодирует вирусные структурные протеины.

Протеины проходят посттрансляционные модификации (нарезание, фосфорилирование, глюкозилирование, сульфирование, ацитилирование и т.д.). Это необходимо для морфогенеза вирионов.

Репликация геномной ДНК происходит в основном с участием вирусных ферментов, в отличие от вирусов репродуцирующих в цитоплазме.

3. Характеристика Asfaviridae

Семейство Asfaviridae. Включает 1 род Asfvirus - вирус африканской чумы свиней (АЧС).

Характеристика семейства Asfaviridae – вирион сложноорганизованный, д=70-100 нм. Построен по кубическому типу симметрии. Геном 2 спиральная ДНК с ковалентно замкнутыми концами, размер генома – 170-190 kbp, кодирует 50 структурных белков.

Особенности репродукции семейства Asfaviridae

Проникновение в клетку – путем слияния вирусной и клеточной мембран (которому предшествует рецепторный эндоцитоз)

Место репродукции – цитоплазма клеток

Выход из клетки – «почкованием» через мембранны эндоплазматического ретикулума.

Для ДНК содержащих вирусов размножающихся в цитоплазме (поксвирусы – вирусы оспы; асфавирусов – вируса африканской чумы свиней) – фермент, осуществляющий транскрипцию должен быть вирусспецифичным.

3 Характеристика Herpesviridae

Семейство Herpesviridae включает 3 подсемейства: Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae, Gammaherpesvirinae

подсемейство Alphaherpesvirinae включает 4 рода:

Simplexvirus – герпес вирусы человека

Varicellovirus – герпес вирусы человека, крс, собак, коз, лошадей, болезнь Ауески, ринопневмония лошадей

«Mareks disease – lake viruses» - Болезнь Марека

«Infectious laryngotracheitis-lake viruses» - вирус инфекционного ларинготрахеита

Это вирусы характеризуются:

1) высокой цитопатической активностью; 2) относительно коротким репликативным циклом; 3) широким спектром поражаемых хозяев. Часто вызывает латентное инфицирование ганглиев

Подсемейство Betaherpesvirinae

Cytomegalovirus – цитомегаловирус человека

Muromegalovirus – цитомегаловирус мышей

Roseolovirus – герпес вирус человека

Для этих вирусов характерно:

1) длительный репродуктивный цикл; 2) медленно развивающийся цитопатический эффект; 3) узкий спектр хозяев

Подсемейство Gammaherpesvirinae

Lymphocryptovirus – герпес вирус человека

Rhadinovirus – вирус злокачественной катаральной горячки

Для этих вирусов характерно:

1) узкий спектр хозяев; 2) размножаются в лимфобластоидных клетках.

Специфичны для Т- и В-лимфоцитов, часто вызывают латентную инфекцию.

Характеристика Herpesviridae

Сложноорганизованный состоит из сердцевины (core), капсида, тегумента, пеплоса, кубический тип симметрии. Геном 2-нитевая линейная ДНК - – 125-240 kbp, кодирует около 50 белков, из них 6 – входят в состав капсида, 15-тегумента, 10-пеплоса

Особенности репродукции Herpesviridae

Репродукция вирусов герпеса происходит с участием клеточной ДНК-зависимой РНК-полимеразы. Синтез белков происходит в строго определенной последовательности и в соответствии с этим подразделяется на классы: α, β, γ.

Судьба зараженной клетки

Клетки, продуктивно зараженные герпес вирусом не выживают. В них происходят различные структурные и биохимические изменения приводящие к их разрушению.

4. Характеристика Hepadnoviridae

семейство «Hepadnoviridae» вирус гепатита В. (HBV)

Вирус распространен по всему миру и очевидно, является самым распространенным виновником хронических заболеваний печени в т.ч. гепатоцеллюлярной карциномы у человека (злокачественная опухоль из эпителиальной ткани). Вирусы этого семейства вызывают гепатит у сурков, земляной белки, пекинской утки. Гепатит В – наиболее опасная форма гепатита из всех известных гепатитов (А, Е, или ни А ни Б).

Впервые АГ вируса гепатита В был обнаружен Б.Блюмбергом в 1964 году в сыворотке крови австралийскогоaborигена, а сам возбудитель был обнаружен в 1970 г. Д.Дейном с соавт. Вначале возбудитель получил название частиц Дейна, т.к. не было уверенности в том, что это действительно вирус а не его компонент.

К биологическим особенностям вируса следует отнести их поразительное сродство с гепатоцитами. Вирус способен часто вызывать персистентную инфекцию при высокой концентрации вирусных АГ и инфекционного вируса в крови. В более низких концентрациях вирус может быть обнаружен в других жидкостях организма. Характер инфекции объясняет и основной путь заражения – парентеральное введение сыворотки и сывороточных препаратов, нестерильные инструменты (наркоманы). **Заражение возможно** половым путем, через слону, от инфицированной матери плоду, скрытая инапарантная передача между детьми (драки, еда).

Характеристика вирусов:

1. Сложноорганизованные, сферическая форма капсида, $D=42$ нм
2. Геном представлен ДНК, 2-нитевой кольцевая, причем 1 нить(минус-нить) замкнута в кольцо, а +нить~ приблизительно на 50% короче –нити и незамкнута
3. В состав вириона входит вирионная ДНК-полимераза для достраивания +нити
4. В составе вириона 3 основных антигена
 - a) HBsAg – поверхностный, растворимый или австралийский АГ
 - b) HBcAg – антиген сердцевины (core)
 - b) HBeAg – находится в сердцевине вириона , но в отличии от HBcAg циркулирует в крови свободно или в комплексе с АТ
5. Жизненный цикл вируса гепатита В

Проникновение – слиянием вирусной и клеточной мембран.

В ходе проникновения происходит достраивание + цепи.

Место репродукции – ядре и цитоплазме клеток

В ядре клеточная ДНК-зависимая РНК-полимераза синтезирует 2 типа РНК

1 - РНК полноразмерную или прегеном

2 - иРНК (меньших размеров) –для синтеза вирусных белков.

Прегеном и вирусная ДНК-полимераза упаковываются в капсид, который переносится в цитоплазму.

В цитоплазме происходит обратная транскрипция прегенома. На нем синтезируется (-нить) ДНК. Образуется гибрид РНК-ДНК, затем РНК разрушается с помощью вирионного фермента РНК-азы Н.

На «-» цепи ДНК с помощью вирионной ДНК-зависимой ДНК-полимеразы синтезируется +нить. Синтез прекращается - как только вирион покинет клетку. (Поэтому она может быть частично не достроена)

В составе генома вируса нет онкогена, но внедряясь в клеточную хромосому (в разные ее участки) вирусная ДНК может индуцировать в них различные генетические перестройки – делеции, транслокации, амплификации, которые могут стать причиной рака печени.

(В составе генома энхансеры (усилители) активируют экспрессию всех вирусных генов в клетках печени. Ген S экспрессируется на высоком уровне только в клетках печени и под влиянием стероидных гормонов. Именно поэтому хронические гепатит В и рак печени у мужчин регистрируется чаще, чем у женщин, у которых уровень гормонов ниже)

Выход из клетки – «почкованием» через клеточную мембрану

Гемагглютинирующих свойств – нет

1. 6 Лекция №6 (2 часа).

Тема: «Характеристика ДНК-содержащих вирусов»

1.5.1 Вопросы лекции:

1. Характеристика Parvoviridae
2. Характеристика Adenoviridae
3. Характеристика Papillomaviridae
4. Характеристика Polyomaviridae

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. Характеристика Parvoviridae

Характеристика Parvoviridae - простоорганизованный, кубический тип симметрии, $d=18-26$ нм . Геном 1 спиральная линейная ДНК Размер генома –4-6 kb. Геном кодирует 8 белков, 3 из которых формируют капсид. Обладает гемагглютинирующими активностью. Семейство Parvoviridae включает 2 подсемейства: Parvovirinae - вирусы позвоночных. Включает 2 рода : Parvovirus –парвовирус собак, парвовирус свиней, парвовирус цыплят, вирус алеутской болезни норок; Dependovirus - Аденоассоциированные вирусы бычьий (AAV), AAV птичий, AAV собак. Подсемейство Densovirinae включает 1 род Densovirus –вирусы насекомых

Особенности репродукции Parvoviridae. Проникновение в клетку – рецепторного эндоцитоза. Место репродукции - ядро клеток. Выход их клетки – путем «лизиса» клеточной стенки.

Родительская РНК этих вирусов связывается с рибосомами и транслируется в гигантский белок предшественник, который после синтеза нарезается на зрелые, функционально активные компоненты. Для осуществления трансляции рибосомы должны узнать иРНК. Узнает она благодаря сай - белку связанному с 5/ концом иРНК.

2. Характеристика Adenoviridae

Характеристика Adenoviridae, включает 2 рода: Mastadenovirus –вирусы млекопитающих; Aviadenovirus – вирусы птиц, у человека аденоизуры могут протекать бессимптомно, или с поражением дыхательной, пищеварительной систем, зрительного аппарата, в виде геморрагического цистита

У животных в виде гепатита, респираторных расстройств, у кур ССЯ, поражение органов дыхания и т.д. В 1962 году была доказана возможность возникновения злокачественных опухолей у грызунов под влиянием патогенного аденоизура человека. Непосредственно у человека пока не установлено.

Характеристика Adenoviridae – вирионы простоорганизованные, построены по кубическому типу симметрии. Геном 2 спиральная линейная ДНК –26-45 kbp, кодирует около 40 белков. Обладает гемагглютинирующими активностью

Цикл репродукции аденоизуров разделяют на раннюю и поздние фазы.

Вначале идет синтез вирусных РНК на матрице ДНК, до начала репликации ДНК. Ранние транскрипты считаются с обеих цепей ДНК под контролем нескольких промоторов. Синтез ранних и поздних РНК идет с участием клеточных ДНК-зависимых РНК-полимераз. Ранняя фаза репликации вируса завершается синтезом ДНК, идет переключение на позднюю фазу во время которой осуществляется синтез структурных белков.

Сборка вирионов: Упаковка ДНК происходит в уже сформировавшийся капсид. В процессе сборки образуется некоторое количество дефектных частиц т.е. частиц с неполной ДНК. Это происходит в результате обрыва ДНК при ее упаковке в пустой капсид.

3. Характеристика Papillomaviridae

Морфология вирусов семейства Papillomaviridae . Вирион простоорганизованный, $d=55$ нм, построен по кубическому типу симметрии. Геном 2 спиральная линейная ДНК, размер генома –6,8-8,4 kbp. Геном кодирует 8-10 белков, из них 2 – входят в состав вириона.

Семейство Papillomaviridae включает род Papillomavirus – бычий папилломавирус, папилломавирус собачьих, папилломавирус овец, папилломавирус человека

Особенности репродукции Papillomaviridae: проникновение в клетку– путем «виропексиса». Место репродукции – ядре клеток. Выход из клетки – путем «лизиса» клеточной мембранны.

4. Характеристика Polyomaviridae

Семейство Polyomaviridae включает род Polyomavirus. Вирусы этого семейства имеют четкую специфичность относительно вида хозяина. Полиомавирусы распространены повсеместно и вызывают как правило персистентную инфекцию в ранний период жизни хозяина. Среди людей распространяется через реактивацию персистентной инфекции матери во время беременности, с выделением вируса в небольших количествах с мочой, реже трансплацентарная передача. Возможно контактная и воздушно-капельная передача инфекции. Полиомавирусы проявляют определенный тропизм к тканям. У человека это как правило поражение мочевыводящих путей, центральной нервной системы. Большинство полимавирусов вызывают туморогенную потенцию у грызунов.

Характеристика Polyomaviridae. Вирион простоорганизованный, диаметр 40 нм. Геном - 2 спиральная линейная ДНК, –5 kbp, кодирует 8 белков, из них 3 – входят в состав вириона.

Особенности репродукции Polyomaviridae: проникновение в клетку – путем «виропексиса», место репродукции – ядре клеток, выход из клетки – путем «лизиса» клеточной мембранны.

1. 7 Лекция № 7 (2 часа).

Тема: «Характеристика РНК-содержащих вирусов»

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Характеристика семейства Reoviridae
2. Характеристика семейства Arenaviridae
3. Характеристика семейства Rhabdoviridae
4. Характеристика семейства Paramyxoviridae
5. Характеристика семейства Coronaviridae

1.7.2 Краткое содержание вопросов:

1. Характеристика семейства Reoviridae

Семейство Reoviridae включает 9 родов: Orthoreovirus, Rotavirus, Orbivirus, Coltivirus, Aquareovirus, Cytovirus, Fijivirus, Phytoreovirus, Oryzavirus.

Распространены повсеместно. Ортореовирусы человека, как правило афируленты, но могут вызывать заболевания верхних дыхательных путей и энтериты у детей. У мышей ортореовирусная инфекция сопровождается диареей, замедлением развития, гепатитами, желтухами, миокадитами, пневмониями, энцефалитами. У домашних животных инфекция сопровождается поражением дыхательных путей и диареями. У птиц болезнь варьирует от инатарантной формы до летального исхода и зависит от штамма вируса, и возраста птицы. Птичьи ортореовирусы не инфицируют млекопитающих. Биологические особенности

вирусов зависят от их родовой принадлежности. Некоторые вирусы репродуцируются только в определенных видах позвоночных и передаются между хозяевами алиментарно или аэрозольно.

Orthoreovirus и Rotavirus – вирус позвоночных.

Orbivirus – реплицируют как в организме позвоночных так и беспозвоночных (муравьи, комары, мухи, клещи)

Aquareovirus, Cytovirus – вирусы патогенные для насекомых передаются контактно и алиментарно.

Fijivirus, Phytoreovirus, Oryzavirus – вирусы растений реплицируются как в растениях, так и в членистоногих (векторах).

2. Характеристика семейства Arenaviridae

Семейство Arenaviridae.

Вирионы вируса сложноорганизованные, $d=50-300$ нм (110-130 нм, со спиральным типом симметрии). Геном представлен РНК, 1-нитевой фрагментированной (2 фрагментов),

Амбисенс-стратегия кодирования - Трансляция может проводиться с обоих комплементарных цепей РНК – геномной и комплементарной ей.

Семейство Arenaviridae включает 1 род: Arenavirus – вирус Ласса, вирус Иппи, вирус лимфоцитарного хориомененгита мышей, вирус Мачупо

Особенности репродукции

Проникновение в клетку - путем рецепторного эндоцитоза

Место репродукции - цитоплазма клеток

Механизм выхода из клетки - путем «почкования»

Гемагглютинирующие свойства не установлены

3. Характеристика семейства Rhabdoviridae

Семейство Rhabdoviridae включает 6 родов: Lyssavirus - вирус бешенства; Vesiculovirus - вирус везикулярного стоматита. Вирусы данного рода были выделены от различных животных, включая млекопитающих, рыб, членистоногих;

Ephemerovirus (эфимеровирус) - вирус эфемерной лихорадки крупного рогатого скота, проявляется внезапной лихорадкой, хроматой, нарушением моторики рубца. Вирус распространяется кровососущими членистоногими;

Novirhabdovirus (новирабдовирусы)- вирус инфекционного гематопоэтического некроза рыб. Для вирусов этого рода температура необходимая для репродукции, обычно 15-28 °C, а температура инактивации значительно ниже, чем для других рабдовирусов это связано с особенностью хозяев, являющихся пойкилотермными животными;

Cytorhabdovirus (циторабдовирусы) – вирус желтого некроза салата-латтука;

Nucleorhabdovirus (нуклеорабдовирусы) – вирус желтой карликовости картофеля;

Cytorhabdovirus, Nucleorhabdovirus - вирусы этих родов передаются посредством травоядных членистоногих или контаминированного сока.

Биологические особенности семейства.

Вирусы данного семейства инфицируют млекопитающих, рыб, членистоногих и других беспозвоночных. Некоторые представители имеют как позвоночных так и беспозвоночных хозяев. Отдельные вирусы инфицируют растения и определенные виры растительноядных насекомых. Некоторые вирусы позвоночных имеют широкий спектр восприимчивых хозяев. Вертикальный путь передачи рабдовирусов не наблюдается. Некоторые вирусы растений переносятся механически. В качестве векторов могут быть мухи, комары, клещи, тля, и т.п. Некоторые вирусы передаются механически с жидкостями инфицированного организма. Распространение вирусов позвоночных может быть контактным, аэрозольным, через укус или при половом контакте.

Особенности репродукции: проникновение в клетку - путем эндоцитоза. (слияния вирусной и клеточной мембран). После проникновения вирусная оболочка удаляется за счет лизосомной активности. Место репродукции - цитоплазма клеток. Транскрипция (первичная) начинается с помощью вирионной транскриптазы. Образуются полиденинированные мРНК. Трансляции мРНК происходит на рибосомах. После этого события происходит репликация генома. Затем вторичная транскрипция, трансляция и репликация с последующей сборкой вирусной частицы. Механизм выхода из клетки – путем «почкования»

4. Характеристика семейства Paramyxoviridae

Семейство Paramyxoviridae включает 2 подсемейства: Paramyxovirinae и Pneumovirinae

Подсемейство Paramyxovirinae включает 3 рода:

Respirovirus - вирус парагриппа человека, крупного рогатого скота,

Rubulavirus - вирус эндемического паратита

Morbivirus - вирус кори, чумы собак, крупного рогатого скота, мелких жвачных

Подсемейство Pneumovirinae включает 2 рода:

Pneumovirus - респираторно-синцитиальной инфекции человека, крупного рогатого скота – вирус ринотрахеита индеек

Metapneumovirus

Характеристика Paramyxoviridae: вирион сложноорганизованный, $d=150$ нм, построены по спиральному типу симметрии. Геном представлен 1-нитевой РНК (с негативной полярностью), кодирует 5 структурных вирусных белка. Обладает гемагглютинирующими свойствами

Особенности репродукции

Проникновение в клетку - путем слияния вирусной и клеточной мембран. Место репродукции - цитоплазма клеток. Механизм выхода из клетки – путем «почкования»

5. Характеристика семейства Coronaviridae

Семейство Coronaviridae. Вирионы сложноорганизованные, $d=120-160$ нм, Построены по спиральному типу симметрии. Геном представлен 1-нитевой РНК (с позитивной полярностью). Геном кодирует синтез 4 структурных белков. Обладает гемагглютинирующими свойствами

Семейство Coronaviridae включает 2 рода:

Coronavirus – коронавирус человека, собак, инфекционного перитонита кошек, трансмиссивного гастроэнтерита свиней, инфекционного бронхита кур

Torovirus – торовирус человека, торовирус лошадей, торовирус свиней, бычий торовирус

Особенности репродукции

Проникновение в клетку - путем слияния вирусной и клеточной мембран

Место репродукции - цитоплазма клеток

Механизм выхода из клетки - путем «почкования» через мембранны эндоплазматического ретикулума

1. 8 Лекция №8 (2 часа).

Тема: «Характеристика РНК-содержащих вирусов»

1.8.1 Вопросы лекции:

1. Характеристика семейства Orthomyxoviridae
2. Характеристика семейства Bunyaviridae
3. Характеристика семейства Flaviviridae

4. Характеристика семейства Caliciviridae
5. Характеристика семейства Picornaviridae

1.8.2 Краткое содержание вопросов:

1. Характеристика семейства Orthomyxoviridae

Семейства Orthomyxoviridae включает 4 рода: Influenzavirus A; Influenzavirus B; Influenzavirus C; Thogotovirus

Характеристика семейства: вирионы сложноорганизованные, построены по спиральному типу симметрии. Геном представлен 1-нитевой фрагментированной РНК (10 фрагментов), кодирует синтез 10 белков

Обладает гемагглютинирующими свойствами.

На поверхности вируса гриппа находятся 2 вида выступов, представленные гемагглютинином (HA – 15 разновидностей) и нейраминидазой (NA – 9 разновидностей)

Особенности репродукции: проникновение в клетку происходит путем рецепторного эндоцитоза. Место репродукции – ядро и цитоплазма клеток. Механизм выхода из клетки – путем «почкования». Вирус обладает гемагглютинирующими свойствами.

2. Характеристика семейства Bunyaviridae

Семейство Bunyaviridae включает 5 родов: Bunyavirus; Hantavirus; Nairovirus; Phlebovirus; Tospovirus

Вирионы построены по спиральному типу симметрии. Геном представлен 1-нитевой фрагментированной РНК (3 фрагмента). Геном кодирует синтез 4 структурных белков. Обладает гемагглютинирующими свойствами

Особенности репродукции буньвирусов: проникновение в клетку – путем слияния вирусной и клеточной мембран. Место репродукции –цитоплазма клеток. Механизм выхода из клетки – путем «почкования» через мембранны аппарата Гольджи

3 Характеристика семейства Flaviviridae

Семейство Flaviviridae. Вирионы построены по кубическому типу симметрии. Сложноорганизованный, $d=40-60$ нм. Геном представлен 1-нитевой РНК (с позитивной полярностью), кодирует синтез 3-4 структурных белка. Вирусы обладают гемагглютинирующими свойствами

Семейство Flaviviridae включает 3 рода: Flavivirus; Pestivirus; Нерасивирус.

Особенности репродукции Flaviviridae. Проникновение в клетку – путем слияния вирусной и клеточной мембран.Место репродукции –цитоплазма клеток. Механизм выхода из клетки – путем «почкования» через мембранны эндоплазматической цепи

4. Характеристика семейства Caliciviridae

Семейство Caliciviridae вирионы простоорганизованные, $d=27-40$ нм. Построены по кубическому типу симметрии. Геном представлен 1-нитевой РНК (с позитивной полярностью). Геном кодирует синтез 1-2 структурных белков. Гемагглютинирующие свойства не установлены.

Семейство Caliciviridae включает 4 рода: Lagovirus; «Norwalk-like virus»; «Sapporo-like virus»; Vesivirus

Особенности репродукции: проникновение в клетку – путем рецепторного эндоцитоза. Место репродукции – цитоплазма клеток. Механизм выхода из клетки – путем «лизиса» клеточной мембранны.

5. Характеристика семейства Picornaviridae

Семейство Picornaviridae включает 6 родов: Enterovirus; Rhinovirus; Cardiovirus; Aphthovirus; Hepatovirus; Parechovirus.

Характеристика семейства – простоорганизованные, построены по кубическому типу симметрии. Геном представлен 1-нитевой РНК (с позитивной полярностью), кодирует синтез 4 структурных белка. Вирус обладает гемагглютинирующими свойствами.

Enterovirus - поливирус человека, энтеровирус человека, свиней. В основном репродуцируют вирусы в желудочно-кишечном тракте, но также могут накапливаться и в других тканях н-р нервной, мышечной – тогда клинически болезнь проявляется миокардитами, энцефалитами и т.п.

Rhinovirus – риновирус человека. Поражаются преимущественно верхние и нижние дыхательные пути.

Cardiovirus – вирус энцефаломиокардита человека, мышей

Aphthovirus – вирус ящура.

Hepatovirus – вирус гепатита А. Инфицируются преимущественно эпителиальные клетки тонкого отдела кишечника и гепатоциты. Болезнь проявляется лихорадкой, желтухой, нарушениями пищеварения и т.д.

Parechovirus – пареховирус человека. Вирус накапливается в клетках желудочно-кишечного тракта, что сопровождается диареей и часто с признаками поражения респираторного тракта.

Биологические особенности семейства.

Большинство пикорнавирусов специфичны одному или небольшому количеству видов-хозяев. Исключение составляет вирус ящура и вирус энцефаломиокардита. Распространение инфекции происходит горизонтально – алиментарно или аэрозольно. Сведений о существовании членистоногих переносчиков (векторов) нет, хотя вирус энцефаломиокардита выделялся от клещей и москитов.

Обычно инфекция цитолитическая, но персистентная инфекция также часто встречается.

Особенности репродукции пикорнавирусов

Проникновение в клетку – путем рецепторного эндоцитоза

Место репродукции –цитоплазма клеток

РНК вируса инфекционна. Результатом трансляции является полипротеин. Предшественник неструктурных и структурных белков. Нарезание предшественника в основном происходит при помощи вирусной протеазы.

Механизм выхода из клетки – путем «лизиса» клеточной мембранны

1. 9 Лекция № 9 (2 часа).

Тема: «Бактериофаги»

1.9.1 Вопросы лекции:

1. История открытия бактериофагов
2. Строение бактериофагов
3. Формы инфекций, вызываемых фагами.
- 4 Жизненный цикл фага

1.9.2 Краткое содержание вопросов:

1. История открытия бактериофагов

Бактериофаги – вирусы бактерий или просто фаги, были открыты 1916г. Приоритет открытия принадлежит Феликсу Д'Эррелю (канадцу французского происхождения),

работавшему в Институте Пастера. Ф. Д'Эррель работал с возбудителем дизентерии и обратил внимание на то, что если к культуре дизентерийной палочки добавить фильтрат испражнений больного, то бульонная культура светлеет, а в посевах на плотной питательной среде в газоне появляются прозрачные (стерильные) пятна. Пятна появляются и при пересеве этой культуры. Ф. Д'Эррель делает вывод о том, что существует живой корпускулярный инфекционный агент, вызывающий гибель микробных клеток. Ф. Д'Эррель назвал его *Bacteriophagum interstinale*, т.е. выделенный из кишечника пожиратель бактерий. Бактериофаги присутствуют там, где находятся бактерии – почва, вода, кишечник человека, животных, гноевых выделениях и т.д. Фагам присущи все биологические особенности, которыми обладают вирусы животных.

Еще до открытия Д'Эррелем бактериофагов в 1898 год - бактериофаги исследованы российским ученым Николаем Гамалея. В этом же году фаги стали использовать при лечении ран и различных инфекций.

1940-е годы. Везде, кроме СССР разработки бактериофагов вычеркнуты из числа перспективных исследований. В СССР исследования продолжаются. Во всем мире популярность приобретает метод применения антибиотиков.

1980-е годы Эффективность лечения антибиотиками значительно понизилась. Бактерии выработали лекарственную устойчивость. Интерес к фаговой терапии возобновился

Начало 2000-х годов - Гленн Моррис - сотрудник Университета Мэриленд (США) совместно с НИИ бактериофагов, микробиологии и вирусологии в Тбилиси наладил испытания фаговых препаратов для получения лицензии на их применение в США.

Июль 2007 года - Бактериофаги одобрены для использования в США

2. Строение бактериофагов

Смешанная симметрия характерна для сложно организованных крупных фагов, она сочетает оба типа симметрии. Классическим представителем бинарного типа симметрии является бактериофаг T2 паразитирует на *E. coli* имеет следующее строение: головка, построенная по кубическому типу симметрии; хвостовой отросток, представляет собой полый стержень, базальная пластина с 6 шипами и 6 ворсинками.

Головка Т-фагов (бактериофагов) образована из однотипных субъединиц, организованных по принципу кубической симметрии, и может достигать размеров 100 нм. Капсомеры головки состоят из белковых молекул, построенных преимущественно из аспарагиновой и глутаминовой кислот, а также лизина. Содержание белка и ДНК в головке примерно одинаково. Геном большинства фагов образует спирально упакованная двойная нить ДНК. Число фагов, содержащих одноцепочечную молекулу ДНК или РНК, незначительно. У некоторых фагов (например, T2) в головке находится внутренний белок, содержащий полиамины (спермин и путресцин) и обеспечивающий суперспирализацию большой молекулы ДНК. В таком виде она может упаковываться сравнительно небольшом объеме. В составе фаговой ДНК обнаружены необычные азотистые основания (например, оксиметилцитозин).

Белковый чехол хвостового отростка состоит из 144 субъединиц, образующих 24 спирали. Каждая белковая молекула состоит из 1 молекулы АТФазы и иона Ca^{++} . Актиноподобный белок хвостового отростка способен сокращаться, что обеспечивает проникновение стержня через клеточную и цитоплазматическую мембранны. В пластинке и шипах содержится лизоцим. Кроме того хвостовой отросток имеет 6 ворсинок. У неактивного фага они свернуты и прикреплены к белкам чехла. В момент адсорбции фага на поверхности бактериальной клетки ворсинки раскрываются и обеспечивают плотное прикрепление фага к бактериальной клетке. Хвост Т-фагов (бактериофагов) может достигать 250 нм в длину и 25 нм в ширину. Он включает поль - стержень (сконструирован по принципу спиральной симметрии) и сократительный чехол, присоединяющийся к воротничку, окружающему стержень около головки. Чехол

образован 120-140 белковыми молекулами, каждая из которых связывает одну молекулу АТФ и ионы Са²⁺. В дистальном отделе стержня расположена шестиугольная базальная пластина с шестью шипами шестью нитями (фибриллами). У чётных фагов (например, у Т2) окончания фибрилл опущены вниз, а у нечётных — загнуты вверх. У некоторых Т-фагов (бактериофагов) в дистальной части хвоста находится лизоцим (эндолизин).

3. Формы инфекций, вызываемых фагами.

При продуктивной инфекции фаг в клетке размножается и покидает клетку разрушая её.

При редуктивной инфекции фаг проникает в клетку, однако размножение фага не происходит, его геном интегрируется в хромосому клетки-хозяина, становится её составной частью. В результате такой интеграции фаг превращается в профаг, а клетка становится лизогенной. Клетка, несущая профаг называется лизогенной, потому что профаг передающийся клеткой по наследству, может выйти из хромосомы и вызвать продуктивную форму инфекции. Если в результате лизогении т.е. внедрения профага в хромосому клетки, она получает новые признаки, такую форму изменчивости называют лизогенной конверсией. Лизогенная конверсия это изменчивость, обусловленная лизогенией. Лизогенную конверсию способны вызывать только умеренные фаги.

При abortивной инфекции взаимодействие фага с клеткой обрывается на какой-либо стадии и фаг погибает.

4. Жизненный цикл фага

Жизненный цикл фага при продуктивной инфекции, состоит из 6 последовательных стадий, каждая из которых состоит из нескольких этапов.

1. Адсорбция фага на поверхности бактерии, происходит за счет специфических рецепторов — белков — лоцманов. Белки-лоцманы располагаются на кончике нити, шипа или хвостика. Взаимодействие белков-лоцманов происходит с фагоспецифическими рецепторами, расположенными на поверхности бактериальной клетки. Адсорбция фага это пусковой механизм его жизненного цикла. Процесс очень специфичен и позволяет использовать фаги для идентификации бактерий, в лечебных и профилактических целях.

Прикрепление фага к бактерии происходит при помощи поверхностных структур бактериальной стенки, служащих рецепторами для вирусов. Например, рецепторы для фагов Т3, Т4 и расположены в липополисахаридном слое, для Т2 и Т6 — в наружной мембране. На бактериях клеточной оболочки (протопласты, L-формы) бактериофаги не адсорбируются. Некоторые фаги в качестве рецепторов используют F-пили. Помимо рецепторов, адсорбция фага зависит от pH среды, температуры, наличия катионов и некоторых соединений (например, триптофана для Т2-фага). При избытке фага на одной клетке может адсорбироваться до 200-300 вирусных частиц.

2. Проникновение фагового генома через клеточную стенку и цитоплазматическую мембрану внутрь клетки и освобождение его от оболочек т.е. раздевание фага.

После адсорбции происходит ферментативное расщепление клеточной стенки лизоцимом, находящимся в дистальной части отростка. Базальная пластина хвоста лизирует прилегающий фрагмент клеточной стенки, выделяя присутствующий в отростке лизоцим. Одновременно в чехле высвобождаются ионы Са²⁺, активизирующие АТФазу, что вызывает сокращение чехла и вталкивание стержня хвоста через ЦПМ в клетку. Затем вирусная ДНК впрыскивается в цитоплазму (внедрение вирусной ДНК). Поскольку диаметр канала лишь немного превышает диаметр молекулы ДНК (около 20 нм), то ДНК способна попадать в цитоплазму только в форме нити.

3. Установление фаговой нукleinовой кислоты с помощью белка-лоцмана для реализации генетической информации.

4. Репликация фаговой ДНК или РНК. Синтез фаговых белков. В первую очередь синтезируются ферменты, необходимые для образования копий фаговой ДНК. К ним относятся ДНК-полимераза, киназы (для образования нуклеозидтрифосфатов) и

тимицилат синтетаза. Они появляются в клетке через 5-7 мин после её заражения. Клеточная РНК-полимераза транскрибирует вирусную ДНК в мРНК, которая транслируется бактериальными рибосомами в «ранние» белки фага, включая вирусную РНК-полимеразу и белки, способные посредством различных механизмов ограничивать экспрессию бактериальных генов. Вирусная РНК-полимераза осуществляет транскрипцию «поздних» белков (например, белков оболочки и эндолизина), необходимых для сборки фаговых частиц дочернего поколения. Некоторые вирусы расщепляют ДНК клетки-хозяина до нуклеотидов, чтобы использовать их для синтеза собственных нуклеиновых кислот.

5. Сборка вновь синтезированных вирионов.

6. Выход дочерних популяций бактериофага

Вновь синтезированные белки формируют в цитоплазме пул предшественников, входящих в состав головок и хвостов дочерних вирусных частиц. Другой пул содержит ДНК потомства. Специальные аффинные области в вирусной ДНК индуцируют объединение предшественников головок вокруг агрегатов нуклеиновой кислоты и образование ДНК-содержащих головок. Заполненная головка затем взаимодействует с хвостовой частью, образуя функциональный фаг. Весь процесс (от адсорбции до появления вновь синтезированных вирусов) занимает около 40 мин. После образования потомства («урожай», или выход фага, составляет 10-200 из одной инфицирующей частицы) клетка хозяина лизируется, высвобождая дочернюю популяцию.

Выход вновь синтезированных фагов из клетки: а) путем лизиса клетки изнутри, который осуществляется свободным лизоцимом; б) путем почкования выходит единственный фаг M13, не вызывающий при выходе из клетки ее гибели.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Правила работы с вирусодержащим материалом. Учет и хранение вирусов в лаборатории»

2.1.1 Цель работы: ознакомиться с правилами и техникой безопасности при работе с вирусодержащим материалом, документацией по приему, учёту, хранению и утилизации вирусов.

2.1.2 Задачи работы:

1. Изучить предназначение вирусологической лаборатории и требованиями к её устройству.
2. Ознакомиться с правилами работы с вирусами и организацией рабочего места.
3. Ознакомиться с журналами и правилами их заполнения.

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблица структура вирусологической лаборатории
2. Журнал регистрации студентов получивших инструктаж по технике безопасности при работе с вирусодержащим материалом.
3. Журнал учета поступающего в лаборатории патологического материала.

2.1.4 Описание (ход) работы:

Вирусологические лаборатории или отделы при районных, межрайонных, областных, краевых и республиканских ветеринарных диагностических лабораториях выполняют 1)диагностику вирусных болезней, 2) контроль за заболеваемостью животных, 3) определяют состояние и напряженность постинфекционного и поствакцинального иммунитета, 4) участвуют в организации и проведении профилактических мероприятий и ликвидации вирусных болезней.

Организация и структура вирусологической лаборатории определяются задачами и особенностями ее деятельности, которые обусловлены повышенной опасностью вирусных инфекций и необходимостью специальных условий для диагностических исследований. Существует общий для всех диагностических лабораторий минимум требований без которых невозможно проведение вирусологических исследований.

Вирусологическая лаборатория или вирусологический отдел при бактериологической лаборатории должны иметь следующие подразделения: подготовительный отдел (моющая, биохимическая лаборатория, дезинфекционная), отдел культивирования клеток и тканей, помещение для работы с РЭК, виварий, боксы для работы с вирусами, помещения для идентификации вирусов (серологические лаборатории), помещение для приема патологического материала. Лаборатория должна быть изолирована от других лабораторий и вспомогательных отделов.

Все рабочие процессы, начиная с мойки посуды и кончая инактивацией использованного материала, должны осуществляться только в вирусологическом отделе.

Правила техники безопасности при работе с вирусами и вирусодержащим материалом предусматривают следующие меры: обеспечение безопасности персонала от заражения вирусами при работе с вирусодержащим материалом; исключение возможности рассеивания вирусов в окружающей среде; предотвращение возможности загрязнения (контаминации) вирусов и вирусодержащего материала другими микроорганизмами.

В вирусологических лабораториях установлен специальный режим.

1. Все работы с вирусами, вирусодержащим материалом выполняют только в специальных комнатах (боксах). Причем каждый бокс должен иметь предбоксник, который от него отделен стеной с герметичной дверью, чтобы исключить циркуляцию воздуха.

Бокс и предбоксник должны быть оснащены ультрафиолетовыми бактерицидными лампами: 6 ламп на 12 м² площади. Во время работы в боксе их выключают, а при кратковременном пребывании надевают защитные очки.

2. В боксах работают только в защитной одежде (стерильный 2-ой халат, маска, шапочка) и сменной обуви; в некоторых случаях надевают очки и перчатки. После окончания работы спецодежду снимают – халат, чепчик, повязку помещают в контейнер для стерилизации, очки протирают и помещают в банку для хранения очков, руки в перчатках 2-кратно погружают в дезраствор, в этот же день перчатки необходимо промыть, просушить и проверить на целостность. После окончания работы весь бокс, инструменты, предметы немедленно подвергают дезинфекции.

3. Все окна вирусологической лаборатории должны быть затянуты сеткой для предупреждения проникновения мух и других насекомых. Полы должны быть выстланы плиткой или линолеумом, не имеющим трещин.

4. Воздух в боксах должен быть стерильным, а давление несколько выше, чем атмосферное.

5. Остатки вируссодержащего материала помещают в специальный контейнер с дезинфицирующим раствором.

6. Вирусологические лаборатории должны иметь отдельный сток со специальным сборником, из которого сточные воды поступают в дезинфекционный котел для термодезинфекции; сточные воды не должны попадать в общую канализацию.

7. Для предохранения вирусного материала от микробного загрязнения используют стерильные инструменты, посуду и антибиотики. Вирусологические лаборатории должны быть оснащены высококачественным оборудованием, инструментами и посудой: холодильники, термостаты, центрифуги, сушильные шкафы, автоклавы, микроскопы (световые, люминесцентные, электронные), магнитные мешалки, штативы для пробирок, подставки для куриных эмбрионов, стеклянная посуда и др.

8. Для работы с вирусами в боксе необходимо организовать рабочее место:

1. На стол расстилают 4-х-слойную марлю смоченную 5% р-ром хлорамина – это защищенная поверхность стола.

2. Все необходимые для работы предметы вносят в бокс и размещают на защищенной поверхности стола.

3. По окончании работы все выносимые из бокса предметы снаружи протирают дезраствором, весь отработанный материал помещают в контейнер, контейнер опечатывают и переносят в моечную, дезинфекционную, автоклавную, марлю, покрывающую рабочую поверхность стола помещают в дезраствор, поверхность стола протирают дезраствором.

4. Жидкости переливают только над кюветом. Излишки из пипеток удаляют в вату смоченную в дезрастворе.

9. Один раз в неделю в боксе проводят контроль бак. загрязненности - оставляют чашки Петри со средой на 30-60 мин, - затем чашки инкубируют в термостате в течение суток при 37°C. Положительный результат бак контроля - рост колоний более 10 на 1 чашки Петри. Отрицательный результат бак контроля - нет роста колоний или менее 10.

10. Источники внутри лабораторных заражений:

1. Клинические пробы

2. Работа с инфицированными животными

3. Возникновение аэрозолей: работа с пипетками, шприцами, ампулами, зараженной культурой клеток, интраназальной заражение животных

4. Дезинфекция посуды и спецодежды

5. Несчастный случай, авария

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «Правила получения и транспортировки вирусодержащего материала. Методы консервирования»

2.2.1 Цель работы: ознакомиться с техникой взятия, упаковки и транспортировки, сохранения и подготовки вирусодержащего материала для заражения лабораторных животных, куриных эмбрионов, культуры клеток, ознакомиться с методами консервирования вирусов

2.2.2 Задачи работы:

1. Выполнить подготовку посуды для транспортировки патологического материала
2. Приготовить 50% раствор глицерина для консервирования вирусодержащего материала.
3. Приготовить охлаждающую смесь.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Пеницилловые флаконы, фарфоровые ступки с пестиками, центрифужные пробирки резиновые пробки, пинцеты, спиртовки.
2. Глицерин, 0,85 %-ный раствор NaCl, лед, поваренная соль.
3. Пеницилловые флаконы с кусочками паренхиматозных органов, залитых раствором Хенкса и замороженных, стерильные фарфоровые ступки с пестиками, стерильный стеклянный песок, стерильные чашки Петри (по две на рабочее место), стерильные центрифужные пробирки (количество их соответствует числу рабочих мест), раствор Хенкса, пенициллин, стрептомицин, МПА, МПБ в пробирках на каждое рабочее место, стерильные пеницилловые флаконы, стерильные резиновые пробки, пинцеты, спиртовки, центрифуга, бумажные фильтры

2.2.4 Описание (ход) работы:

В лабораторной диагностике вирусных болезней точность диагноза прежде всего зависит от правильности взятия патологического материала, его транспортировки, качества приготовления и техники исследования вирусодержащего материала.

Материал для исследования от заболевших, павших или вынужденно убитых животных следует брать сразу при появлении выраженных признаков болезни или не позже 2-3 ч после клинической смерти или убоя. В поздние сроки болезни количество вируса может снизиться в результате воздействия защитных механизмов организма.

Общий принцип взятия патматериала основан на четком представлении о патогенезе предполагаемой инфекции и преимущественной локализации вируса в тех или иных органах или тканях, а также на знании тропизма вируса, входных ворот, путей распространения в организме, путей и сроков выделения из организма.

При респираторных инфекциях (грипп, болезнь Аусеки, парагрипп, ларинготрахеит, инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота) для выделения вирусов из организма больного животного берут носоглоточные смывы, мазки из носа и глотки; для выделения энтеровирусов - кал; дермотропных агентов - свежие поражения кожи; при ящуре и осипе - стенки афт, содержимое везикул, пустул; при чуме - кровь и др.

Мазки с конъюнктивы, слизистой оболочки носа, задней стенки глотки, прямой кишки и клоаки у птиц берут стерильными ватными тампонами, которые погружают в пеницилловые флаконы или пробирки, содержащие 3...5 мл соответствующей жидкости (раствор Хенкса или среда для культур клеток с антибиотиками - пенициллином или стрептомицином из расчета по 500 ЕД на 1 мл среды).

Вытекающую изо рта слюну можно собирать в пробирку. Если ее выделяется мало, то пропитывают слюной стерильный тампон на палочке, который затем помещают в пробирку с небольшим количеством физиологического раствора.

Мочу собирают с помощью катетера в стерильную посуду. Фекалии берут из прямой кишки с помощью шпателя или палочки и затем помещают в стерильную пробирку или пенициллиновый флакон.

Стенки афт, корочки с поверхности кожи снимают пинцетом. Спинномозговую жидкость берут асептично с помощью пункции.

Для ретроспективной диагностики от каждого животного берут кровь дважды: первый раз в начале или в разгар болезни, второй раз через 2...3 недель после первого в зависимости от инфекции. Сыворотки крови используют для постановки различных серологических реакций.

После смерти животного особенно важно как можно быстрее взять, соблюдая стерильность, кусочки органов, чтобы избежать посмертных изменений тканей (аутостерилизация), а также бактериального обсеменения.

В качестве патологического материала чаще всего берут кусочки тех органов (размером в несколько кубических сантиметров), которые имеют видимые отклонения от нормы (форма, размер, цвет, консистенция, наличие необычных образований); могут быть поражены или содержать вирус на основании клинической картины болезни перед смертью или наиболее часто содержат вирус - печень, селезенка, легкие, головной мозг, лимфатические узлы и почки.

В качестве охлаждающей смеси используют смесь равных частей сухого льда (твёрдая углекислота) и этилового спирта, тогда температура минус 71 °С держится несколько дней. Можно использовать смесь, состоящую из трех весовых частей льда или снега и одной весовой части поваренной соли. В последнем случае удается получить температуру минус 15... 20 °С. Вместо замораживания можно использовать химические консерванты, но это менее эффективно. Лучшим из них считается смесь равных объемов стерильного глицерина и 0,85%-ного раствора поваренной соли (изотонический раствор). Обычно эту смесь рекомендуют использовать для консервирования кусочков паренхиматозных органов и тканей.

На результат исследований влияют время взятия патологического материала, время транспортировки, метод консервирования, время транспортировки, техника приготовления и методика исследования материала. Для консервирования органов и тканей используют 50%-ный раствор глицерина приготовленный на изотоническом растворе натрия хлорида или растворе фосфатного буфера. Он смешивается с большинством компонентов живой клетки. В него быстро диффундирует вода и электролиты, а сам он легко проникает в другие растворы и гели и не переходит в твердое состояние при низких температурах - минус 110 °С. В качестве консерванта можно использовать 5-20 % -ный раствор Na Cl, 0,1 молярный раствор Ca Cl. Для консервирования жидкостей - 1-10 %-ные растворы моно- и дисахаров, обезжиренное молоко (10-30%), желатин (0,5-1,5 %), инактивированная сыворотка. Консервировать патологический материал можно замораживанием. Замораживание осуществляют в 4 температурных режимах: - высоком (около 0 °С), среднем (-10 -80 °С), низком (-80 -150 °С), очень низком (ниже - 150 °С). Консервирование вирусов можно проводить методом высушивания: а) лиофилизацией - это высушивание в вакуме из замороженного соскоба; 2) высушивание в потоке горячего воздуха. При консервировании высушиванием вирус сохраняется в течение нескольких лет. Такой способ высушивания используется при длительном хранении вируса.

Подготовка органов и тканей к исследованию.

Вирус необходимо освободить из органов и тканей и перевести в фосфатный буфер или раствор Хенкса. Для этого материал тщательно измельчают ножницами, растирают в ступке с кварцевым песком (добавлять толченное стекло менее желательно, так как оно обладает щелочными свойствами и может инактивировать часть вирусных частиц). Из растертого материала готовят 10% суспензию на фосфатном буфере или растворе Хенкса.

Полученную суспензию центрифугируют 1,5-3 тыс. об/ мин в течение 10-15 мин. Надосадочную жидкость отбирают в стерильные флаконы и освобождают от микрофлоры:

1) обрабатывая антибиотиками (пенициллин, стрептомицин, нистатин, тетрациклин и др.) в дозе 100- 1-2 тыс. ЕД / мл в зависимости от характера материала. Избыток антибиотиков не желателен т.к. при последующем культивировании вируса в культуре клеток он может вызвать их неспецифическую деградацию; Экспозиция с антибиотиками 30-60 мин при комнатной температуре.

2) фильтруя через бактериальные фильтры.

После освобождения от бактериальной микрофлоры ставят бактериологический контроль - посев на питательные среды: МПА, МПБ, Сабуро и др. После получения отрицательного результата бактериологического контроля ВСМ используют для выделения вируса в чувствительных биосистемах.

При положительно результате бактериологического контроля – рост колоний на питательных средах – обработку антибиотиками повторяют и снова ставят бактериологический контроль. На время постановки бактериологического контроля ВСС хранят в холодильнике.

2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Тема: «Действие на вирусы физических и химических факторов»

2.3.1 Цель работы: ознакомиться с действием физических (температура, у-ф, и-к, рентгеновского излучения, γ -лучей) и химических (кислот, щелочей, ферментов) факторов на вирионы, изучить методы инактивации вирусов.

2.3.2 Задачи работы:

1. Изучить механизм действия на вирусы физических и химических факторов
2. Провести обеззараживание патологического материалов путем автоклавирования
3. Провести обеззараживание посуды в сухожаровом шкафу
4. Провести стерилизацию инструментов путем кипячения

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Автоклавы, сухожаровые шкафы.
2. Пробирки с вируссодержащим патологическим материалом, колбы с вируссодержащим материалом, контейнеры с инструментами.
3. Раствор 2% КОН, 3 % H_2SO_4 .

2.3.4 Описание (ход) работы:

Разные группы вирусов обладают неодинаковой устойчивостью во внешней среде. Наименее устойчивыми являются вирусы, имеющие липопротеидные оболочки, наиболее устойчивыми – изометрические вирусы. Так, например, ортомиксовирусы и парамиксовирусы инактивируются на поверхностях в течение нескольких часов, тогда как вирусы полиомиелита, адено-вирусы, реовирусы сохраняют инфекционную активность в течение нескольких дней. Однако из этого общего правила имеются и исключения. Так, вирус оспы устойчив к высыханию и сохраняется в экскретах в течение многих недель и месяцев. Вирус гепатита В устойчив к действию неблагоприятных внешних факторов и сохраняет свою активность в сыворотке даже при кратковременном кипячении.

Чувствительность вирусов к ультрафиолетовому и рентгеновскому облучению зависит преимущественно от размеров их генома. Поэтому, например, вирус осповакцины (молекулярная масса генома около 2×10^8) инактивируется при рентгеновском облучении около 5×10^4 рад, в то время как мелкий вирус папилломы (молекулярная масса генома 3×10^6) для инактивации требует облучения 4×10^5 рад. Чувствительность вирусов к инактивации формальдегидом и другими химическими веществами, инактивирующими

генетический материал, зависит от многих условий, среди которых следует назвать плотность упаковки нуклеиновой кислоты в белковый футляр, размеры генома, наличие или отсутствие внешних оболочек и т.п. Вирусы, имеющие липопротеидные оболочки, чувствительны к эфиру, хлороформу и детергентам, в то время как просто устроенные изометрические и палочковидные вирусы устойчивы к их действию. Наконец, важной особенностью вирусов является чувствительность к рН. Есть вирусы, устойчивые к кислым значениям рН (2,2-3,0), например, вирусы, вызывающие кишечные инфекции и проникающие в организм алиментарным путем. Однако большинство вирусов инактивируется при кислых и щелочных значениях рН.

Физические и химические факторы воздействия на вирионы могут привести к изменению их физических свойств, химического состава, инфекционного титра. Изменение инфекционных свойств вируса может быть связано с повреждением генома.

1. Влияние химических и физических факторов на вирионы.

Цельные вирионы в большинстве случаев очень устойчивы к действию нуклеаз и различных протеаз. На этом основана очистка вирусов от присутствующих в вирусных препаратах нуклеиновых кислот. Разные ферменты на разные вирусы действуют по-разному. Например X-вирус картофеля и ряд других вирусов растений, но не инактивирует ВТМ, вирус полиомиелита, бактериофаги. Следует, подчеркнуть, что воздействие протеолитических ферментов на вирусы не сводится только к возможности инактивации их инфекционных свойств. Так, например, карбоксипептидаза, не инактивирует инфекционных свойств очищенного ВТМ, а изменяет его серологические свойства.

Среди различных агентов и факторов, которые вызывают денатурацию белка, для изучения организации вирионов наиболее часто используют следующие:

- синтетические детергенты, как, например, лаурилсульфат натрия;
- мочевину и гуанидин, которые вызывают главным образом разрыв водородных связей;
- высокие и низкие значения рН.

Разные вирусы обладают разной чувствительностью к действию детергентов. Так, вирусы, имеющие суперкапсидную оболочку (ортомиксовирусы, парамиксовирусы, тогавирусы, герпесвирусы) легко инактивируются синтетическими детергентами, а также растворителями липидов, например, эфиром или хлороформом. Воздействие этих веществ на вирионы приводит к их распаду. В результате в среду выходит капсид и нуклеиновая кислота в виде частиц различной степени агрегации. Это используется при химическом фракционировании вирусов. Мочевина или гуанидин, также как и анионные детергенты или фенол, могут быть использованы для дезинтеграции вирионов ВТМ и других вирусов и освобождения интактной, инфекционной нуклеиновой кислоты. Дезинтеграция детергентами может быть ступенчатой и под электронным микроскопом можно наблюдать частично депротеинизированные вирионы с изливающимися нуклеиновыми кислотами. Щелочи при воздействии на вирус табачной мозаики приводят к отделению белковых субъединиц различной степени агрегации. Но если белковые фрагменты смешать при рН 6,0 и с очищенной интактной РНК ВТМ, то происходит реагрегация и вновь образуются вирионы, обладающие относительно высокой инфекционностью.

Формальдегид - легко инактивирует вирионы, сохраняя их антигенные свойства, что используется для получения вакцин. Подавляется инфекционность при любом значении рН. Скорее всего это связано с его взаимодействием с аминогруппами и рибозными остатками нуклеиновых кислот. Инактивация зависит от времени воздействия, концентрации инактивирующего агента и объема или массы, на который воздействует агент. Зависимость не всегда прямая.

Физические факторы:

- а) Нагревание. При комнатной температуре вирусы, находящиеся в естественных тканевых экстрактах и специальных средах довольно устойчивы. Снижение их

инфекционности начинается при температуре 50-60 $^{\circ}\text{C}$. Денатурация белков идет уже с заметной скоростью. Однако, существуют и различия между разными вирусами в отношении их чувствительности к температуре. Так, например, вирус табачной мозаики инактивируется лишь при температуре 70 $^{\circ}\text{C}$, а вирус желтухи астр при температуре 32 $^{\circ}\text{C}$. Возможно потеря инфекционных свойств вируса вследствие денатурации и коагуляции белка. Чувствительность к температуре зависит от свойств среды в которой находится вирус. Очищенные препараты более чувствительны, чем неочищенные. Это связано также с воздействием окисляющих агентов, которое усиливается при повышении температуры.

б) Механические и другие виды воздействия. Встряхивание, например, в гомогенизаторе, оказывают на вирионы меньше влияния, чем изменения поверхностного натяжения. Изменение осмотического давления мало влияют на сохранность вируса. Обработка ультразвуком (10-12 тыс. кГц в минуту) приводит к разрушению вирионов со спиральным типом симметрии и мало действуют на вирусы с кубическим типом симметрии. Некоторые вирусы (нечетные фаги, РНК - содержащие фаги) легко переносят высушивание при комнатной температуре. Многие вирусы хорошо сохраняются в лиофилизированном состоянии. Еще лучше вирусы сохраняются в сыворотке крови или в среде, содержащей глицерин.

в) Излучения занимают особое место среди физических факторов, действующих на вирусы. Прежде всего рассмотрим электромагнитные излучения, т.е. инфракрасные, видимые, ультрафиолетовые, рентгеновские и гамма-лучи; все эти лучи отличаются друг от друга лишь длиной волны. При облучении вещество бомбардируется потоком квантов. Если энергия кванта достаточно велика (10 электроновольт), то под действием излучений из атома может быть выбит электрон, что приводит к химическому изменению вещества – превращению атома в положение заряженный ион. Этот процесс называется ионизацией (вызывают рентгеновские и гамма-лучи). Молекула, из которой выбит электрон, может подвергнуться химическому изменению. Вероятность такого изменения весьма велика. У ультрафиолетовых, видимых и инфракрасных лучей энергия кванта недостаточна для ионизации веществ. Такие неионизирующие излучения способны вызвать только возбуждение, т.е. поднимать электроны на более высокие энергетические уровни. Возникающие при этом перестройки электронных оболочек также могут приводить к химическим изменениям, но со значительно меньшей вероятностью. Поглощение ионизирующих лучей происходит неселективно, т.е. всеми атомами и молекулами вещества. Ультрафиолетовые и видимые лучи поглощаются только теми электронами энергия возбуждения которых соответствует энергии кванта. У органических соединений это валентные электроны. Результатом поглощения излучений является образование возбужденных или ионизированных атомов и молекул. Так как процесс поглощения носит локальный характер, химические изменения возникают в отдельных дискретных участках объекта, т.е. в разных частях вирусной частицы могут проявляться повреждения, приводящие к утрате свойств вируса.

При действии ионизирующего облучения на биологический объект оно может поглощаться либо непосредственно самим объектом (первичные фотохимические реакции), либо средой. В среде образуются вещества, которые будут действовать на объект (вторичные эффекты). Вирусы суспендированные в водные и солевые растворах инактивируются быстрее, чем неочищенные препараты

2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).

Тема: «Методы диагностики вирусных болезней»

2.4.1 Цель работы: ознакомиться с методами лабораторной диагностики вирусных инфекций и последовательностью их выполнения.

2.4.2 Задачи работы:

1. Определить значение разных групп методов для диагностики вирусных болезней.

2. Провести оценку результатов ретроспективной диагностики

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблицы по определению титра антител в сыворотке крои

2.4.4 Описание (ход) работы:

Современная вирусология обладает широким выбором средств обнаружения, культивирования и идентификации вирусов, что позволяет своевременно установить причину и характер заболевания, распознать и определить болезнь, т. е. поставить диагноз. Для постановки диагноза необходимо собрать фактические данные о проявлениях заболевания и анамнезе животных, произвести сопоставление и анализ информации и только после этого сделать заключение о болезни. Своевременно и точно поставленный диагноз предопределяет успех борьбы с болезнью.

В большинстве случаев постановка диагноза начинается со сбора данных об эпизоотической обстановке, клинических признаках болезни и патологоанатомических изменениях. Эпизоотическую обстановку характеризуют сведения об источнике возбудителя, механизмах и скорости распространения болезни, об охвате поголовья заболевших животных, о случаях падежа, сезонности, наличии переносчиков инфекции, массовых прививках, перегруппировках и др. Клинические признаки болезни включают данные о температуре, пульсе, дыхании, поведении животного, состоянии кожных покровов, характере приема корма и т. д. Патологоанатомические изменения включают сведения об отклонениях от нормы размеров, формы, цвета, консистенции органов и тканей, а также появлении образований – узелков, кровоизлияний, пузырей и т. д.

Тщательный анализ всей информации позволяет поставить клинико-эпизоотологический диагноз, который носит только предварительный характер, так как многие признаки совпадают, т. е. являются общими при различных заболеваниях.

Для того чтобы поставить окончательный диагноз, необходимо располагать данными лабораторных исследований вируссодержащего материала, взятого от больных животных или трупов. Лабораторные исследования проводят независимо от предварительного диагноза. Их значение возрастает особенно в том случае, когда заболевание протекает атипично или в виде смешанной инфекции, а также при расшифровке этиологии новых, ранее неизвестных заболеваний.

Лабораторные методы диагностики вирусных инфекций, как и бактериальных, основаны на обнаружении в патологическом материале возбудителей на острой стадии болезни и на выявлении прироста противовирусных антител у животных-реконвалесцентов (переболевшие и выздоравливающие).

В лабораторию следует направлять такой материал, который с наибольшей вероятностью может содержать возбудителей болезни. При взятии патологического материала необходимо соблюдать следующие правила: 1) материал берут строго асептически, так как наличие в пробах других микроорганизмов ведет к разрушению вирусов. Применение дезинфицирующих средств недопустимо; 2) материал немедленно консервируют, чтобы предотвратить разрушение вирусов ферментами и другими факторами. Это достигается его замораживанием в термосе с охлаждающей смесью или добавлением 50%-го стерильного глицерина (химически чистый глицерин смешивают пополам с физиологическим раствором и стерилизуют в автоклаве при 120 °C в течение 30 мин; pH раствора доводят до 7,2-7,6. Кусочки органов должны быть полностью покрыты раствором глицерина); 3) на пробирке, флаконе с материалом должна быть несмыываемая этикетка, на термосе - бирка. Нарочномудается сопроводительное письмо с указанием названия хозяйства, больных животных, предварительного диагноза, вида и количества патматериала, четко сформулированной просьбы, на что провести исследования, даты и фамилии врача

Патологический материал берут в стерильную посуду (пробирку, флакон с резиновой пробкой) в небольшом количестве - 5-10 г. В зависимости от клинических признаков болезни и локализации возбудителя от больного животного прижизненно берут следующие пробы: слону, глазные и носовые истечения; содержимое везикул и пустул; стенки везикул и корочки на коже; фекальные массы непосредственно из прямой кишки, мочу; кровь или сыворотку крови, взятые дважды - в начале болезни и через 2-3 недель.

От трупов патологический материал берут не позднее 2-3 ч после клинической смерти или вынужденного убоя животного: это кусочки пораженных органов и тканей, в первую очередь из печени, селезенки, легких, головного мозга, лимфатических узлов, в которых вирусы чаще всего локализуются.

Лабораторная диагностика вирусных болезней включает: 1) экспресс-методы; 2) вирусологические методы; 3) серологические (ретроспективная диагностика).

Экспресс-методы позволяют в короткие сроки обнаружить в патологическом материале вирусы в неактивной форме, а именно вирусные антигены, тельца-включения и элементарные тельца.

Для обнаружения вирусных антигенов в патологическом материале используют наиболее чувствительные методы, так как их концентрация в нем обычно низкая. Наибольшее распространение получила реакция иммунофлуоресценции (РИФ). Для этого на мазки-отпечатки или срезы из патматериала наносят меченные флуорохромами гипериммунные сыворотки, при этом образуются светящиеся иммунные комплексы. Препараты просматривают с помощью люминесцентного микроскопа. Этот метод флуоресцирующих антител отличается быстротой и очень высокой чувствительностью. Однако его результаты требуют подтверждения другими методами из-за возможного неспецифического свечения.

Вирусные гемагглютинины в патматериале обнаруживают с помощью реакции гемагглютинации (РГА). Гемагглютинин - это белок, расположенный в оболочке вируса. Явление гемагглютинации обусловлено склеиванием эритроцитов крови с помощью вируса. Механизм его состоит в том, что одна вирусная частица с помощью своего гемагглютинина адсорбируется одновременно на двух эритроцитах, образуя «мостик» между ними, в результате чего эритроциты склеиваются между собой и выпадают в осадок в виде раскрытоого зонтика.

Тельца-включения и элементарные тельца вирусов указывают на присутствие вирусов в патологическом материале. Тельца-включения - это внутриклеточные элементы, образующиеся в клетках как результат репродукции в них некоторых вирусов (около 100 вирусов). Как правило, РНК-вирусы образуют цитоплазматические включения, ДНК-вирусы - внутриядерные. Тельца-включения, образуемые вирусом осповакцины, называют тельцами Гварниери, оспы овец - Борреля, оспы кур - Боллингера, чумы плотоядных - Лейтца, инфекционного ларинготрахеита кур - Зейфреда. Наиболее известны и имеют практическое значение тельца Бабеша-Негри, образуемые вирусом бешенства в цитоплазме нервных клеток: на их обнаружении основан один из методов лабораторной диагностики бешенства. Для этого из определенных отделов головного мозга (аммоновы рога, мозжечок, продолговатый мозг) подозреваемого на заболевание бешенством животного приготовляют гистологические срезы или препараты-мазки. Срезы окрашивают по Муромцеву (Туревичу, Селлерсу и др.), препараты-мазки обрабатывают меченой флуорохромом иммунной сывороткой. Гистосрезы просматривают под световым микроскопом, препараты-мазки - под люминесцентным микроскопом. Если в серии препаратов будут обнаружены тельца Бабеша-Негри, то наличие вируса бешенства считается доказанным. Обнаружение телец-включений при других вирусных болезнях имеет лишь вспомогательное диагностическое значение.

Крупные вирусы, названные в свое время элементарными тельцами, в патологическом материале обнаруживают под обычным световым микроскопом после их обработки солями тяжелых металлов (например, элементарные тельца при оспе).

Вирусологические методы предназначены для обнаружения активных форм вируса путем его выделения на живых биологических системах – культурах клеток и тканей, развивающихся куриных эмбрионах и лабораторных животных.

Для этого из патологического материала делают 10%-ю суспензию на стерильном физиологическом растворе ($\text{pH } 7,2\text{--}7,4$), затем освобождают ее от крупных частиц путем центрифугирования в течение 20...30 мин при оборотах $2000\text{--}3000 \text{ мин}^{-1}$. Для подавления бактериальной микрофлоры к суспензии добавляют смесь антибиотиков (обычно пенициллин и стрептомицин по 200-1000 ЕД каждого на 1 мл жидкости и нистатин) или для очистки пропускают ее через бактериальные фильтры. Эффективность такой обработки суспензии контролируют с помощью посевов ее на специальные питательные среды (для аэробов и анаэробов). Полученной и обработанной таким образом суспензией заражают живые биологические системы и регистрируют появление у них признаков репродукции вируса, что служит показателем наличия вируса в патматериале. Однако вирус не всегда проявляет свое действие в первом пассаже и иногда требуется провести 2...3 «слепых» пассажа, чтобы вирус адаптировался к биологической системе и накопился в достаточном количестве для проявления своего действия.

Прежде всего заражают культуры клеток. Для этого в пробирки, флаконы или матрасы с выросшим монослоем клеток вносят небольшое количество суспензии для осуществления контактирования на 80-90 мин (для адсорбции и проникновения вируса в клетки), затем добавляют поддерживающую питательную среду, которая не обеспечивает дальнейшего размножения клеток; флаконы, пробирки и матрасы помещают в условия, благоприятные для инкубации. Происходит репродукция вируса в клетках. Пораженные вирусом клетки погибают, разрушаются, новое поколение вирусов выходит в культуральную жидкость, и происходит заражение новых клеток, из них - в следующие и так до тех пор, пока есть живые клетки. Обнаружение вируса в культуре клеток производят под малым увеличением светового микроскопа по цитопатическому действию (ЦПД) или эффекту (ЦПЭ). ЦПД - это любые изменения (дегенерация, гибель) клеток под влиянием размножающегося в них вируса. Формы ЦПД разнообразны - от едва заметных изменений в цитоплазме до полного распада клеток на фрагменты.

Обнаружение вируса, обладающего гемагглютинирующими свойствами, в культуре клеток возможно методом гемадсорбции. Гемадсорбция - это прилипание эритроцитов к поверхности клеток, зараженных гемагглютинирующим вирусом. Для наблюдения гемадсорбции необходимо из пробирки, флакона и т. д. с зараженной вирусом культурой клеток удалить культуральную жидкость добавить 2...3 капли 2,5%-й суспензии эритроцитов. Пробирки, флаконы оставляют в горизонтальном положении в течение 10 мин, затем слой клеток споласкивают физраствором, чтобы смыть эритроциты. Если в зараженной культуре клеток происходит репродукция вируса, то на таких клетках под микроскопом видны адсорбировавшие эритроциты.

Большое значение имеет другая биологическая система для выделения вирусов – живые куриные эмбрионы 5-13 суточного возраста. Вирусы в них могут размножаться в клетках самого зародыша, на хорион-аллантоисной оболочке, в стенках желточного мешка, накапливаясь в этих же структурах и в жидкостях аллантоисной и амниотической полостей. Признаками размножения вируса в куриных эмбрионах являются их гибель и патологоанатомические изменения на эмбриональных оболочках и структурах. Куриные эмбрионы чувствительны к большинству вирусов птиц и некоторым вирусам млекопитающих (грипп, оспа, чума и др.).

В качестве биологической системы для выделения вирусов также используют лабораторных животных (белые мыши, белые крысы, хомячки, морские свинки, кролики, птицы и др.). Существует большое количество методов введения инфекционного материала. Выбор метода заражения зависит от тропизма вирусов и чувствительности животного. За зараженными животными устанавливают контроль, отмечая изменения в их поведении, сроки появления специфических признаков болезни. Признаками репродукции

вирусов в организме животных являются их гибель, клинические признаки болезни и патологоанатомические изменения в бронхах и тканях. При отсутствии моделей лабораторных животных при некоторых вирусных болезнях для выделения вирусов используют естественно-восприимчивых животных.

После выделения вирусов из материала от больного животного необходимо их идентифицировать, т. е. определить вид вируса Его идентификацию проводят с помощью реакции диффузной преципитации (РДП) в агаровом геле. Но для постановки этой реакции у вирусного антигена и гипериммунной сыворотки должны быть высокие титры, так как РДП обладает сравнительно низкой чувствительностью.

Большое значение для идентификации выделенного вируса приобрела реакция связывания комплемента (РСК) с разными разведениями известных сывороток и несколькими дозами комплемента; предпочтительно на холоде (18-20 ч при температуре 2-4 °C).

Реакция нейтрализации (РН) обладает высокой специфичностью. Она наиболее универсальна и обеспечивает достоверные результаты при идентификации выделенных вирусов. Вместе с тем постановка РН отличается трудоемкостью.

Вирусы являются антигенами, так как их белковая оболочка вызывает выработку специфических антител. Антитела накапливаются в основном в сыворотке крови. Они способны соединяться в комплекс антиген + антитело только со своим антигеном. Если антиген – инфекционный агент (вирус), антитела его нейтрализуют: в этом состоит биологическая роль антител.

Взаимодействие антител со своими антигенами возможно не только в живом организме, но и в пробирке. На этом основаны серологические реакции (от лат. *serum* – сыворотка). Если взятая пара АГ (антиген) и АТ (антитело) гомологичны или соответствуют друг другу, то в пробирке они образуют комплекс АГ+АТ. Это позволяет обнаружить по известному антителу неизвестный антиген. А если брать сыворотку в разведениях, то можно установить и титр антител в ней. Идентификация неизвестного антигена возможна также путем испытания его с различными антителами.

Обычно источником антител служит сыворотка крови животных и людей, иммунизированных искусственным или естественным путем определенными вирусными антигенами. Атигеностью у вирусов обладают их белки. Поэтому в серологических реакциях в качестве вирусного антигена используют корпускулярный антиген в виде суспензии вирусов или растворимые белки вирусов.

Широкое распространение нашли следующие серологические реакции: 1) нейтрализации (РН); 2) торможения гемагглютинации (РТГА); 3) непрямой гемагглютинации (РНГА); 4) связывания комплемента (РСК); 5) диффузной преципитации (РДП); 6) торможения гемадсорбции (РТГАд); 7) иммунофлюоресценции (РИФ). Все эти реакции различаются между собой методом определения образовавшегося комплекса антиген + антитело или тем, что комплекс вообще не образовался.

При серологической (ретроспективной) диагностике исследованиям подлежат сыворотки больных животных и людей. Обычно используют парные сыворотки, для получения которых от каждого животного (человека) кровь берут дважды с интервалом в 2...3 нед: в начале, т. е. в острой стадии, и в конце болезни, т. е. в период реконвалесценции. Сроки взятия крови варьируют в зависимости от особенностей течения болезни. Взятие крови и получение из нее сыворотки осуществляют в асептических условиях, так как сыворотки должны быть стерильными. До исследования сыворотки хранят в пробирках под пробками в холодильнике или в замороженном состоянии.

2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

Тема: «Индикация вирусов в патматериале путем обнаружения вирионов и телец-включений»

2.5.1 Цель работы: ознакомиться с методами лабораторной диагностики, световой микроскопии, а также техникой приготовления и способами окрашивания мазков, препаратов-отпечатков и гистосрезов для выявления внутриклеточных включений.

2.5.2 Задачи работы:

1. Приготовить мазки и отпечатки из разных органов и окрасить их по Романовскому и Селлерсу

2. Выполнить микроскопию готовых препаратов на обнаружение телец-включений и зарисовать в рабочей тетради микроскопическую картину

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Микроскопы (соответственно количеству студентов).

2. Демонстрационные препараты с включениями Бабеша-Негри.

3. Предметные стекла, патологический материал, пастеровские пипетки.

4. Реактивы для окрашивания по Романовскому, Селлерсу.

2.5.4 Описание (ход) работы:

В ответ на заражение клетки вирусом могут возникнуть самые различные ответные реакции. Различают 3 вида взаимодействий между вирусом и клеткой животных:

1. Цитолитический эффект - общая деструкция или растворение клетки, наступающее вслед за множеством визуально наблюдаемых морфологических изменений

2. Трансформация зараженной вирусом клетки, т.е. приобретение клеткой способности к неограниченному размножению

3. Индуктивное действие вируса на клетку, в результате которого в клетке образуются вещества, не продуцируемые клеткой в норме. Например, интерферон.

Специфическими морфологическими признаками вирусной инфекции, очень часто имеющими диагностическое значение, являются разнообразные включения, выявляемые при окрашивании зараженных клеток. Тельца-включения при разных вирусных заболеваниях имеют свои характерные особенности. При характеристике включений выделяют следующие признаки: локализация в клетке; тип нуклеиновой кислоты; тинкториальные свойства; гомогенность; величина; форма; численность.

Тельца-включения, в зависимости от локализации в клетке, различают внутриядерные и цитоплазматические. Выявлена определенная связь между типом нуклеиновой кислоты и локализацией телец-включений в клетке. РНК-содержащие вирусы в основном цитоплазматические включения, а ДНК-содержащие – внутриядерные. Такое разграничение в известной степени условно. Иногда вирус может образовывать включения обоих типов. В зависимости от окрашивания разными красителями тельца-включения бывают базофильными или ацидофильными. Величина телец-включений варьирует от 1 - 30 нм, форма бывает окружной, овальной, неправильной. Количество включений при разных инфекциях различно, от единичных до 10-12 в клетке.

Природа включений разнообразна. В основном это «вирусные фабрики», т.е. очаги, где идет репликация, транскрипция, сборка вирусных частиц. Включения могут быть представлены:

1. скоплением вирусных частиц (внутриядерные включения при адено-вирусной инфекции, при заражении вирусом полиомиелита).

2. скоплением неструктурных вирусных белков в цитоплазме и ядре (при гриппе)

3. скоплением деструктивного клеточного материала (ядерные включения при поражении герпес-вирусом).

Диагностическое значение телец-включений.

При ряде вирусных инфекций обнаружение телец-включений имеет диагностическое значение, т.е. обнаружение их при соответствующей клинической картине заболевания служит достаточным основанием для установления диагноза. Это относится к таким инфекциям, как бешенство, оспа, ринопневмония лошадей,

аденовирусная инфекция, ринотрахеит крупного рогатого скота. При других заболеваниях обнаружение телец-включений имеет вспомогательное значение (грипп животных, болезнь Ауески, ларинготрахеит птиц). На частоту выявления телец-включений влияют штамм вируса, возраст животного, физиологическая активность пораженного органа.

Исследование инфицированного материала на обнаружение телец-включений

Готовят мазки или отпечатки из инфицированного материала. Гомогенат пораженного органа наносят на хорошо обезжиренное стекло и делают мазок. Можно приготовить отпечаток. Из пораженного органа вырезают кусочек ткани, кладут на сложенную в несколько слоев фильтровальную бумагу и слегка надавливают на него хорошо обезжиренным стеклом. Препарат фиксируют, затем окрашивают.

Для обнаружения внутриклеточных включений применяют различные методы окраски. Универсальной является окраска по Романовскому-Гимзе в разных вариантах, выделяющая все виды вирусных включений. Внутриклеточные включения при большинстве вирусных инфекций являются окси菲尔ными и красятся по Романовскому-Гимзе в розовый или сиреневый цвет. Наряду с этим применяют окраску по Манну, которая считается классической и позволяет выявлять цитоплазматические и внутриядерные включения в клетках, зараженных различными вирусами. По Манну вирусные включения окрашиваются в ярко-красный цвет. Для выявления включений при гриппе, кроме указанных выше методов, используют окраску препаратов по Пигаревскому, Павловскому, а при бешенстве - по Муромцеву, Туревичу, Селлерсу.

Метод окраски по Муромцеву для выявления телец-включений Бабеша-Негри (бешенство). Подготовленный препарат фиксируют 2 – 2 часа в смеси спирта с эфиром (1:1) или же в этиловом или метиловом спирте. Зафиксированный препарат вынимают из фиксатора, ополаскивают дистиллированной водой, погружают в раствор синьки Мансона на 5 – 10 минут. Мазок становится сине-фиолетовым. Не промывая, мазок переносят в раствор танина до приобретения мазком голубого цвета, затем промывают водой, подсушивают фильтровальной бумагой. На несколько секунд погружают в спирт или смесь спирта с ацетоном. Мазок просматривают в иммерсионной системе без покровного стекла. Протоплазма нервных клеток светло-голубого цвета, ядра синего, ядрышки темно-синего, тельца Бабеша-Негри - фиолетово-розового с базальной зернистостью.

Реактивы:

Фиксаторы – спирт абсолютный или смесь абсолютного спирта и ацетона (1:1)

Синий Мансона, разведенный в 40 раз

Танин 5 - 10%

Элементарные тельца.

Элементарные тельца - это вирусные частицы или вирионы. Термин предложен Провачеком для названия образований, выявляемых в мазках-отпечатках и срезах из органов при оспе птиц, оспе овец, осповакцине. С помощью световой микроскопии выявляются только крупные вирусы, размер которых превышает 150 нм. Распознавание вирусов, имеющих меньшие размеры, возможно лишь в электронном микроскопе. Для выявления крупных вирусов может применяться световая, фазово-контрастная и люминесцентная микроскопия. Наиболее часто используют световую микроскопию окрашенных мазков и отпечатков. Наилучшим методом окраски для выявления вирусов является серебрение по Морозову. Метод основан на осаждении частиц серебра, что приводит к увеличению размеров вирусов. Для окраски по Морозову готовят мазки и отпечатки из инфекционного материала, источником которого чаще всего служит содержимое кожных высыпаний, мокрота, носоглоточная слизь. Вирусы окрашиваются в темно-коричневый цвет и имеют вид однородных округлых образований, расположенных поодиночке или в виде скоплений на светло-коричневом фоне препарата.

Вирусоскопия является быстрым ориентировочным методом лабораторной диагностики вирусных заболеваний. Однако она не позволяет установить точную природу возбудителя и для его идентификации необходимы другие методы исследования.

Серебрение по Морозову.

Реактивы:

1. (жидкость Руге): 1 мл ледяной уксусной кислоты + 2 мл имеющегося в продаже формалина + 100 мл дистиллированной воды

2. (протравитель): 5 г танина + 1 мл жидкой карболовой кислоты + 100 мл дистиллированной воды

3. 5 г кристаллического нитрата серебра растворить в 100 мл дистиллированной воды. К полученному раствору по каплям добавлять раствор аммиака до получения опалесцирующего раствора. Для краски раствор серебра разводят дистиллированной водой 1:10. Окраска препарата: наливают на 1 минуту первый реактив, сливают, промывают препарат водой, наливают второй реактив, подогревают на легком пламени до отхождения паров (1 мин), тщательно промывают водой, 1 – 2 минуты при подогревании обрабатывают препарат третьим реагентом до появления темно-коричневой окраски мазка, тщательно промывают водой, высушивают. Рассматривают с иммерсионной системой.

2.6 Лабораторная работа №6 (2 часа).

Тема: «Использование лабораторных животных в вирусологии»

2.6.1 Цель работы: ознакомиться с целью использования и методами заражения лабораторных животных.

2.6.2 Задачи работы:

1. Освоить методику фиксации белых мышей, подготовки к заражению
2. Выполнить методику заражения белых мышей внутримышечно, подкожно, внутрикожно, интракеребрально, интерперитониально.
3. Выполнить методику вскрытия и отбора патологического материала от трупов.

2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Лабораторные животные (белые мыши).
2. Инструменты для фиксации, заражения и вскрытия лабораторных животных
3. Пеницилловые флаконы с кусочками паренхиматозных органов, залитых раствором Хенкса и замороженных.
4. Посуда и раствор Хенкса для приготовления вируссодержащей суспензии
5. МПА, МПБ в пробирках на каждое рабочее место.
6. Посуда для взятия материала.
7. Спиртовки.
8. Центрифуга

2.6.4 Описание (ход) работы:

этапах развития вирусологии широко применяли культивирование вирусов в организме лабораторных животных, специально выращиваемых для проведения на них исследований.

Лабораторных животных используют в вирусологии для: 1) обнаружения вируса в патологическом материале; 2) первичного выделения вируса из патологического материала; 3) накопления вирусной массы; 4) поддержания вируса в лаборатории в активном состоянии; 5) титрования вируса; 6) в качестве тест-объекта в реакции нейтрализации; 7) получения гипериммунных сывороток.

Лабораторных животных применяют для индикации вирусов в пат. материале, т.е. для постановки биопробы. Суспензией пат. материала заражают лабораторных животных и учитывают реакцию на заражение. Биопроба сопровождается характерной клинической картиной, специфичной для определенного заболевания. Положительная биопроба позволяет сделать вывод о присутствии вируса в патологическом материале, о его видовой принадлежности. Так, например, если внутримышечное введение кролику суспензии паренхиматозных органов павшего поросенка приводит к появлению зуда на месте

введения, расчесав вплоть до разгрызения животным кожи и мышечных тканей и гибели, то это свидетельствует о заражении вирусом Ауески.

Полученный от зараженного животного вируссодержащий материал считают выделенным вирусом.

У экспериментально зараженных животных вирус накапливается, это используется для его изучения (идентификации) для получения противовирусных вакцин.

В лаборатории требуется поддержание вирусов на протяжении многих лет в активном состоянии. Поддержание состоит в чередовании пассажей вирусов на живых системах (в том числе на лабораторных животных) и хранение их в консервирующих условиях. При консервации вирусы теряют свою активность. Новый пассаж вируса позволяет ее восстановить.

Пассаж - заражение чувствительной живой системы с целью получения от нее новой популяции вируса. Такой вирус хранят в консервирующих условиях.

При работе с вирусом нужно знать его инфекционный титр, т.е. его концентрацию в материале.

Лабораторных животных используют в качестве индикатора свободного вируса в смеси с антителом при постановке реакции нейтрализации и для получения гипериммунных сывороток, применяемых в диагностике вирусных инфекций.

Требования к лабораторным животным

1. Животное должно быть здоровым, свободным от латентных (скрытых) инфекциях.

Вид животного должен быть чувствительным к данному вирусу (морские свинки - ящур, кролики - бешенство, ящур, болезнь Ауески и т.д.).

3. Возраст животного

4. Стандартная чувствительность животного.

Методы заражения лабораторных животных

Известно, что вирусы обладают тропизмом к определенным тканям. Тропизм способность репродуцироваться в определенных клетках организма. Вирусы, репродуцирующие в нервных клетках, называются нейротропными (вирус бешенства), в клетках кожи - дермотропными (вирус оспы), в клетках легких - пневмоторпными (вирус гриппа). Вирусы репродуцирующие в нескольких типах клеток - политропными (вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в клетках органов дыхания и размножения), а во всех типах клеток - пантропными (вирус чумы собак).

Вируссодержащий материал вводят в орган, содержащие чувствительные к этому вирусу клетки. Например, вирус гриппа вводят интраназально, вирус оспы - внутрикожно, вирус бешенства - интрацеребрально и т.д. если исследователь не имеет данных о тропизме находящегося в материале вируса, то заражают животных нескольких групп разными методами.

Наиболее часто используются заражения: подкожное (п/к), внутрекожное (в/к), внутримышечное (в/м), внутрибрюшинное (в/б), внутривенное (в/в), интраназальное (и/н), интрацеребральное (и/ц) и т.д.

2.7 Лабораторная работа №7 (2 часа).

Тема: «Использование куриных эмбрионов в вирусологической практике.»

2.7.1 Цель работы: изучить строение куриного эмбриона, ознакомиться с методами заражения их вируссодержащим материалом.

2.7.2 Задачи работы:

1. Выполнить овоскопию куриных эмбрионов.
2. Отработать методику заражения куриных эмбрионов в амниотическую и аллантоисную полость открытым и закрытым способом

3. Отработать методику вскрытия и взятия материала от зараженных эмбрионов.

2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Куриные эмбрионы

2. Вирусодержащий материал (вирусвакцина).

3. Инструменты для заражения и вскрытия эмбрионов (шприцы, короткие и длинные иглы, пробойники и глазные пинцеты, баночки со спиртом, стерильный парафин в пастеровских пипетках, стерильные покровные стекла, лейкопластырь, чашки Петри, спиртовки, простые карандаши, стерильные тампоны)

4. Овоскоп

5. 0,5% раствор йода.

2.7.4 Описание (ход) работы:

Культивирование вирусов в куриных эмбрионах доступный, удобный метод как для первичного выделения вируса от больных животных из объектов внешней среды, так и для последующего культивирования вирусов в лаборатории. Этот метод широко применяется для идентификации вирусов и антител, для приготовления вакцин и диагностикумов. Практика применения показала ряд преимуществ этого метода перед культивированием вирусов на лабораторных животных. Известно, что белые мыши, которых широко используют при вирусологических исследованиях, могут быть спонтанно заражены рядом вирусных инфекций: электромелией, вирусной пневмонией, лимфоцитарным хориоменингитом и другими, что осложняет работу и приводит к ошибочным выводам при оценке результатов. Культивирование вирусов на куриных эмбрионах в значительной мере устраняет указанные выше трудности. От куриного эмбриона можно получить значительно большее количество вируса, чем от лабораторных животных. Куриный эмбрион обладает большей жизнеспособностью и устойчивостью к разного рода воздействиям, неизбежным при введении исследуемого материала. При навыке работы с эмбрионами и соблюдением правил асептики гибель незначительна.

Яйцо с развивающимся куриным эмбрионом покрыто сверху твердой пористой скорлупой, к которой прилегает подскорлупная оболочка. В тупом конце яйца она разделяется на два листка, между которыми образуется воздушная камера. Тело зародыша лежит в яйце эксцентрично, спиной ближе к скорлупе, голова направлена в сторону воздушной камеры, зародыш погружен в околоплодную жидкость, заполняющую амниотическую полость, и пуповиной связан с желтком. Под подскорлуповой оболочкой находится аллантоисная полость, покрывающая амнион и желточный мешок к 9 - 11 дню, замыкающаяся в остром конце яйца. Затем аллантоисная оболочка срастается с хорионом, образуя единую хориоаллантоисную оболочку (ХАО).

Заражение в ту или иную часть эмбриона проводится в период ее максимального развития (количество чувствительных клеток наибольшее). Желточный мешок – резервуар питательных веществ, имеет небольшой объем в начале инкубации, затем (после 12 дня) уменьшается. Заражают в желточный мешок с 5-го по 6-ой день инкубации.

Амниотическая полость – буферная среда развития зародыша, покрывает его уже не 5-й день инкубации. Используют эмбрионы в возрасте 6 - 10 дней, чаще 10 - 11 и позже 13 - 14 дней.

Аллантоисная полость служит для сбора продуктов обмена, в ней скапливаются мочекислые соли, фосфорные и азотистые соединения. Заражают на 9 - 12 день инкубации.

Хориоаллантоисная оболочка снабжает тело зародыша кислородом, богата кровеносными сосудами. Выполняет функцию органов дыхания эмбриона. Заражение проводят на 10 - 12 день инкубации.

В куриных эмбрионах способны размножаться многие вирусы. Они пригодны для выделения и титрования вирусов, получения антигенов, постановки реакции нейтрализации, поддержания вирусов в лаборатории и т.д. В ряде случаев при инокуляции

вирусодержащего материала куриный эмбрион проявляет признаки данной инфекции, но не всегда свободен от посторонних вирусов и не образует антител. Преимущество куриных эмбрионов, как биологической системы, также в их сравнительно невысокой стоимости и доступности для любой диагностической лаборатории.

В лабораторно-диагностической работе чаще используют эмбрионы кур и редко эмбрионы других птиц. Например, вирус гепатита утят лучше размножается в утиных эмбрионах.

Требования к куриным эмбрионам.

1. Яйца необходимо получать из благополучным по вирусным болезням хозяйств.
2. Скорлупа яиц должна быть чистой и непигментированной.
3. Возраст куриного эмбриона должен соответствовать способу заражения.

Условия, влияющие на размножение вирусов в куриных эмбрионах.

На размножение вирусов влияют многие факторы. Из них существенное значение имеют температура инкубации яиц, возраст эмбриона, метод заражения и концентрация введенного вируса.

Подготовка куриных эмбрионов к заражению.

Перед заражением инкубированные яйца просвечивают, погибшие отделяют. На скорлупе яиц с живыми эмбрионами, которые различают по красному цвету кровеносных сосудов и движению эмбриона, карандашом отмечают место заражения. После разметки, яйца до заражения переносят в инкубатор, в котором поддерживают необходимую для инкубации температуру. Внутри инкубатора для создания необходимой влажности устанавливают чашку с дистиллированной водой, а чтобы обеспечить необходимую циркуляцию воздуха, открывают все вентиляционные отверстия.

Заражают эмбрионы в стерильном боксе, имеющем рабочий стол, две табуретки, подводку газа, водопровод в затемненной комнате. Рабочее место должно быть хорошо освещено.

Перед работой стол дезинфицируют. Для дезинфекции поверхности яиц подготавливают антисептический раствор (70%-й спирт, 2%-й раствор йода) и обернутую ватой деревянную палочку. Яйца заражают при помощи стерильных шприцов для туберкулинизации и специальных игл. Место заражения на яйце заливают парафином. Для этого готовят парафиновые палочки. Подержав палочку над пламенем, расплавляют необходимое для закрытия отверстия парафина. Этот способ очень чист, и при нем не образуются пары парафина.

На рабочем столе в боксе размещают стакан со стерильными ватными тампонами, стакан с 3%-ным раствором едкого натрия для использованных инструментов и сосуд с раствором хлорамина для использованных стеклянных предметов. В случае надобности можно приготовить подставку для яиц, небольшую эмалированную чашку и стерильные питательные среды. Подготовленный таким образом стол для работы в течение 1 -2 часов подвергают УФ - облучению.

Учитывая патогенность исследуемых вирусов, работы ведут в маске, резиновых перчатках и защитных очках.

Способы заражения

Заражение в аллантоисную полость. Используют 9 - 12 дневных эмбрионов. Эту методику часто используют для получения больших количеств вируса при изготовлении антигенов, вакцин и т.д. Агент, введенный в аллантоис, размножается в эндодермальных клетках, переходя затем в аллантоисную жидкость, так что и оболочка и жидкость можно использовать как источник вируса. При заражении этим методом хорошо размножаются вирусы гриппа, ньюкаслской болезни, ринопневмонии лошадей, везикулярного стоматита и др.

Яйца овоскопируют на 10 - 11 день инкубирования, на скорлупе карандашом на стороне, противоположной эмбриону, где, как правило, кровеносных сосудов мало или они совсем отсутствуют, делают отметку над воздушным мешком, ближе к его границе.

Это место протирают раствором йода. Инъецируют 0,1 - 0,2 мл вирусного материала в аллантоисную полость с помощью шприца для туберкулинизации с иглой диаметром 0,5 мм и длиной 1,5 см. Иглу вводят примерно на 10 - 15 мм параллельно длиной оси яйца. Отверстие в скорлупе яйца протирают раствором йода и запечатывают парафином. Зараженные яйца инкубируют при 35°C в течение 25 - 72 часов, в зависимости от вируса и предполагаемого использования вирусного материала.

Другой способ заражения в аллантоисную полость основан на введении вируса через отверстие, сделанное в скорлупе на стороне зародыша в 5 мм выше границы воздушной камеры. Шприц с иглой при этом направляют вертикально. Иногда введенная жидкость выливается наружу. Этого можно избежать, если сделать отверстие в скорлупе над воздушной камерой. Это позволит ввести большие количества материала, так как эмбрион может немного смещаться в сторону камеры. После заражения отверстие заливают парафином, яйца помещают в инкубатор.

Зараженные зародыши инкубируют в зависимости от вируса или при той же температуре, что и раньше (например, вирус ньюкаслской болезни, или более низкой (например, вирус гриппа А при 35°C, вирус болезни «синего языка» при 32 – 33 °C).

Зарождение в амнион. Применяют, главным образом для выделения вирусов из материала клинических проб. Инфицированный материал, введенный в полость амниона, заглатывается эмбрионом, а также попадает в дыхательные пути. При заражении в амнион инфицируются многие ткани и типы клеток, что способствует выделению вирусов с разным тканевым и клеточным тропизмом. При таком способе заражения получают небольшое количество вирусодержащего материала, поэтому вирусы, выделенные заражением в амнион, обычно пассивируют заражением в полость аллантоиса для адаптации к росту в клетках аллантоисной оболочки.

Используют чаще эмбрионы в возрасте 10 - 11 дней; можно заражать их в более позднем возрасте - до 13 - 14 дней жизни. Тупой конец яйца протирают слабым раствором йода, после чего в скорлупе острым зондом делают отверстие. Скорлупу в месте отверстия снова протирают раствором йода, яйцо помещают на овоскоп и заражают, используя туберкулиновый шприц с иглой диаметром 0,6 мм и длиной 4,5 см. иглу вводят по направлению к телу эмбриона, быстрым уколом проникают в амниотическую полость и инъецируют 0,1 - 0,2 мл вирусного материала. Доказательство того, что игла проникла в амнион, служит, с одной стороны, движение эмбриона в направлении передвижения иглы и с другой – ощущение слабого сопротивления при введении материала. Если игла находится в аллантоисной полости, сусpenзия из шприца свободно вводится в яйцо. Иглу извлекают, место отверстия протирают раствором йода, отверстия запечатывают смесью парафина с вазелином или коллоидием. Зараженные яйца инкубируют при 33 - 37°C (в зависимости от вируса) в течение 48 - 72 часов.

Заражение в амнион производят также «открытым» способом. Для этого скорлупу над воздушной камерой разрезают ножницами и через образовавшееся окно размером 1 - 1,5 см осторожно отслаивают глазным пинцетом подскорлупную оболочку. Прокалывают ХАО глазным пинцетом и продвигают его к эмбриону. Затем захватывают амниотическую оболочку и осторожно вытягивают часть ее через образовавшееся отверстие. Извлеченный амнион перехватывают широким пинцетом, который держат в левой руке. Затем шприцем для туберкулинизации с иглой вводят в вытянутый амниотический мешок 0,1 - 0,2 мл вирусного материала. После заражения пинцет разжимают и амнион погружается в аллантоисную полость. Окно в скорлупе закрывают стеклянным колпачком края которого запаивают расплавленным парафином. Метод используется при культивировании вирусов гриппа, ньюкаслской болезни, ринопневмонии лошадей и др.

Зарождение на хорионаллантоисную оболочку. Первый метод используется для выделения и культивирования вирусов, образующих на оболочке бляшки или осипы (вирусы оспы, инфекционного ларинготрахеита птиц и др.), а также для титрования этих агентов, так как число инфицированных частиц можно рассчитать по количеству бляшек

или осцин. Заражение на ХАО используют, кроме того, для исследования антител, поскольку добавление иммунной сыворотки к вирусу снижает число появляющихся очагов поражения соответственно уровню антител.

Эмбрионы 10 - 12 дневного возраста овоскопируют, выбирают на боковой поверхности яйца место с хорошо развитыми кровеносными сосудами и помечают его карандашом (место будущего заражения). Чтобы создать ровную поверхность оболочки, удобную для нанесение и равномерного распределения вирусного материала, прибегают к образованию искусственного воздушного мешка. Скорлупу в месте заражения и на тупом конце яйца протирают раствором йода и делают отверстие в полость воздушного мешка. На месте заражения скорлупу пропиливают зубоврачебным карборундовым диском, приводимым в движение бормашиной (размер щели 7- 8 x 2 -3 мм, расположение - вдоль длинной оси яйца). Пилят осторожно, чтобы полностью удалить скорлупу, не повредив под скорлупной оболочку, затем ее прокалывают короткой шприцевой иглой так, чтобы не повредить лежащую под ней ХАО. Воздух из полости воздушного мешка осторожно отсасывают резиновым баллончиком, наложенным на отверстие в скорлупе. Это вызывает опадение хорион-аллантоисной оболочки под щелью и создание искусственного воздушного мешка. Яйцо овоскопируют для проверки перемещения воздушной полости. Вирусный материал (0,1 - 0,2 мл) наносят на хорион-аллантоисную мембрану шприцем для туберкулинизации емкостью 1 мл с короткой иглой диаметром 0,6 мм и яйцо покачивают, чтобы распределить материал по поверхности мембранны. Щель и отверстие инокуляции заклеивают лейкопластырем. Зараженные яйца располагают на подставке горизонтально, накрывают куском клейкой пленки и инкубируют при 35 - 37°C (в зависимости от вируса) в течение 48 - 72 часов.

Второй метод. Препаровальной иглой в центре воздушной камеры делают отверстие. Плоским напильником надпиливают скорлупу по линиям треугольника, не повреждая при этом под скорлупной оболочки. Препаровальной иглой осторожно убирают эту часть скорлупы. Каплю физиологического раствора наносят на обнаженную под скорлупной оболочку и по этой капле осторожно проводят иглой с загнутым острием в направлении, параллельном поверхности яйца, это делается для того, чтобы, поцарапав под скорлупной оболочку, не нарушить целостности прилегающей к ней ХАО. В отверстие скорлупной оболочки поникает жидкость, отделяя ее от ХАО. Последняя опускается, и в результате перемещения содержимого яйца в направлении естественной воздушной камеры образуется искусственная воздушная камера. Если такое перемещение не происходит самостоятельно, то его вызывают осторожным подсасыванием воздуха с помощью резиновой груши, которую прикладывают к отверстию над воздушной камерой. В правильности выполненной операции можно убедиться, просветив яйцо.

В образовавшуюся воздушную камеру с помощью пастеровской пипетки, или шприца с иглой, вводят 0,1 - 0,2 мл инфекционного материала. Отверстие в скорлупе заклеивают кусочком лейкопластиря или закрывают покровным стеклом или другим прозрачным материалом. Яйца после заражения инкубируют в горизонтальном положении, не переворачивая.

Вирус получают через определенное для данного вируса время или после смерти зародыша поверхность яйца дезинфицируют спиртом и йодом, ножницами надрезают отверстие над искусственной воздушной камерой, обнажая зараженную ХАО. После тщательного осмотра оболочку с очаговыми поражениями стерильно вырезают и переносят в пробирку. После удаления эмбриона через образовавшееся отверстие берут остальную часть оболочки.

Наблюдение за зараженными эмбрионами. Длительность наблюдения зависит от вируса и дозы его введения. Эмбрионы просвечивают 2 раза в день - в начале и в конце работы, погибшие вынимают и исследуют. Результаты наблюдений записывают в протоколы исследований.

Отрицательный результат заражения не исключает присутствия вируса в исследуемом материале. Он может свидетельствовать о том, что вируса ввели слишком мало или, что к данному вирусу эмбрион нечувствителен. Для исключения первого предположения необходимо провести 1 – 2 пассажа.

Реакция эмбрионов на вирусное заражение может быть различной. Как правило, гибель эмбриона в первые 24 часа после введения испытуемого материала – результат травмы. Однако существуют вирусы (например, восточного и западного энцефаломиелита лошадей), которые могут вызвать и столь быструю гибель зародыша.

Характер локализации и интенсивность патологических изменений у зародыша зависит от вируса, его дозы, пути введения и степени адаптации к эмбриону. Последнее означает, что свежевыделенный и в первых пассажах вирус, будет вызывать у эмбрионов не такие изменения, как тот же вирус в последующих пассажах. Выделяют следующие возможные варианты изменений у эмбрионов под действием вирусов: гибель эмбрионов; кровоизлияние под кожу, в фолликулы перьев, затылочную область; инъектирование сосудов на крыльях, ногах или всего зародыша; замедление развития зародыша; скручивание зародыша, уменьшение объема амниотической жидкости; увеличение объема аллантоисной жидкости; отек ХАО; очаги некроза или скопления лейкоцитов с центральным омертвлением; гистопатологические изменения; образование телец-включений.

Характерной чертой некоторых вирусов, а иногда даже разных штаммов одного вируса является различный срок жизни эмбрионов после заражения. Иногда по этому признаку можно предварительно идентифицировать вирусы.

Изменения эмбриона после заражения имеют большую диагностическую ценность, но не гарантируют возможности абсолютно безошибочной идентификации вируса. Окончательно распознать штамм исследуемого вируса позволяют дополнительные исследования.

2.8 Лабораторная работа №8 (2 часа).

Тема: «Культуры клеток - характеристика, получение, использование. Растворы и питательные среды для культур клеток»

2.8.1 Цель работы: ознакомиться с общими сведениями о культурах клеток, солевыми растворами и питательными средами методикой их приготовления, отработать методику подготовки посуды для культивирования культур клеток.

2.8.2 Задачи работы:

1. Дать характеристику разным типам культур клеток
2. Изучить состав, предназначение питательных сред и солевых растворов
3. Ознакомиться с методикой получения первично-трипсинизированной культуры клеток.

2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Посуда для получения и культивирования культур клеток (чашки Петри, колба для трипсинизации, центрифужные пробирки)
2. Солевые и деспергирующие растворы (Раствор Хенкса или Эрла, 0,25% раствор трипсина)
3. Питательная среда для культур клеток (среда 199)
4. Оборудование для получения и культивирования клеток (центрифуга, магнитная мешалка, стерилизатор с инструментами (ножницы глазные прямые и изогнутые, пинцеты анатомические), спиртовки, подставки для яиц, сливная чашка, кювета со льдом, овоскопы, или осветители ОИ-19)

2.8.4 Описание (ход) работы:

Культура клеток – это клетки тканей органов многоклеточного организма, живущие и размножающиеся в искусственных условиях вне организма (*in vitro*). При культивировании клеток в пробирках формируется клеточный монослой (слой клеток толщиною в одну клетку). Культуру клеток можно получить из любого органа или ткани от любого вида животных (взрослого или эмбриона).

В вирусологической практике применяют следующие культуры клеток:

1. Первичные. Их готовят непосредственно перед применением (они не пригодны для длительного культивирования). Их можно получить из различных органов и тканей человека и животных. Однако лучше это удается сделать из эмбриональных органов. Чаще всего используют почки, легкие, кожу, тимус, testикулы эмбрионов или молодых животных. Первичная культура клеток имеет характеристику исходной ткани: морфологию, чувствительность. Сохраняет жизнеспособность в течение 7-21 дня. Недостатком первичных культур клеток является возможное присутствие скрытых контаминаントов.

Из первичных культур клеток можно получить субкультуры путем снятия со стекла раствором версена и ресусцидирования в новой питательной среде. По основным характеристикам они соответствуют исходной ткани. Субкультуры получают от 2-5 пассажей редко 8-10. Последующие пассажи ведут к изменению морфологии клеток и их гибели.

Перевиваемые культуры клеток. Это клетки, способные к размножению вне организма неопределенное длительное время. В лабораториях их поддерживают путем пересева из одного сосуда в другой при условии замены питательной среды. Получают перевиваемые культуры клеток из первичных с повышенной активностью роста путем длительных пересевов в определенном режиме культивирования. Эта работа проводится в течение многих месяцев. Полагают, что механизм происхождения перевиваемых клеток – результат их генетической изменчивости.

Перевиваемые клетки можно получить как из здоровых тканей животных, так и из опухолевых. Примеры таких клеток: ВНК-21 (почка новорожденного хомячка); ППТ (перевиваемая почка теленка); ППО (перевиваемая почка овцы); HeLa (раковая опухоль шейки матки женщины); Нер-2 (карцинома гортани человека); Нер-3 (лимфоидная карцинома человека) и др.

Диплоидные культуры клеток. По сути это перевиваемые с двойным (правильным) набором хромосом. Они могут культивироваться в течение 50-60 пассажей, однако имеют более однородную морфологию, спектр чувствительности более широк. Вирусы животных и человека культивируют на клеточных культурах, полученных из тканей человека и животных. Это в основном эмбрионы человека, кур, коровы, почки обезьяны, овец и поросят, селезенка различных видов животных, амнион человека и др.

Материал для культивирования тканей *in vitro* берут на мясокомбинате от здоровых молодых животных сразу после полного обескровливания. Недостаточное обескровливание способствует загрязнению культуры ткани продуктами распада форменных элементов крови (эритроцитов), которые токсично влияют на растущие клетки. Ткани молодых животных обладают большей потенцией роста и лучше адаптируются к условиям размножения или переживания в питательной среде.

После убоя животного необходимый орган в капсуле извлекают из туши под спиртовым пламенем, чтобы избежать бактериального загрязнения. Затем его помещают в колбу с охлажденным (2-4 °C) раствором Хенкса или фосфатного буфера с антибиотиками. На 1 мл жидкости (раствора) добавляют 200 ЕД пенициллина и 200 мг стрептомицина. Колбу помещают в термос со льдом и доставляют в лабораторию.

Культуры тканей различают в зависимости от условий выращивания клеток.

1. Культуры переживающих тканей в жидкой среде и на агаре, которые или вообще не размножаются *in vitro*, или дают очень слабый рост, т. е. в них отсутствует процесс размножения клеток. Методика получения этих культур, которая была разработана

супругами Мейтланд в 1928 г., заключается в следующем: измельченные кусочки ткани помещают в питательный раствор, состоящий из набора аминокислот, солей, витаминов и сыворотки крови. Заражение культур ткани вирусом производят в момент их приготовления. Затем вирус выращивают в условиях термостата при 35-37 °C в течение 3-4 сут. Для подавления роста бактерий в питательный раствор добавляют антибиотики. В такой культуре клетки выживают не более 30 суток.

2. Культуры растущих тканей или клеток, активно размножающиеся *in vitro* при благоприятных условиях питания: культуры фиксированных кусочков ткани (капельноплазменные, выращенные во флаконах Карреля; культуры во вращающихся и неподвижных пробирках).

Для культивирования вирусов широко применяют культуры перевиваемых клеток, т. е. культуры клеток, способных к размножению вне организма неопределенно длительное время. Наиболее распространены культуры клеток, выделенные из нормальных и раковых тканей человека. Среди них широко известна линия клеток Hela, полученная в 1951 г. От 16-летней девушки, у которой была обнаружена карцинома шейки матки. В настоящее время имеется много перевиваемых линий клеток животного и человеческого происхождения, в том числе линий, обладающих высокой чувствительностью к вирусу ящура (ВНК, СП и др.).

Преимущества перевиваемых клеток:

- 1) независимость от источников тканей, так как клетки пересеваются бесконечно;
- 2) на клетки не влияют большие концентрации антибиотиков;
- 3) соответствие стандартному состоянию.

Недостатки перевиваемых клеток:

- 1) безграничный рост - свойство опухолевых клеток;
- 2) быстрое наступление деструктивных изменений.

При длительном культивировании перевиваемые (растущие) клетки, происходящие из нормальных тканей, часто подвергаются изменчивости. При этом отмечается клеточный и ядерный полиморфизм, появляются гигантские многоядерные клетки. Таким образом, почти у всех перевиваемых клеток наблюдаются изменения хромосомного аппарата и превращение их в полиплоидные клетки. Эти изменения сближают перевиваемые клетки, происходящие из нормальных тканей, с перевиваемыми клетками раковых опухолей. Поэтому для решения ряда теоретических и практических задач биологии необходимо, чтобы в клетках сохранялся нормальный диплоидный (парный) набор хромосом.

Культура диплоидных клеток. Это морфологически однородная популяция клеток. Для нее характерны: 1) стабильность в процессе культивирования *in vitro*; 2) ограниченный срок жизни; 3) наличие фаз стабилизации, активного роста и старения; 4) сохранение в процессе пассирования содержания каротина на уровне исходной ткани; 5) отсутствие компонентов (доклад Международного комитета по клеточным культурам 1963 г.).

С 1958 г. для культивирования вирусов используют культуры диплоидных клеток, у которых на всем протяжении культивирования сохраняется доброкачественный характер. Важно отметить, что культуры диплоидных клеток свободны от микоплазм и латентных (скрытых) вирусов. Диплоидные клетки особенно пригодны для длительного культивирования вирусов в бессывороточных средах (или если нежелательно менять питательную среду). Кроме того, диплоидные клетки обладают широким спектром чувствительности к вирусам, что позволяет выращивать в них большинство видов вирусов, патогенных человеку и животным.

В настоящее время культуры диплоидных клеток получены из различных тканей человека и животных (из мозжечка, легких, кожно-мышечной ткани, почек, аммонова рога эмбриона человека, животных и др.) путем отбора первично-трипсинизированных клеток.

Они обладают способностью перевиваться до 50...80 раз и при этом сохраняют нормальный парный хромосомный аппарат.

Культивирование вирусов в культурах тканей применяют в следующих случаях: 1) для замены лабораторных и домашних животных; 2) для получения большого количества вирусов, необходимых для производства биологических препаратов – вакцин, сывороток и диагностикумов; 3) для изучения развития вирусов в зараженных клетках.

Однако при углубленном изучении современных методов культивирования вирусов в культурах тканей вскрылся ряд недостатков, требующих безотлагательного разрешения.

Питательные среды и их характеристики. Различают искусственные (полусинтетические и синтетические) и естественные питательные среды.

Естественные питательные среды – это биологические жидкости (сыворотка крови, эмбриональный экстракт, асцитическая жидкость, коровья амниотическая жидкость, тканевые экстракты и др.).

Питательные среды из естественных компонентов применяют редко, главным образом для выращивания вновь изолированных тканей в начале культивирования и для поддержания очень прихотливых тканей животных.

К полусинтетическим питательным средам относят гемогидролизаты, гидролизат лактальбумина, аминопептид и другие.

Лучшей искусственной питательной средой является синтетическая среда 199. Она содержит 60 компонентов: 10 аминокислот, 17 витаминов, 8 минеральных солей, 10 компонентов, входящих в состав нуклеиновых кислот и др.

Кроме того, среды подразделяются на ростовые и поддерживающие. Ростовые применяются в 1-ой фазе культивирования клеток. Они богаты питательными веществами и способствуют активному размножению клеток (например, 5%-ый гемогидролизат + 10% бычьей сыворотки). Поддерживающие среды применяют во 2-ой фазе культивирования клеток — после заражения культуры клеток вирусами. Они поддерживают жизнеспособность клеток. Из поддерживающих сред обычно исключают сыворотку.

Для уничтожения микрофлоры перед использованием в среды добавляют пенициллин (100 ЕД/мл), стрептомицин (50 ЕД/мл), тетрациклин (100 ЕД/мл), устанавливают pH 7,2...7,4; в ростовые среды, кроме того, вносят 10% бычьей сыворотки.

Для поддержания жизнедеятельности клеток большое значение имеет солевой состав питательной среды, создающий необходимую буферность и изотоничность. Для роста клеток животных обязательно присутствие в среде ионов Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, карбонатов и фосфатов, которые входят в состав всех физиологических солевых растворов. Оптимальный рост и развитие клеток возможны в среде при pH 7,2...7,4; значительное отклонение от указанного оптимума отрицательно сказывается на росте культуры клеток. Оптимальная температура размножения колеблется в пределах 36...38,5 °C.

Для роста клеток обязательны кислород и диоксид углерода, при участии которых образуется энергия и осуществляется биосинтез составляющих клетку компонентов.

Для культивирования клеток вне организма необходимо присутствие в среде тех аминокислот, которые не могут быть синтезированы клеточными культурами. К таким основным аминокислотам относят: глютамин, лейцин, изолейцин, валин, фенилаланин, лизин, гистидин, триптофан, метионин, треонин, цистин, тирозин. Особенно важная роль принадлежит глютамину, который обеспечивает разнообразные функции в обмене веществ культуры клеток.

Одним из существенных компонентов питательной среды культуры клеток служит глюкоза. Потребность клеток в глюкозе определяется прежде всего ее энергетической ролью в обмене веществ. Но клетки используют ее и для пластической цели, а именно для синтеза некоторых заменимых аминокислот, а также жирных и нуклеиновых кислот.

Наличие в среде витаминов, особенно группы В, - одно из существенных условий размножения клеток. Клетки растут лучше, если витамины группы В добавляют в виде коэнзимов, например в виде аденоциандинифосфорной кислоты (АДФ), аденоциантифосфорной кислоты (АТФ) и др.

Приготовление растворов для культур клеток требует соблюдения ряда условий: чистоты химических веществ, последовательности растворений и т. д. Для этих целей наиболее употребительны растворы Хенкса и Эрла.

В зависимости от входящих компонентов питательные среды делят на две группы: 1) содержащие естественные компоненты (сыворотку, амниотическую жидкость и др.); 2) синтетические и полусинтетические.

Натуральные среды состоят из смеси соответствующего солевого раствора (Хенкса, Эрла), сыворотки (животных и человека), тканевого экстракта (эмбрионов кур, коров, человека), гидролизата лактальбумина.

Солевые растворы. Для культивирования клеток большинство питательных сред готовят на сбалансированном солевом растворе, для которого необходимы высокоочищенные препараты, так как следы ряда примесей (свинец, ртуть и другие тяжелые металлы) токсичны для клеток. Солевые растворы готовят на бидистилированной воде. Они обеспечивают сохранение pH, осмотического давления в клетках, соответствующую концентрацию необходимых неорганических веществ. Лучшими из них являются растворы Хенкса и Эрла. Эти растворы — обязательный компонент любой питательной среды.

2.9 Лабораторная работа №9 (2 часа).

Тема: «Индикация вирусов в культуре клеток»

2.9.1 Цель работы: ознакомиться формами цитопатогенного действия (ЦПД) в культуре клеток

2.9.2 Задачи работы:

1. Дать характеристику формам цитопатического действия вируса в культуре клеток

2. Приготовить агаровое покрытие для постановки метода бляшек.

2.9.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Агаровый гель

2. Питательная среда, сыворотка крови

3. Витальный краситель

4. Посуда и оборудование для определения pH, приготовления агарового покрытия.

2.9.4 Описание (ход) работы:

Методы индикации вируса в зараженной культуре клеток следующие: по цитопатическому эффекту (ЦПД или ЦПЭ), по положительной реакции гемадсорбции, по образованию бляшек, по обнаружению внутриклеточных включений, по обнаружению вируса в РИФ, по выявлению вируса методом электронной микроскопии, по явлению интерференции вирусов, по подавлению метаболизма.

Цитопатическое действие (ЦПД) - видимые под микроскопом морфологические изменения клеток, вплоть до их отторжения от стекла, которые возникают в результате внутриклеточной репродукции вирусов. Характер ЦПД при различных вирусных инфекциях неодинаков. При репродукции одних вирусов (парамиксовирусы, герпесвирусы) наблюдается слияние клеток с образованием синцития, других (энтеровирусы, реовирусы) - сморщивание и деструкция клеток, третьих (аденовирусы) - агрегация клеток и т.д.

Формы ЦПД: **Фрагментация** - разрушение клеток на отдельные фрагменты, которые отделяются от стекла и переходят в культуральную жидкость в виде клеточного

детрита. **Округление** - потеря клетками способности прикрепляться к стеклу, вследствие чего клетки принимают шаровидную форму, отделяются от стекла и свободно плавают в культуральной жидкости, где и погибают. **Симпластообразование** - это растворение клеточных оболочек с последующим слиянием цитоплазмы соседних клеток и образованием функционального симпласта, ядра располагаются по периферии.

РГАд состоит в следующем. На 3-4 день после заражения культуры клеток берут 2 пробы: одна зараженная, вторая - контрольная. В обеих пробирках сливают культуральную жидкость и вносят по 2-3 капли 0,5%-ной суспензии эритроцитов. Пробирки выдерживают в течение 5-10 минут, периодически покачивая. Затем споласкивают физраствором и исследуют под микроскопом. При положительной реакции эритроциты прикреплены к поверхности клеток, при отрицательной реакции они удалились физраствором или плывут. В зависимости от вида вируса и вида клеток эритроциты могут прикрепляться к виде «ожерелья», по всему монослою, или скоплениями.

Метод образования бляшек под агаровым покрытием содержащим витальный краситель. Метод достаточно сложный и чаще используется для титрования вируса. При постановке этого метода особое внимание обращают на качество культуры клеток (она должна иметь сплошной слой, без признаков дегенерации), на качество инокулируемого вируса (он не должен быть старым) состав и качество агарового покрытия (температура не должна быть 36-38 °C, должна содержать витальный краситель).

Цветная проба. Поскольку живые клетки выделяют продукты метаболизма и меняют pH среды, а погибшие под действие вируса продуктов метаболизма не выделяют, то это свойство может быть использовано для определения наличия в культуре клеток живых и погибших клеток. Изменение pH среды будет визуально заметно поскольку в состав питательных сред входит индикатор для определения концентрации водородных ионов. Цветную пробу для лабораторных исследований предложил Солк, Янгер, Уорд в 1954 году.

Обнаружение внутриклеточных включений. Для приготовления препаратов культур клеток с целью выявления телец-включений клетки выращивают на покровных стеклах в пробирках или пеницилловых флаконах. Заражают культуру клеток и через определенное время инкубации стекло вынимают, промывают в теплом растворе Хенкса, просушивают фильтровальной бумагой и фиксируют в растворе Буэна - 10-15 мин (или фиксаторе Карнуа - 10 мин, или Ценкера - 20-30 минут, или метиловом спирте - 15 мин или другом фиксаторе) Затем препараты окрашивают гематоксилином-эозином в течение 5-15 минут. Затем промывают и помещают на 1-2 минуты в аммиачную воду (200 мл дистиллированной воды и 2-3 капли аммиака). В щелочной среде ядра приобретают синий цвет. Далее препараты окрашивают 0,1%-ным водным раствором эозина 30-60 с. Излишнюю влагу удаляют фильтровальной бумагой. Препарат проводят по спиртам возрастающей концентрации 70, 80, 96 (первый раз) и 96 (второй раз), 100° + ксилол (1:1), ксилол и заключают в бальзам. При окраске гематоксилином-эозином ядра клеток окрашиваются в синий цвет, цитоплазма - в розовый, тельца-включения - в синий или розовый в зависимости от вируса. Для обнаружения вируса в РИФ культуру клеток готовят на покровных стеклах, заражают и затем окрашивают флюоресцирующей сывороткой, выдерживают, промывают, просматривают в люминисцентный микроскоп.

2.10 Лабораторная работа №10 (2 часа).

Тема: «Титрование вирусов»

2.10.1 Цель работы ознакомится с понятием «титр» вируса и методикой его определения.

2.10.2 Задачи работы:

1. Решить задачи на определение титра вируса в разных единицах действия вируса.

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Задания по определению титра вирусов для каждого студента.

2.10.4 Описание (ход) работы:

Титр вируса — это количество вируса в единице объема вируссодержащего материала. Выражают титр через количество так называемых «эффективных доз вируса». Одна эффективная доза (ЭД) - это минимальная доза вируса, дающего регистрируемый эффект в чувствительной системе. Наиболее статистически достоверной является эффективная доза (ЭД50), оказывающая действие на 50 % экспериментальных объектов (лабораторные животные, куриные эмбрионы (КЭ), пробирки с культурами клеток). Обозначение эффективных доз вируса обусловлено видом вируса, биологической системой, на которой его титруют, формой проявления его инфекционного действия (ЛД50, ИД50, ЭЛД50, ЭИД50, ТЦД50):

1 ЛД50 - доза вируса, вызывающая гибель 50 % животных;

1 ЭЛД50 - доза вируса, вызывающая гибель 50 % зараженных КЭ;

1 ИД50 - доза вируса, вызывающая клиническую картину поражения у 50 % зараженных лабораторных животных;

1 ЭИД50 - доза вируса, обуславливающая регистрируемый патологический процесс у 50 % зараженных куриных эмбрионов (КЭ);

1 ТЦД50 - доза вируса, дающая цитопатический эффект у 50 % зараженных культур клеток (КК).

Условия титрования вируса по инфекционному действию включают приготовление его 10-кратных разведений и заражение каждым разведением не менее четырех живых тест-объектов (животные, куриные эмбрионы, культуры клеток).

Экспериментально установлено, что инфекционное действие вируса при его 10-кратном разведении (обычно в растворе Хенкса) уменьшается пропорционально десятичному логарифму разведения: если вируссодержащий материал развести в 100 раз, то инфекционное действие вируса уменьшается в два раза, если развести в 1000 раз — в три раза и т. д.; интервал составляет 1.

Вируссодержащую взвесь разводят раствором Хенкса, или физиологическим раствором, или различными жидкими средами в зависимости от вида вируса, рН растворов (около 7,0).

Для получения последовательных 10-кратных разведений в пронумерованные пробирки с пробками наливают по 9 мл стерильного раствора, затем в первую пробирку вносят пипеткой ровно 1 мл исследуемой вирусной суспензии, не касаясь поверхности раствора, и убирают пипетку в дезинфицирующий раствор. Новой стерильной пипеткой перемешивают смесь в первой пробирке, набирают 1,0 мл смеси вносят во вторую пробирку и т. д. Из последней пробирки 1,0 мл смеси удаляют в дезинфицирующий раствор.

Вирусом каждого разведения заражают группы с одинаковым числом чувствительных к данному вирусу живых тест-объектов (животных, куриных эмбрионов, культуры клеток) с учетом тропизма вируса.

Статистические методы обработки результатов титрования позволяют учесть все колебания чувствительности вируса к используемым живым системам и доказать достоверность дозы вируса, способной вызвать строго определенный инфекционный эффект.

Метод Рида и Менча. Наиболее часто применяют статистический метод Рида и Менча, который основан на построении кумулятивных рядов на основе полученных данных.

Для примера рассмотрим результаты титрования вируса на белых мышах, расчет кумулятивных данных и процента гибели мышей (доза заражения 0,2 мл) (табл. 1). При расчете кумулятивных данных (графа 1) число мышей, павших от более высокого разведения (графа 4), следует прибавить к числу павших от более низкого разведения.

При расчете кумулятивных данных (графа 5) число мышей, оставшихся в живых от более низкого разведения, прибавляют к числу животных, не погибших от более высокого разведения. Летальность (%) вычисляют для каждого разведения вируса по кумулятивным данным:

$$L = (100 \cdot P) / P+V, \text{ где } L - \text{летальность}; \quad P - \text{число павших}; \quad V - \text{число выживших}$$

Таблица №1

Разведение	Исходные данные			Кумулятивный эффект		Соотнош ение павших к зараженн	Летально сть, %
	Число зараженных	выжило	пало	выжило	пало		
1	2	3	4	5	6	7	8
10^{-1}	6	0	6	0	28	28:28	100
10^{-2}	6	0	6	0	22	22:22	100
10^{-3}	6	0	6	0	16	16:16	100
10^{-4}	6	2	4	2	10	10:12	83,3
10^{-5}	6	2	4	4	6	6:10	60
10^{-6}	6	4	2	8	2	2:10	20

Средняя эффективная доза вируссодержащего материала, вызывающая гибель 50 % животных, находится между разведениями 10^{-5} и 10^{-6} (графа 1), обусловливающими соответственно 60 и 20 % летательности (графа 8). Определяют логарифм искомого разведения (ЛД_{50}), т. е. вызывающего 50 % гибели животных:

$$\lg \text{ЛД}_{50} = \lg B + (v - 50 / v - a) \cdot \lg d$$

где B – разведение, дающее эффект более чем в 50 % случаев; v – процент, соответствующий разведению B ; a – процент, соответствующий разведению, дающему эффект менее чем в 50 %; d – коэффициент разведения (так как разведение в данном примере 1:10, то коэффициент равен 10).

Подставляем найденные значения

$$\lg \text{ЛД}_{50} = \lg 10^{-5} + (60 - 50 / 60 - 20) \cdot \lg 10 = -5.25$$

Титр вируса равен $10^{-5,25}$ ЛД_{50} для объема 0,2 мл исходной вируссодержащей взвеси, а для 1 мл этой взвеси искомый титр $T = 5 \cdot 10^5 \text{ ЛД}_{50}/\text{мл}$.

2.11 Лабораторная работа №11 (2 часа).

Тема: «Методы индикации вирусов в объектах окружающей среды»

2.11.1 Цель работы: ознакомиться с методами обнаружения вирусов в окружающей среде

2.11.2 Задачи работы:

1. Изучить способы отбора проб вируссодержащего материала из объектов внешней среды.

2. Освоить способы концентрирования вирусов, полученных из объектов внешней среды

2.1.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Стерильная посуда для отбора проб вируссодержащего материала из объектов внешней среды.

2.1.4 Описание (ход) работы:

В связи с широким распространением заболеваний вирусной этиологии и недостаточным количеством разработанных эффективных мер специфической профилактики в отношении большинства из них особую актуальность в санитарной микробиологии приобрела проблема изучения всего комплекса вопросов связанных с поведением вирусов в объектах внешней среды и разработкой системы неспецифических

профилактических мероприятий, направленных на санацию объектов окружающей среды. Эта проблема особенно касается респираторных и кишечных вирусных инфекций животных, птиц и людей.

В результате многолетних исследований в медицине выявлены основные закономерности циркуляции кишечных и респираторных вирусов в воде, почве и воздухе закрытых помещений, изучены параметры выживаемости этих вирусов во внешней среде. Показана также возможность использования бактериофагов кишечных палочек как наиболее адекватных индикаторов вирусного загрязнения воды, почвы, предметов обихода, дана гигиеническая оценка эффективности санации объектов внешней среды в отношении кишечных и респираторных вирусов.

Кишечные и респираторные вирусы в объектах окружающей среды.

Основное значение в проблеме загрязнения объектов окружающей среды имеют патогенные для животных кишечные и респираторные вирусы. Деление вирусов на кишечные и респираторные условно, оно отражает пути проникновения вирусов в организм, места репродукции, накопления и выделения из организма животных.

Кишечные вирусы - это те вирусы, которые накапливаются в больших концентрациях в кишечном канале животных и выделяются с содержимым кишечника в окружающую среду.

Респираторные вирусы, которые вызывают патологические процессы дыхательной системы, где репroduцируются и выделяются в окружающую среду воздушно-капельным путем.

Исследования материалов из объектов окружающей среды проводят в вирусологических лабораториях.

Индикация вирусов в окружающей среде состоит из нескольких этапов:

- 1) транспортировка проб в лабораторию;
- 2) концентрация вирусных агентов из окружающей среды;
- 3) выделение вирусов в культурах клеток, на лабораторных животных или куриных эмбрионах;
- 4) идентификация выделенных агентов.

Транспортировка, выделение вирусов и их идентификация осуществляются с помощью общепринятых вирусологических методов. Специфической для санитарной вирусологии проблемой является лишь концентрация вирусов из окружающей среды, потребовавшая разработки специальных методических приемов.

Вирусы (фаги) микроорганизмов

Фаги повсеместно распространены в природе, где обитают микроорганизмы: в воде, почве, молоке, организме животных (в том числе и человека). При кишечных заболеваниях фагов выделяют из испражнений больных, особенно в период выздоровления.

Устойчивость к физико-химическим факторам выше, чем клетки микроорганизмов. В запаянных пробирках они сохраняются годами, при доступе воздух разрушаются через 6-8 недель. Фаги легко переносят замораживания (-195°C), а также высушивание. К дезинфицирующим веществам они устойчивы.

Фаги используют для диагностики инфекционных болезней (сибирской язвы, брюшного тифа, дизентерии, стафилококков и др.) Фагодиагностика основана либо на установлении вида выделяемого больным фага, либо на идентификации выделенных культур с помощью фага.

Кроме того, выделение фага из воды и пищевых продуктов может служить показателем их загрязнения бактериями и другими микроорганизмами, что легко выявить с помощью реакции нарастания титра специфического фага. Например, в исследуемую воду добавляют определенное количество индикаторного фага; при наличии индикаторный фаг в них репродуцируется, т.е. происходит нарастание титра индикаторного фага.

Санитарная вирусология воды

Основной причиной наличия в воде патогенных для животных и человека вирусов является загрязнение ее фекалиями животных и человека.

В фекалиях животных обнаружаются более 100 различных вирусов, некоторые из них, принадлежащие к семейству пикорнавирусов, адено-вирусов и реовирусов, обладают термостабильностью и долгое время могут сохранять жизнеспособность, многие из них устойчивы к обычным дезинфицирующим средствам, включая хлорирование, и могут быть обнаружены в сточных водах на далеком расстоянии от источника контаминации.

В воде при контаминации фекалиями обнаружаются те же вирусы, что в фекалиях. Наибольшее выделение кишечных вирусов происходит летом и осенью в связи с увеличением количества кишечных заболеваний. Однако вспышки гастроэнтеритов, вызванных ротавирусами, встречаются обычно зимой и ранней весной. Массивное выделение энтеровирусов из кишечника больных организмов вирусоносителей вызывает значительное обсеменение вирусами сточных вод, а устойчивость их к неблагоприятным факторам внешней среды обуславливает длительное выживание в воде. Таким образом, сточные воды являются основным резервуаром энтеровирусов во внешней среде.

Присутствие энтеровирусов в воде централизованного водопровода представляет эпизоотологическую и эпидемическую опасность в отношении энтеровирусных инфекций, гастроэнтеритов и может привести как к спорадическим случаям, так и вспышке этих инфекций.

Длительность сохранения в воде вирусов значительно повышается при понижении температуры. Так, вирус полиомиелита выживает в речной и водопроводной воде при температуре 4°C 90 дней, а при температуре 37 и 20°C соответственно 10 и около 40 дней. Чем выше исходная концентрация вируса, тем более длительное время он обнаруживается в воде. Сроки выживания колеблются для разных вирусов. Наиболее длительно в воде выживают вирусы Коксаки группы А, менее длительно - вирусы полиомиелита, наиболее короткие сроки выживаемости - для вирусов Коксаки группы В (30-50 дней). Вирусы ECHO 7 более длительно выживают в воде, чем вирусы полиомиелита. Аденовирусы более устойчивы, чем вирусы полиомиелита и ECHO. Аденовирусы некоторых серотипов сохраняли свою активность в воде при температуре 4°C в течение 2 лет и более. К неблагоприятным факторам внешней среды наиболее устойчив из группы энтеровирусов вирус гепатита A. Вирус способен к длительному выживанию в воде в течение нескольких недель и даже месяцев. Известны водные вспышки гепатита A, например, распространение инфекции через сырую колодезную воду. Выживаемость вирусов более продолжительна в загрязненных водах. В морской воде сроки выживаемости более короткие в связи с повышенным содержанием солей и наличием йода, обладающего вирулицидным действием. Возможное вирулицидное действие оказывают находящиеся в морской воде растворенные химические вещества.

Из всех микроорганизмов в экспериментальных условиях наиболее длительной выживаемостью в воде различной степени загрязненности обладает фаг кишечной палочки (более 10 мес). Он является возможным кандидатом в санитарно-показательные микроорганизмы.

Методы концентрации кишечных вирусов, находящихся в воде. Исследованию подлежит вода централизованного водоснабжения, колодцев, открытых водоемов, плавательных бассейнов, сточные жидкости. Исследование сточных вод проводят с целью изучения циркуляции вирусов среди населения данной местности, степени инфицирования воды, эффективности работы очистных сооружений и т. п. Исследование воды поверхностных и подземных водоемов проводят при выборе источника для централизованного водоснабжения, для оценки санитарного состояния мест отдыха, по эпидемиологическим показаниям. Исследования питьевой воды проводят только по эпизоотологическим и эпидемиологическим показаниям.

Методы концентрации вирусов из воды можно условно разделить на 4 группы.

1. Физические методы (ультрацентрифугирование, ультрафильтрация, пенная флотация и др.).
2. Физико-химические методы (преципитация этиловым спиртом, сульфатом аммония, сульфатом алюминия, двухвалентными катионами, преципитация в изоэлектрической точке вирусного белка, концентрация полиэтиленгликолем).
3. Адсорбционные методы (адсорбция на марлевом тампоне или природных минеральных сорбентах - бентоните и других ионообменных смолах).
4. Биологические методы (адсорбция на дрожжевых клетках и других микроорганизмах).

Наиболее надежным методом концентрации вирусов является метод ультрацентрифугирования, однако этот метод не всегда доступен для вирусологических лабораторий. Чаще применяют методы ультрафильтрации, методы концентрации вирусов с помощью полиэтиленгликоля и адсорбционные методы - адсорбцию на марлевом тампоне и ионообменных смолах. Эти методы отличаются простотой, скоростью и достаточной эффективностью.

Для выделения вируса заражают культуру клеток или лабораторных животных (мышей-сосунков). Питьевая вода, безопасная в отношении вирусных инфекций, должна содержать менее одной вирусной частицы в 1 л. Однако эти требования не распространяются на вирус гепатита А и ротавирусы, которые могут быть обнаружены только с помощью малодоступных для вирусологических лабораторий методов.

Санитарная вирусология почвы

Кишечные вирусы могут адсорбироваться подзолистыми почвами, однако в результате действия ряда факторов могут десорбироваться и снова поступать в окружающую среду. Таким путем кишечные инфекции могут передаваться через почву и овощи при использовании зараженных вирусами сточных вод на полях орошения, огородах и приусадебных участках. Кишечные вирусы длительное время сохраняются на овощах. Выживаемость их зависит от вида растения, условий вегетации, типа вируса и его исходной концентрации. Из овощных культур наиболее быстрая инактивация вирусов происходит на капусте в результате ее фитонцидной активности.

Инфицирование овощей может происходить не только путем попадания вирусов на их поверхность, но также и путем проникновения вируса из почвы в наземные части овощных культур через корневую систему. Поэтому необходимо систематическое проведение санитарно-вирусологических исследований поливной сточной воды, почвы и продукции полей орошения на присутствие кишечных вирусов. Благодаря быстрой адсорбции вирусов частицами почвы наиболее вероятна локализация вирусов в верхнем (пахотном) слое (0-25 см), однако важно определить проникновение вирусов и в более глубокие слои (75-100 см).

Исследование почвы проводят по эпизоотологическим и эпидемиологическим показаниям. Образцы почв (10-20 г) искателем с глубины 0-20 см в нескольких точках намеченного участка. Пробы смешивают и доставляют в лабораторию в стерильном полиэтиленовом мешке.

Обработка почвы включает десорбцию вирусов с поверхности частиц почвы в жидкую фазу (фосфатный буфер, pH 8,2), концентрирование вирусных частиц с помощью фильтрации жидкой фазы через фильтры из материала ФП или с помощью осаждения сульфатом аммония. Так же обрабатывают и осадок сточных вод.

Санитарная вирусология воздуха

Воздушно-капельный путь передачи инфекции характерен для инфекций дыхательных путей - наиболее массовых инфекционных заболеваний. Вирусы попадают в воздух в виде капельной фазы аэрозоля в результате чиханья, кашля, разговора и находятся в составе капель различной величины, состоящих из слюны, слизи и солей. В наиболее высоких концентрациях вирус содержится в крупных каплях, которые мало устойчивы в аэрозоле и быстро оседают. Более длительное время во взвешенном

состоянии находятся мелкие капли вирусного аэрозоля. Высыхание капель аэрозоля сопровождается инактивацией вируса.

Заражение респираторными вирусами в основном осуществляется за счет капельной фазы аэрозоля в закрытых помещениях. В первую очередь заражаются восприимчивые организмы, находящиеся в непосредственной близости от больного. Менее опасно вдыхание высохших капель, в которых часть вирусных частиц уже инактивирована. Концентрация частиц в аэрозольном облаке уменьшается за счет разведения большими объемами воздуха и оседания крупных капель аэрозоля. Вместе с тем наличие в аэрозоле мелких капель дает возможность вирусу проникать в нижние отделы дыхательных путей. Инфекционный агент может переноситься токами воздуха на значительные расстояния - десятки километров от очага инфекции. Распространение вирусов зависит от скорости ветра; напротив, дождливая погода ограничивает распространение вирусов.

Устойчивые во внешней среде вирусы, в первую очередь адено-вирусы, могут с пылевой фазой аэрозоля многократно поступать в воздух и длительно циркулировать в данном помещении.

По устойчивости вирусов в аэрозоле и на поверхностях их можно разделить на две группы: малоустойчивые, которые передаются от больных здоровым только в виде капельной фазы аэрозоля и более устойчивые вирусы, которые проникают в организм не только в виде капельной фазы, но и пылевой фазы аэрозоля.

Методы концентрации вирусов из воздуха. Для изучения микрофлоры воздуха - бактерий и плесневых грибов - существуют различные методы исследования и созданы многочисленные приборы для концентрации этих микроорганизмов из воздуха. Некоторые из приборов с соответствующими модификациями применяются и для концентрации вирусов из воздуха.

Поскольку вирусы, как правило, находятся в воздухе закрытых помещений в низкой концентрации, не позволяющей непосредственно их выделить, необходима предварительная концентрация вирусов из воздуха. Наиболее благоприятные условия для улавливания вирусного аэрозоля с сохранением инфекционной активности вирусов создаются путем концентрирования их в жидкой среде при соответствующем подборе улавливающей жидкости. Одним из наиболее эффективных приборов для выделения микроорганизмов из воздуха с целью исследования его вирусной зараженности является бактериоуловитель Речменского, а также приборы ПОВ-1 и ПАБ-1, в которых в качестве жидкой среды используются сахарный бульон или гидролизат лактальбумина. Улавливающую жидкость используют, как материал для выделения вирусов, либо проводят дальнейшую концентрацию вируса, добавляя в пробирки с улавливающей жидкостью 30% раствор полиэтиленгликоля с молекулярной массой 4000 или 6000. После центрифugирования суспензии удаляют верхний слой жидкости и анализируют вирус-содержащий нижний слой.

Помимо улавливания на жидких средах, для концентрации вирусов из воздуха могут быть использованы мембранные фильтры № 4 и фильтры из материала ФП. С поверхности фильтров вирусы смывают жидкой средой с антибиотиками.

Выживаемость вирусов в воздухе. Определение длительности выживания в воздушной среде различных респираторных вирусов является актуальным вопросом в связи с воздушно-капельным путем распространения респираторных инфекций. В экспериментальных исследованиях длительность выживаемости вирусов в аэрозольном состоянии зависит от таких факторов, как температура и относительная влажность воздуха, свет, состав улавливающей жидкости и т. д.

В закрытых помещениях основным фактором, влияющим на скорость инактивации вирусов в аэрозоле, является относительная влажность воздуха. Вирусы в различной степени устойчивы к показателям относительной влажности. Вирусы гриппа, парагриппа и респираторно-синцитиальный вирус быстрее инактивируются при высокой

относительной влажности и в меньшей степени – при низкой. Аденовирусы более устойчивы в воздухе при высокой относительной влажности и быстрее инактивируются при низкой относительной влажности. Вирусы везикулярного стоматита и кори устойчивы как при низкой, так и высокой относительной влажности и быстрее инактивируются при средней относительной влажности.

2.12 Лабораторная работа №12 (2 часа).

Тема: «Серологические свойства вирусов. Клеточные вирусспецифические антигены. Иммуноглобулины. Реакции антиген-антитело»

2.12.1 Цель работы: ознакомить студентов с серологическими реакциями, используемыми при диагностике вирусных болезней, и ролью специфических антигенов, противовирусных антител и неспецифических сывороточных ингибиторов вирусов.

2.12.2 Задачи работы:

1. Изучить способы удаления неспецифических ингибиторов из сыворотки крови.
2. Освоить принцип постановки РН, сущность, преимущества и недостатки.
3. Решить задачу на определение тира вируса

2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Наборы для постановки серологических реакций: (антигены для РИД специфическая преципитирующая диагностическая сыворотка, контрольный (отрицательный) антиген).
2. Исследуемые и нормальная сыворотки крови, ч
3. Задания для определения титра вируса по Риду и Менчу

2.12.4 Описание (ход) работы:

Для диагностики вирусных инфекций животных и человека широко используют различные серологические реакции. Они основаны на взаимодействии вирусных антигенов со специфическими (гомологичными) антителами.

Вирусы служат антигенами, так как их белки (внутренние и внешние оболочки) вызывают в организме выработку специфических антител. Антитела накапливаются в основном в сыворотке крови. Они способны соединяться в комплекс «антиген+антитело» только со своим специфическим антигеном. Если антигеном является инфекционный агент (вирус), то антитела его нейтрализуют; в этом состоит биологическая роль антител. Взаимодействие антител со своими антигенами возможно не только в живом макроорганизме, но и вне его (пробирке и др.). На этом основаны принципы действия серологических реакций (от лат. serum - сыворотка)

Таким образом, серологические реакции — это реакции взаимодействия антител с антигенами. Если взятая пара «антиген+антитело» гомологична (соответствует) друг другу, то в пробирке образуется комплекс «антиген+антитело», что позволяет обнаружить: 1) по известному антигену неизвестное антитело; 2) по известному антителу неизвестный антиген.

В вирусологии наиболее широко применяют следующие серологические реакции: 1) реакцию нейтрализации (РН); 2) реакцию торможения гемагглютинации (РТГА); 3) реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА); 4) реакцию связывания комплемента (РСК); 5) реакцию диффузационной преципитации (РДП); 6) реакцию иммунофлуоресценции (РИФ); 7) реакцию торможения гемадсорбции (РТГАд).

Эти реакции различаются между собой методом определения конечного комплекса «антиген+антитело», т. е. техникой постановки каждой из них.

Серологические реакции широко используют в вирусологической практике.

1. Для диагностики вирусных болезней человека, животных и птиц по обнаружению неизвестного вирусного антигена и установлению его вида с помощью известных

специфических антител, с одной стороны, и обнаружения, титрования неизвестных специфических антител с помощью известного вирусного антигена - с другой.

2. Для серологической оценки постvakцинального иммунитета по нарастанию титра антител в четыре раза и более в парных сыворотках крови (ретроспективная диагностика вирусных болезней). Для этого кровь берут два раза: 1-й раз - в начале болезни, 2-й - через 2 недели после первого взятия.

3. Для изучения иммунологического фона среди поголовья животных и птиц по числу сероположительных к тому или иному вирусу с целью прогноза.

4. Для изучения антигенной структуры вируса с помощью моновалентных сывороток к отдельным его компонентам.

5. Для установления антигенного родства вирусов.

6. Для оценки активности диагностических препаратов (гипериммунных сывороток) и вакцин.

7. Для изучения патогенеза вирусных болезней.

Специфические противовирусные антитела в организме животных и человека вырабатываются в результате естественного переболевания или иммунизации живыми или убитыми (инактивированными) вирусными вакцинами. Таким образом, создается активный приобретенный иммунитет. Пассивный приобретенный иммунитет создается введением в макроорганизм иммунных сывороток крови, гамма-глобулинов за счет содержащихся в них специфических противовирусных антител, а также при введении иммунолактона (молочные антитела) или же передается от матери (через плаценту, желток яйца, молозиво) и т. д.

При вирусных болезнях в макроорганизме могут быть выработаны четыре группы антител: вируснейтрализующие, комплементсвязывающие, преципитирующие и антигемагглютинирующие. Однако не все группы антител имеют однозначное значение в противовирусном иммунитете. Наибольшую роль играют вируснейтрализующие антитела. Они препятствуют вирусам адсорбироваться на поверхности чувствительных клеток и проникать в них и, кроме того, стимулируют фагоцитоз зараженных вирусами клеток макрофага. В результате этого в цитоплазме макрофага изолируется и обезвреживается скопление инфекционных вирионов и их ядовитых продуктов. Последовательность выработки антител в макроорганизме следующая: вначале появляются тяжелые 19S (IgA), за тем в течение короткого времени - 19S и 7S (IgG) и в конце - одни легкие 7S, которые могут синтезироваться несколько месяцев и лет.

Выработку специфических антител и их титр (количество) в сыворотке крови определяют с помощью различных серологических реакций в зависимости от вирусов: РН, РТГА, РНГА, РСК, РДП, РИФ и РТТАд.

В сыворотках крови животных и человека содержатся так называемые *неспецифические ингибиторы* вирусов. Как и антитела, они являются гуморальным фактором иммунитета; так же нейтрализуют инфекционную и гемагглютинирующую активность вирусов. Как и антитела, свое действие на вирусы неспецифические ингибиторы проявляют не только в организме (*ин виво*), но и в пробирке (*ин витро*). В серологических реакциях антитела используют не только в чистом виде, но и в виде сыворотки крови, содержащей определенные антитела. Эта же сыворотка крови содержит и неспецифические ингибиторы, действие которых на антиген складывается с действием антител, что ведет к искажению результатов серологических реакций. Поэтому все сыворотки крови, используемые в серологических реакциях, обязательно предварительно освобождают от неспецифических ингибиторов вирусов. Химическая структура их различна, поэтому и методы освобождения от них сывороток крови иные.

По физическим свойствам группы ингибиторов можно разделить на две подгруппы: термолабильные и термостабильные. Термолабильные ингибиторы разрушаются при прогревании сывороток крови в течение 30 мин при 56...63 °C в зависимости от вида животного, от которого получена сыворотка. Обычно перед

прогреванием сыворотки разводят физиологическим раствором не менее чем в 2 раза во избежание их свертывания.

Одни термостабильные ингибиторы выдерживают нагревание до 75 °C, другие — до 100 °C. От них сыворотки крови можно освободить путем обработки химическими реактивами или хорошо адсорбирующими веществами. Из химических реагентов наиболее широко используют диоксид углерода (CO₂) периодат калия (KIO₄), риванол, зимозан и другие, а из адсорбентов — каолин, бентонит, активированный уголь.

Метод удаления термостабильных ингибиторов выбирают в зависимости от вида животного, от которого получена сыворотка крови, и от вируса, антитела к которому будут использованы.

1. Разрушение (удаление) ингибиторов диоксидом углерода (CO₂). Сыворотку крови предварительно разводят 1:10 дистиллированной водой. Диоксид углерода пропускают через сыворотку из аппарата Киппа в течение 5...7 мин до помутнения жидкости (CO₂) образуется в результате реакции между бикарбонатом кальция и разбавленной соляной кислотой); образуется осадок белого цвета. Осадок удаляют центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин. Затем к 0,9 мл надосадочной жидкости добавляют 0,1 мл 8,5%-го NaCl и прогревают при 56 °C в течение 30 мин. Сыворотка готова для постановки реакции.

2. Разрушение (удаление) ингибиторов периодатом калия (KIO₄). На дистиллированной воде готовят 0,05 М раствор периодата калия (1,15 г KIO₄ + 100 мл воды). К 1 части такого раствора добавляют 1 часть неразведенной, но предварительно прогретой при 56 °C в течение 30 мин исследуемой сыворотки крови; смесь оставляют при комнатной температуре на 2 ч. Затем для нейтрализации действия периодата калия к смеси добавляют равное количество 5%-го раствора глюкозы. Таким образом, исследуемая сыворотка крови разведена в 4 раза и готова для постановки реакции.

3. Удаление ингибиторов каолином. К 0,2 мл сыворотки крови добавляют 0,8 мл физиологического раствора; смесь прогревают при 56 °C в течение 30 мин (разведение исследуемой сыворотки 1:5) и добавляют 1 мл 25%-й взвеси каолина в физиологическом растворе. Полученную смесь встряхивают и оставляют на 20 мин при комнатной температуре, затем центрифугируют в течение 10...20 мин при 2000 об/мин. Надосадочную жидкость используют для серологической реакции с учетом, что исследуемая сыворотка крови разведена 1: 10.

Принцип реакции нейтрализации состоит в том, что в пробирке соединяют равные объемы сыворотки крови и суспензии вируса и после выдержки определяют, сохранился ли в смеси активный вирус. Делают это путем заражения смесью, чувствительной к взятому вирусу живой системы (биопроба на тест-объектах). Отсутствие действия вируса на тест-объект (отрицательная биопроба) при положительном контроле расценивается как свидетельство нейтрализации биологической активности вируса антителами сыворотки и, следовательно, гомологичности антител сыворотки и антигенов вируса. При этом чем больше антител в сыворотке к взятому вирусу, тем в более высоком разведении она ещё способна нейтрализовать определенную (стандартную) дозу вируса. В случае положительной биопробы считают, что нейтрализации вируса не произошло, так как сыворотка не содержит антител к взятому вирусу. В зависимости от вида тест-объектов реакция нейтрализации может быть поставлена на лабораторных животных, куриных эмбрионах, культуре клеток.

Так как антитела с гомологичными антигенами взаимодействуют в строго определенных количественных соотношениях и содержание антител в сыворотке всегда неизвестно, берут не одну а ряд пробирок, в которых вирус и сыворотка находились бы в разных соотношениях. Для этого к разным дозам (разведениям) сыворотки добавляют одну и ту же дозу вируса, или к разным дозам (разведениям) вируса добавляют одну и ту же дозу сыворотки. Эти две модификации РН технически выполняются неодинаково.

Реакция нейтрализации может быть поставлена для идентификации и определения

титра вируснейтрализующих антител в исследуемых сыворотках крови. В этом случае компонентами реакции являются: исследуемая сыворотка, стандартный вирусный антиген, тест-объект, для контрольной реакции - диагностическая и нормальная сыворотки крови. Реакцию ставят в два этапа: первый этап - определение титра вируса; второй - постановка основного опыта РН в этом варианте.

Для определения *титра вируса* готовят 10-кратные разведения вируссодержащего материала, обычно с 10^{-1} до 10^{-9} , так как его титр редко превышает указанную величину. Берут 9 стерильных пробирок и в каждую из них вносят по 4,5 мл фосфатно-буферного раствора. Затем в первую добавляют 0,5 мл вируссодержащего материала (разведение 1:10 или 10^{-1}), смесь перемешивают и 0,5 мл переносят во вторую пробирку (разведение 1:100 или 10^{-2}). Из второй - 0,5 мл - в третью (10^{-3}) и т.д., пользуясь при этом всякий раз чистой пипеткой. Каждым разведением вируссодержащего материала заражают лабораторных животных (не менее 4 гол.). Объем вводимого материала зависит от метода заражения, который связывают с тропизмом вируса. Например, при заражении нейротропным вирусом исследуемый материал вводят в мозг, пневмоторпным - через нос, дерматропным - на скарифицированную кожу или внутрикожно и т.д. За животными наблюдают в течение 3...30 дней и более, в зависимости от возраста и вида животного и др. факторов. Наибольшее разведение вируса, обеспечивающее гибель половины (50%) зараженных животных, принимают за титр вируса, обозначаемого в данном случае символом LD_{50} (летальная доза 50% использованных для заражения животных). Допустим, вирус в разведении 10^4 вызвал гибель 50% животных, это разведение и будет соответствовать 1 LD_{50} . Следовательно, 100 LD_{50} будет соответствовать разведению 10^2 (1:100). Это разведение чаще всего используют.

Аналогично определяют титр вируса на РКЭ по их гибели (ELD_{50} - эмбриональная летальная доза) или по патологоанатомическим изменениям (EID_{50} - эмбрионинфицирующая доза) в культуре клеток по цитопатическому действию (1 TCD_{50} - тканевая цитопатическая доза).

Постановка реакции. После установления титра вируса готовят двукратные разведения исследуемой сыворотки, начиная с 1:2 до 1:128 и более, в зависимости от предполагаемого титра вируснейтрализующих антител, в объеме 0,5 мл и к каждому разведению сыворотки добавляют по 0,5 мл вируссодержащего материала в разведении, соответствующем 100 LD_{50} . Одновременно ставят контроли:

- а) контроль вируса (100 LD_{50} вируссодержащего материала соединяют с физиологическим раствором в равных объемах);
- б) контроль иммунной сыворотки (иммунную сыворотку в рабочем титре соединяют с вируссодержащим материалом в равных объемах);
- в) контроль нормальной сыворотки (нормальную сыворотку соединяют с 100 LD_{50} вируса в равных объемах),

Пробирки встряхивают и выдерживают в термостате при 37 °С в течение 30...60 мин. Смесью из каждой пробирки, в том числе и из контрольных, заражают чувствительных лабораторных животных (4 гол.). Идентификацию вируснейтрализующих антител с применением данного тест-объекта проводят при диагностике ящура, бешенства, лейкоза птиц. Объем и место введения смеси те же, что были выбраны при определении 1 LD_{50} . Сроки наблюдения за животными аналогичны вышеуказанным.

Учет результатов. Вначале учитывают результаты контролей. В первом и третьем из них животные должны погибнуть, во втором — остаться в живых. Если исследуемая сыворотка содержит антитела, то они будут нейтрализовать патогенное действие вируса и животное не погибает. Однако, сыворотку используют в разведениях, и, в связи с этим, в определенной пробирке антител окажется недостаточно для нейтрализации вируса. Процент гибели животных будет нарастать в направлении большего разведения. Все это дает возможность определить титр вируснейтрализующих антител, который рассчитывается по методам Рида и Менча или Кербера. За титр антител исследуемой

сыворотки принимают то разведение, которое предотвращает гибель 50% лабораторных животных от действия 100 ЛД₅₀ вируса. При использовании РКЭ результат РН учитывают по способности вируснейтрализующих антител сыворотки предотвращать гибель эмбрионов, появление фокусов поражения на хорионаллантоисе и снижать титр вирусных гемагглютининов у 50% куриных эмбрионов. Эти методы применимы при определении нейтрализующей активности сывороток по отношению к вирусам гриппа, оспы, болезни Ньюкасла, инфекционного ларинготрахеита и бронхита кур.

Результат РН в культуре клеток оценивают по способности вируснейтрализующих антител исследуемой сыворотки в определенных разведениях предотвращать развитие цитопатогенного эффекта (ЦПЭ), что используется при диагностике болезни Ауески, ринопневмонии лошадей, вирусного гастроэнтерита свиней, болезни Тешена, лейкоза птиц и др. По торможению феномена гемадсорбции к зараженным вирусом клеткам эритроцитов курицы, человека, морской свинки диагностируют грипп и парагрипп.

В зависимости от цели исследования применяют два варианта постановки РН: 1 – идентификация антител в сыворотке крови (в данном случае соединяют равные объемы разных разведения сыворотки с постоянной дозой вируса); 2 - для идентификации и изучения неизвестного вируса (соединяют равные количества одного и того же разведения сыворотки с убывающими дозами вируса). Результаты реакции как в первом, так и во втором вариантах определяют о использованием лабораторных животных, РКЭ и культур клеток.

Компонентами реакции в 1-м варианте постановки РН являются: исследуемая сыворотка, стандартный вирусный антиген, тест-объект, для контрольной реакции - диагностическая и нормальная сыворотки крови

Учет результатов. Вначале учитывают результаты контролей. В первом и третьем из них животные должны погибнуть, во втором — остаться в живых. Если исследуемая сыворотка содержит антитела, то они будут нейтрализовать патогенное действие вируса и животное не погибает. Однако, сыворотку используют в разведениях, и, в связи с этим, в определенной пробирке антител окажется недостаточно для нейтрализации вируса. Процент гибели животных будет нарастать в направлении большего разведения. Все это дает возможность определить титр вируснейтрализующих антител, который рассчитывается по методам Рида и Менча или Кербера. За титр антител исследуемой сыворотки принимают то разведение, которое предотвращает гибель 50% лабораторных животных от действия 100 ЛД₅₀ вируса. При использовании РКЭ результат РН учитывают по способности вируснейтрализующих антител сыворотки предотвращать гибель эмбрионов, появление фокусов поражения на хорионаллантоисной оболочке и снижать титр вирусных гемагглютининов у 50% куриных эмбрионов. Эти методы применимы при определении нейтрализующей активности сывороток по отношению к вирусам гриппа, оспы, болезни Ньюкасла, инфекционного ларинготрахеита и бронхита кур.

Результат РН в культуре клеток оценивают по способности вируснейтрализующих антител исследуемой сыворотки в определенных разведениях предотвращать развитие цитопатогенного эффекта

Задание №1

Рассчитать титр титра антител по формуле Рида и Менча, или по формуле Кербера по следующим данным:

Разведение сыворотки	Число куриных эмбрионов	Доза заражения	Выжило (+) (r)	Пало (-)
1:2= 10 ^{-0,3}	4	0,2	4	0
1:4= 10 ^{-0,6}	4	0,2	4	0
1:8= 10 ^{-0,9}	4	0,2	3	1
1:16= 10 ^{-1,2}	4	0,2	2	2
1:32= 10 ^{-1,5}	4	0,2	2	2
1:64= 10 ^{-1,8}	4	0,2	1	3
1:128= 10 ^{-2,1}	4	0,2	1	3

1:256= $10^{-2.4}$	4	0,2	0	4
--------------------	---	-----	---	---

Оценить результаты.

2.13 Лабораторная работа №13 (2 часа).

Тема: «Использование в вирусологии РГА»

2.13.1 Цель работы: изучить сущность и технику постановки РГА и РТГА.

2.13.2 Задачи работы:

1. Изучить цель постановки РГА и РТГА
2. Научиться готовить компоненты реакции
3. Выполнить постановку РГА и РТГА с целью определения титра вируса и его идентификации.

2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Гемагглютинин и антитела к гемагглютинину.
2. 1% суспензия эритроцитов кур или морской свинки.
3. Пластиковые панели с лунками.
4. Аппарат Такачи.
5. Сосуд с дезинфицирующим раствором.
6. Спиртовки.

2.13.4 Описание (ход) работы:

В основе механизма реакции гемагглютинации (РГА) лежит адсорбция вируса на поверхности эритроцитов, сопровождающаяся склеиванием их. Гемагглютинация, как и гемадсорбция широко используется для выявления ортомиксовирусов, парамикровирусов и вирусов других семейств. Некоторые вирусы можно выявить только с помощью гемагглютинации, либо гемадсорбции (парагрипп крупного рогатого скота, ньюкаслская болезнь, грипп птиц др.). Ряд вирусов обнаружили с помощью данных методов.

Компоненты: РГА

Исследуемый вируссодержащий материал (экстразембриональная жидкость, суспензии хорион-аллантоисных оболочек и тканей куриных эмбрионов, экстракти из органов животных, культуральная жидкость инфицированных клеток).

Взвесь эритроцитов 0,5% - 1%.

Изотонический раствор N301 0,85%.

Перед постановкой РГА вируссодержащий материал освобождают от крупных частиц центрифугированием при 2000 об/мин. - 10 - 15 минут или фильтрованием. Для вирусологических работ используют эритроциты кур, гусей, морских свинок, белых крыс, баранов и человека (0 - группы). Четкость проявления РГА обратно пропорциональна числу эритроцитов, содержащихся в системе. Их следует уменьшать. Точно определить их концентрацию можно с помощью спектрофотометра.

Техника постановки РГА.

Первый метод - качественный. РГА на стекле с 0,5% взвесью эритроцитов на физиологическом растворе. На обезвоженные стекла наносят каплю 5%-ной взвеси эритроцитов и каплю вируссодержащего материала; перемешивают и наблюдают за появлением хлопьев агглютинированных эритроцитов. При положительной реакции их обнаруживают через 1 - 3 минуты.

Второй метод - принимают для титрования вирусов по гемагглютинирующему активности. Готовят ряд последовательных разведений (обычно двукратных) исследуемого вируса. Реакцию ставят в пробирках Флоринского или специальных плексигласовых плашках микро- и макрометодом. В ряд лунок планшета наливают по 0,2 мл изотонического раствора хлористого натрия, затем в первую лунку вносят 0,2 мл вируссодержащего материала. С помощью пипетки переносят по 0,2 мл последовательно

из первой лунки во вторую и т.д. Из последней удаляют в дезраствор. Во все лунки с различными разведениями вируса добавляют по 0,2 мл 1% взвеси эритроцитов.

Разведение BCM	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
0,85 % Na Cl	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
BCM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
1% взвесь эритроцитов	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Встряхиваем, экспозиция 20-40 минут										
Учёт реакции										

Ставят контроль эритроцитов на возможность спонтанной агглютинации. Для этого к 0,2 мл изотонического раствора добавляют 0,2 мл 0,5 - 1% взвеси эритроцитов. Осторожно встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 30 - 60 минут (в зависимости от вида эритроцитов и температуры помещения).

Оценка реакции гемагглютинации

Оценивают в крестах от + до +++ по форме осадка эритроцитов:

+++ - интенсивная и быстрая агглютинация эритроцитов, которые осаждаются на дне и на стенках лунки сплошным слоем (зонтик).

++ - менее интенсивная агглютинация, большинство эритроцитов агглютинировано вирусом и на дне отчетливый «зонтик», но в центре незначительное количество неагглютинированных эритроцитов.

+ - слабая. Большинство эритроцитов не агглютинировано, на дне лунки осадок в виде «пуговки», при наличии небольшого количества агглютинированных эритроцитов, т.е. небольшой «зонтик», создающий неровность краев «пуговки».

- - все эритроциты не агглютинированы и осели в центре лунки в виде «пуговки» с ровными краями.

В реакции гемагглютинации определяют титр вируса, необходимый для последующих исследований. За единицу титра вируса принимают 1 ГАЕ. 1 ГАЕ - наименьшая доза вируса, которая еще способна вызвать гемагглютинацию (не менее++). Титр вируса выражается числом таких единиц вируса в определенном объеме вируссодержащего материала.

Реакция торможения гемагглютинации.

Если вирус обработать специфическими антителами, то он утрачивает способность адсорбироваться на поверхности эритроцитов. На этом принципе основана специфическая реакция торможения или задержки гемагглютинации (РТГА, РЗГА). Она применяется для идентификации вирусов, обнаружения и титрования антител в сыворотках при использовании известного вируса РТГА - высокоспецифичная реакция проста в постановке, быстро дает ответ, не требует стерильной работы.

Для постановки РТГА используют следующие компоненты: изотонический раствор хлористого натрия, специфическая сыворотка, вируссодержащий материал (рабочая доза вируса в титре 4 ГАЕ), взвесь эритроцитов 0,5 - 1%.

Подготовка сыворотки.

В сыворотках содержаться агглютинины к эритроцитам животных гетерологичных, иногда и гомологических видов. Во всех случаях сыворотку не разбавляют до такой степени, при которой эти агглютинины уже не проявляют активности, их нужно удалить. Лишь после этого сыворотку можно титровать с помощью РТГА. Агглютинины удаляют адсорбированием сыворотки концентрированной суспензией соответствующих эритроцитов при 4°C.

Проведение основного опыта РТГА.

Готовят двухкратные разведения сыворотки. Во все лунки наливают по 0,2 мл изотонического раствора хлористого натрия. В первую луночку вносят 0,2 мл испытуемой

сыворотки (в разведении 1:5) и переносят пипеткой последовательно из первого во вторую и т.д. по 0,2 мл. Последнее разведение можно оставить как резервное на случай, если при первом титровании титр антител в сыворотке будет выше ожидаемого, затем во все луночки добавляем 0,2 мл вируса содержащего 4 ГАЕ. Во все лунки вносят 0,2 мл ВСМ, экспозиция 20 минут, во все лунки вносят 1%-ную взвесь эритроцитов. Встряхивают, экспозиция 20 минут.

2.14 Лабораторная работа №14 (2 часа).

Тема: «Реакция диффузной преципитации в геле. Принцип и техника постановки»

2.14.1 Цель работы: изучить сущность и технику постановки реакции диффузационной преципитации.

2.14.2 Задачи работы:

1. Рассмотреть сущность РИД
2. Подготовить компоненты для постановки РИД
3. Выполнить постановку РИД.

2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Диагностический набор для постановки РИД
2. Оборудование для приготовления агарового геля
3. Предметные стекла, чашки Петри, пастеровские пипетки, пробойники для вырезания лунок в агаре, эксикатор с влажной фильтровальной бумагой, расплавленный агар в пробирках, дезинфицирующий раствор.

2.14.4 Описание (ход) работы:

Реакция диффузии преципитации в агаровом геле широко используется в лабораторной диагностике вирусных болезней.

Сущность реакции заключается в том, что специфические антигены и антитела диффундируют в геле агара из мест локализации навстречу друг другу и, взаимодействуя, образуют полосы преципитации (комплекс: антиген + антитело), которые хорошо заметны на фоне прозрачного геля. Преципитат представляет собой барьер с селективными свойствами - в нем связываются только однотипные антигены и антитела, но он легко проницаем для других неродственных компонентов. Скорость диффузии антигена и антител при одинаковой плотности агара обратно пропорциональна размерам их молекул, т.е. чем меньше молекула антигена, тем быстрее он диффундирует в геле и наоборот. Вследствие различий в скорости диффузии отдельных антигенов, а также различного содержания их в исследуемом многокомпонентном растворе и специфических антител в иммунной сыворотке в агаре возникают многочисленные полосы преципитации, соответствующие отдельным системам антиген - антитело. РИД используют в двух вариантах: 1) для определения видовой принадлежности антигена; 2) для обнаружения специфических антител в исследуемой сыворотке крови. Кроме того, ее можно применять для спектрального анализа простых и ложных антигенных систем и установления количественного содержания антигена в разных субстратах, определения общего набора и количественного содержания антител в соответствующих иммунных сыворотках, получаемых в разное время от различных видов животных и человека, контроля за чистотой получаемых антигенных препаратов и диагностических сывороток; изучения антигенного родства между вирусами.

Различают простую и двойную иммунодиффузию. В первом случае диффундирует один компонент, во втором - оба. В зависимости от того происходит ли диффузия по одной общей оси или во все стороны радиально, из резервуара в среду, иммунодиффузия называется линейной или радиальной.

В настоящее время используется ряд методов диффузационной преципитации: 1)

метод простой диффузии в агаровый гель; 2) метод двойной диффузии в агаровый гель (в пробирках); 3) метод двойной диффузии в агаровый гель (в капиллярах) по Вязову; 4) метод простой радиальной иммунодиффузии по Манчини; 5) метод двойной диффузии в агаровый гель по Оухтерлони.

Компоненты РДП

Компонентами 1-го варианта реакции являются: вируссодержащий материал (исследуемый антиген), преципитирующая сыворотка, 1%-ный агаровый гель.

Компонентами 2-го варианта: исследуемая сыворотка крови, вирусный диагностикум и 1%-ный агаровый гель. Для контрольной реакции необходимы: нормальная сыворотка крови животного — продуцента преципитирующей сыворотки, контрольный антиген — экстракт ткани здорового животного того же вида, от которого получен вируссодержащий материал (ткань должна быть аналогична той, в которой локализуется вирус). Необходимым компонентом реакции иммунодиффузии является гелевая среда, приготовленная из агара. К агаровому гелю предъявляют следующие требования. Он должен быть прозрачным, достаточно плотным (обычно используют 1-1,5 или 2%-ный раствор агара), стерильным, pH должен быть в пределах 6,4-8,5. Чаще всего используют агар фирмы "Дифко" или очищенную агарозу. Приготовление геля из очищенного агара "Дифко" несложно. В этом случае берут 1 весовую часть агара и добавляют к ней 99 весовых частей физиологического раствора (можно использовать забуференные или буферные растворы с pH 7,3-7,4). Колбочку со смесью ставят в кипящую водяную баню, растворяют агар и добавляют консервант (мертиолят натрия 1:10000). Затем смесь разливают по пробиркам и употребляют по мере надобности.

Постановка РДП. Проводят в двух модификациях: макропреципитация в агаровом геле в чашках Петри и микропреципитация в агаровом геле на предметных стеклах. В последнее время макропреципитацию в чашках Петри применяют реже из-за необходимости большого количества компонентов. Микропреципитация протекает быстрее (расходуется меньше реагентов), технически она не сложнее макрометода и по чувствительности не уступает ему. Макропреципитация в агаре в чашках Петри сводится к следующему. Расплавленный агаровый гель в количестве 25 мл наливают в чашки Петри. В остывшей агаровой пластине делают отверстия при помощи пробойника или стеклянной трубочкой отверстия (диаметр 4-7 мм и более, в зависимости от цели опыта). В последнем случае для того, чтобы лунки были расположены на равных расстояниях, под чашку необходимо подкладывать трафарет. Лунки должны отстоять друг от друга по меньшей мере на 3 мм, расстояние более 10 мм употребляется редко. Агаровые пробки удаляют иглой, пинцетом или канюлей, соединенной с вакуумной установкой. Необходимо при этом избегать отслоения от стекла и повреждения агара.

При исследовании антигенов в центральную лунку левого шестиугольника (1-й вариант расположения лунок) пастеровской пипеткой наливают 2-3 капли преципитирующей сыворотки или специфического γ -глобулина, в четыре периферийные - исследуемые антигены, в пятую - специфический антиген (контроль №1), в шестую - антиген из нормальной ткани (контроль №2). В центральную лунку правого шестиугольника наливают 2-3 капли нормальной сыворотки, а в остальные - исследуемые антигены, антиген из нормальной ткани, стандартный вирусный антиген (соответственно контроли №3-8). Компоненты РИД вносят с таким расчетом, чтобы у верхнего края образовался несколько вогнутый мениск и жидкость не растекалась по поверхности агара.

После заполнения лунок чашки Петри закрывают крышками и помещают во влажную камеру при температурах, 4 °C, 18-25°, 37-38 °C на 24-72 ч (в зависимости от вида вируса). Реакцию оценивают визуально в косопроходящем или отраженно-рассеянном свете, начиная с контрольной.

Если в исследуемых сыворотках содержатся преципитины, соответствующие антигену, между центральной лункой и первыми четырьмя лунками, расположенными по периферии, наблюдают полосы преципитации.

Для микропреципитации в агаре на предметных стеклах необходимы чистые, тщательно обезжиренные предметные стекла. Их помещают на горизонтальную поверхность (стол). Слегка подогретой пипеткой ($40 - 45^\circ$) набирают нужное количество (3-4 мл) расплавленного ($50-60^\circ$) 1%-ного агарового геля и выливают на поверхность стекла. Толщина слоя агара при этом должна быть 1-1,5 мм. После застывания агара на поверхности каждого стекла стандартными штампами выдавливают лунки, из которых затем отсасывают агар. Размеры и форма штампа могут быть различными, в зависимости от цели опыта. Затем в лунки пастеровскими пипетками с тонко оттянутыми концами или микропипетками наливают антигены и антисыворотки (аналогично макрометоду). После заполнения луночек реагентами стекла помещают во влажную камеру (чашка Петри с фильтровальной бумагой, смоченной водой; эксикатор с герметически закрывающейся крышкой и др.) и оставляют при комнатной температуре или ставят в термостат (37°C).

Учет реакции

Предварительный учет результатов РИД производят через 8...10 ч, основной - через 24 ч и окончательный - через 48...72 ч.

При оптимальном соотношении антигенов (АГ) и антител (АТ) после окончания диффузии линия преципитации располагается примерно на середине расстояния между лунками, перпендикулярно к оси, соединяющих центра. Если один из компонентов реакции присутствует в большем количестве, чем другой, то линия преципитации сдвигается в сторону лунки с меньшим содержанием реагента. При достаточно высокой концентрации компонентов реакции она может достигать соседнего сектора агаровой пластиинки, в котором формируются полосы преципитации другой антигенной системы. Характер расположения полос определяет степень родства антигенов. Принципиально возможны четыре варианта расположения линий преципитации .

1. Обе линии преципитации полностью сливаются. Это говорит об идентичности обоих антигенов.
2. Линии преципитации пересекаются. Это значит, что реагирующие с АТ детерминанты АГ неидентичны и, следовательно, сами антигены различны.
3. Одна линия длиннее и продолжается за другую в виде так называемой "шпоры".
4. Обе линии преципитации перекрещиваются и сливаются одновременно. Это значит, что оба антигена содержат как одинаковые, так и различные детерминанты, которые вступают в реакцию с антителами полиспецифической сыворотки.

2.15 Лабораторная работа №15 (2 часа).

Тема: «Метод флюоресцирующих антител

2.15.1 Цель работы: ознакомиться с методикой флуорохромирования, и различными вариантами метода иммунофлуоресценции, применяемыми в вирусологической практике.

2.15.2 Задачи работы:

1. Ознакомиться с сущностью и методикой постановки прямой и непрямой реакции иммунофлюоресценции

2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблицы по теме занятия

2.15.4 Описание (ход) работы:

Люминесценция (Lumen – свет, escentia – суффикс для обозначения слабого действия лат.) – свечение, возникшее в результате воздействия какой-либо возбуждающей энергии. В соответствии с видом возбуждающей энергии различают: биолюминесценцию; рентгенолюминесценцию; фотолюминесценцию.

Свечение, возникающее под воздействием света, разделяют на флюоресценцию и фосфоресценцию. Флюоресценция - свечение, возникающее в момент облучение и

прекращающееся сразу после окончания его. Фосфоресценция - свечение, продолжается длительное время после окончания процесса возбуждения.

Вещества, обладающие интенсивной первичной флюоресценцией, называются флюорохромами (флюоресцирующими красителями). Флюорохромы широко используются для обработки веществ, имеющих слабую первичную флюоресценцию. Для возбуждения используются ртутно-кварцевые лампы сверхвысокого давления. С помощью системы светофильтров выделяют сине-фиолетовую часть спектра, возбуждающую флюорохром и в конечном итоге, выявляющую исследуемый объект, обладающий очень слабой собственной первичной флуоресценцией.

В вирусологической практике люминесцентную микроскопию используют в двух основных методов: простым флюорохромированием и методом флюоресцирующих антител.

Метод простого флюорохромирования. На свежий мазок-отпечаток или суспензия инфицированных клеток. На мазок наносится 1 - 2 капли рабочего раствора акридинового оранжевого (1:1000) накрывается покровным стеклом и рассматривается препарат в течение первых 10 - 20 минут после приготовления под люминесцентным микроскопом.

2. Мазки-отпечатки или инфицированные культуры клеток (на покровных стеклах), фиксируют 96⁰ этиловым спиртом в течение 15 - 30 мин. Промывают раствором Хенкса, наносят на препарат 1 – 2 капли раствора акридинового оранжевого (1:1000), через 5 -10 минут просматривают в люминесцентном микроскопе с масляной иммерсией или с сухой системой. Масло должно быть не флуоресцирующим.

Чтобы различить происхождение ДНК и РНК (клеточное или вирусное) применяют обработку 0,5% раствором ДНК-азы или РНК-азы в течение 5 - 10 минут или облучение УФ лучами. Свечение клеточных нуклеиновых кислот исчезает сразу же, а вирусные продолжают светиться еще в течение 20 - 30 минут. На этом основано доказательство специфичности вирусных нуклеиновых кислот.

С помощью красителей этой группы (акридиновой) изучено строение и развитие различных ДНК- и РНК-содержащих вирусов в культуре клеток, изучено действие антиметаболиков и антибиотиков на зараженную клетку в однослойной культуре клеток.

Метод простого флюорохромирования несложен, однако он не дает в большинстве случаев полностью дифференцировать возбудителей болезни.

Метод флюоресцирующих антител.

В основе этого метода лежат принципы, общие для всех иммунологических методов, построенных на взаимодействии между антигеном и антителами. Установлено, что молекулы антигенов могут химически связываться с флюорохромами без нарушения своей иммунологической специфичности. При встрече с гомологичным антигеном такое флюоресцирующее антитело фиксируется на нем. В люминесцентном микроскопе комплекс антиген-флюоресцирующее антитело излучает свечение, цвет которого зависит от вида флюорохрома.

Комплекс антител с флюорохромом называется коньюгатом.

Задачи, решаемые с помощью иммунофлюоресценции:

Выявление антигена в исследуемом материале.

Определение локализации и динамики синтеза вирусных антигенов в клетке.

3. Идентификация зараженных вирусом клеток в системах, где отсутствует цитопатогенный эффект.

Одним из главных достоинств данного метода является простота и быстрота получения результата.

Недостатки метода: главным недостатком является вероятность неспецифической окраски, а следовательно ограниченная чувствительность.

Критерии специфичности иммунофлюоресценции:

Окрашивание должно быть только в препарате, содержащем антиген и должно ограничиваться только антигеном.

Не должно быть иммунофлюоресценции при окрашивании нормальной конъюгированной сывороткой.

Флуоресценция должна блокироваться в результате предварительного применения специфической немеченой сывороткой (специфическая ингибиция или блокировочный тест). Чаще бывает сильное ослабление свечения.

Причины неспецифической флюоресценции: флуорохром не связан с антителами; флуоресцирующие антитела связываются с гетерологичными антигенами; белки конъюгированной сыворотки имеют отрицательный заряд и выступают как окрашивание кислоты.

В вирусологической практике широко используется два метода применения флуоресцирующих антител для обнаружения и идентификации антигенов: прямой и непрямой.

Приготовление и фиксация препарата.

В качестве объекта исследования могут быть использованы различные препараты: мазки-отпечатки поверхности слизистых оболочек, срезы органов и тканей, соскобы, гистологические срезы, препараты тканевых культур и т.д.

Препараты готовят на обезжиренных в смеси спирта и эфира (1:1) и не имеющих царапин предметных стеклах. Препарат подсушивают на воздухе, затем фиксируют. В процессе фиксации антигена происходит прикрепление материала к стеклу и перевод в нерастворимое состояние антигенных структур. Фиксация не должна изменить морфологию исследуемого вещества и иммунологическую реактивность антигена. В качестве фиксаторов применяются следующие соединения: уксусная кислота, метиловый, этиловый, бутиловый спирты, ацетон, диоксан. Чаще используют охлажденный до - 15°C химически чистый ацетон. Длительность фиксации 10 - 15 минут. Флюорохромами, применяемыми в основном для приготовления коньюгатов является ФИТЦ - флюоресцина изотиоционат и РСХ - родамина сульфохлорид. ФИТЦ дает зеленое свечение, РСХ - красное свечение.

Для получения антител используют высокоактивные гипериммунные противовирусные сыворотки, максимально освобожденные от гетероантител, из которых выделяют электрофоретически гомогенные фракции, содержащие антитела. Коньюгирование флюорохрома с Ат происходит при температуре 2 - 4°C, щелочном значении pH (8,9 - 9,0) при постоянном перемешивании без вспенивания в течение 30 - 60 минут для РСХ и от 2 до 24 часов для ФИТЦ. После окончания коньюгирования, коньюгат необходимо очистить от непрореагировавших компонентов, органических растворителей и солей буферных растворов пропусканием его через активированный уголь, сефадекс или ионообменные смолы. Хранить коньюгат необходимо при температуре - 20°C или при 4°C с добавлением тиомерсала в разведении 1:10000. Отечественная промышленность выпускает сухие специфические иммунные люминесцирующие сыворотки.

Ход исследования материала прямым МФА.

Подготовка препарата (мазок-отпечаток) срез, культура клеток. Фиксация. Окрашивание. На препарат наносится коньюгат на 10 - 60 минут и помещают во влажную камеру при 37°C. Отмыть физиологическим раствором от непрореагировавшего коньюгата. Подсушить. Нанести нефлюоресцирующее иммерсионное масло и исследовать под люминесцентным микроскопом.

С целью уменьшения неспецифической флуоресценции препарат обрабатывают смесью коньюгатов - коньюгат - ФИТЦ со специфическими антителами и коньюгат РСХ с альбумином. Коньюгат ФИТЦ реагирует с антигеном, а коньюгат РСХ с тканевым белком. Правильно подобранная смесь коньюгатов должна обеспечивать изумрудно-зеленое специфическое свечение внутриклеточно-расположенных вирусов, четко

контрастирующее на фоне оранжево-красной или желто-оранжевой флуоресценции окружающих клеток и прочих гетерогенных частиц.

Непрямой метод флюоресцирующих антител

Процесс выявления вирусного антигена проходит в два этапа.

I этап - обработка препарата гомологичным нефлюоресцирующими антителами. Образуется невидимый комплекс антиген - антитело. Для обнаружения его применяют антивидовую сыворотку (ФТИЦ - антигамма-глобулин) соответствующую виду животного, продуцента гомологичных антител. Антивидовые сыворотки получают иммунизируя животное глобулинами тех видов, которые служат продуcentами гомологичных антител.

II этап - обработка ФИТЦ антигамма-глобулином.

Ход исследования материала непрямым методом.

На фиксированный препарат наносится капля обычной нефлюоресцирующей противовирусной сыворотки. Выдерживают при температуре 37°C в течение 20 - 30 минут для связывания антигена с антителами. Отмыть несвязавшиеся антитела трижды буфером, поместить во влажную камеру. Нанести каплю ФИТЦ-антигамма-глобулина на 30 минут при температуре 34°C. Отмыть буфером. Подсушить. Нанести нефлюоресцирующее иммерсионное масло, смотреть под люминесцентным микроскопом.

Преимущества непрямого метода.

Метод применяется не только для обнаружения антигена, но и для обнаружения и титрования антител. Метод более чувствителен, чем прямой, т.к. антиген связывается с большим количеством флюоресцирующего антиглобулина. Можно использовать одну меченую сыворотку для обнаружения различных вирусов.

Результат учитывают по интенсивности и специфичности флуоресценции исследуемого объекта по следующей схеме:

- ++++ - яркая, сверкающая флуоресценция изумрудно-зеленого цвета
- +++ - яркая флуоресценция зеленого цвета
- ++ - слабая флуоресценция желто-зеленого цвета
- + - очень слабая флуоресценция неопределенного цвета
- объект не флуоресцирует.

Критерии специфичности иммунофлюоресценции:

а) окрашивание должно быть только в препарате, содержащем антиген, и должно ограничиваться только антигеном;

б) не должно быть иммунофлюоресценции при окрашивании конъюгированной нормальной сывороткой. Это явление не должно наблюдаться и при использовании нормальной сыворотки в промежуточной реакции при непрямом методе ИФ;

в) флюоресценция должна блокироваться в результате предварительного применения намеченной специфической иммунной сыворотки (специфическая ингибиция). Чаще бывает сильное ослабление свечения;

г) реакция должна угнетаться только при адсорбции антител сыворотки специфическими антигенами.

Задание №1

Посмотреть фото и видеоматериалы препаратов люминесцентной микроскопии с использованием флюоресцирующих красителей (конъюгатов, антивидовых флюоресцирующих сывороток).

2.16 Лабораторная работа №16 (2 часа).

Тема: «Использование в вирусологии метода иммуноферментного анализа. Принцип, схемы и методика постановки ИФА»

2.16.1 Цель работы: ознакомится с различными вариантами ИФА, применяемыми в вирусологической практике

2.16.2 Задачи работы:

1. Изучить сущность постановки ИФА

2. Варианты постановки ИФА

2.16.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблицы по теме занятия

2.164 Описание (ход) работы:

Иммуноферментный метод основан на взаимодействии антигена и антител, где в качестве метки в конъюгате (комплекс антитела или антигена с ферментом) используется фермент пероксидаза или другие и соответствующая им субстратная смесь (5-аминосалициловая кислота и пероксид водорода или ортофенилендиамин и пероксид водорода). По чувствительности этот метод в 100 раз и более превышает РНГА, РДП и др. Предел чувствительности иммуноферментного метода достигает 10 нг/мл специфического белка.

Иммуноферментный метод в вирусологии используют для выявления и идентификации вируса и антител к нему.

Различают две разновидности иммуноферментного метода: гомогенный и гетерогенный. Гетерогенный метод в литературе описан под названием иммunoсорбентного - ELISA-теста и РЭМА - реакции энзиммеченых антител (или антигенов), адсорбированных на поверхности водонерастворимых полимерных материалов. При гомогенном иммуноферментном методе не используется твердая фаза. Гомогенный иммуноферментный метод в основном предназначен для определения низкомолекулярных антигенов (гормонов, лекарственных препаратов).

Для выполнения твердофазного иммуноферментного метода необходимы определенные компоненты:

1. Специфические иммуноглобулины (выделяют из гипериммунной сыворотки осажденным сульфатом аммония с последующей очисткой).

2. Антивидовые глобулины (выделяют из антивидовых сывороток осажденным сульфатом аммония с последующей очисткой).

3. Белок А (выделяют из золотистого стафилококка) или бычий сывороточный альбумин.

4. Антиген (готовят из органов зараженных животных). Заведомо положительные и отрицательные антигены.

5. Фермент пероксидаза (выделяют из хрена).

6. Конъюгаты (пероксидаза, связанная с антителами или антигеном методом периодатного окисления).

7. Субстратная смесь (5-аминосалициловая кислота и пероксид водорода или ортофенилендиамин и пероксид водорода).

8. Дeterгент (поверхностно-активные вещества: твин-20, -80, тритон х-100, сорбиталь с-20).

9. Иммунологический планшет (планшет из прозрачного полистирола).

10. Шприц-дозатор (для разлива ингредиентов реакции). На биофабриках и в лабораториях научно-исследовательских институтов готовят диагностические наборы.

Существуют прямой и непрямой методы постановки этой реакции. На практике в основном используют непрямой метод.

Иммуноферментный метод определения антигена. Перед постановкой реакции лиофилизированные компоненты растворяют в объеме, указанном на этикетке, 0,01 М раствором фосфатного буфера или дистиллированной водой и доводят до объема рабочих разведений. Объем компонентов, вносимых поэтапно в лунки планшета составляет 0,1 мл.

Этапы постановки реакции:

1. Сенсибилизация планшета. В лунки планшета вносят специфические антитела (иммуноглобулины) в рабочем разведении, указанном на этикетке. Планшет с антителами инкубируют в термостате при 37 °C в течение 3 ч или при 4 °C в течение 18 ч. По

окончании инкубации проводят отмыкку планшета раствором фосфатного буфера, содержащим твин, 3-4 раза предварительно встряхнув содержимое лунок. Остатки раствора удаляют постукиванием о фильтровальную бумагу.

2. Внесение антигенов. В лунки планшета, сенсибилизированные специфическими антителами, вносят контрольные положительные и отрицательные антигены и исследуемую пробу в разведении от 1:10 до 1:1280, инкубируют в термостате при 37 °C в течение 1 ч. По истечении срока инкубации проводят трехкратную отмыкку лунок планшета от несвязавшихся с антителом антигенов и подсушивают на фильтровальной бумаге.

3. Внесение пероксидазного антивидового конъюгата в рабочем разведении с целью выявления комплекса «антиген + антитело». Залитые планшеты помещают в термостат при 37 °C на 1 ч. Затем лунки планшета трехкратно отмывают физиологическим раствором и подсушивают.

4. Внесение субстратной смеси. Для проявления реакции в лунки планшета вносят раствор субстрата (индикатора пероксидазы) - ортофенилдиамина, к раствору которого добавляют 3%-й раствор пероксида водорода для выявления комплекса «антиген + антитело + конъюгат». Планшеты закрывают и оставляют в темном месте при комнатной температуре на 15-30 мин.

5. Учет реакции проводят визуально или спектрофотометрически. При визуальной оценке реакции учет проводят по 4-плюсовой системе:

++++ - интенсивное оранжевое окрашивание; +++ - оранжевое окрашивание; ++ - бледно-оранжевое окрашивание; + - желтое окрашивание.

Пробу считают положительной при оценке в два креста (++) и более. За титр антигена принимают то ее наивысшее разведение, при котором в реакции со специфическим антителом наблюдается бледно-оранжевое окрашивание (++) , значительно превосходящее по интенсивности окрашивание контрольных лунок планшета.

При спектрофотометрическом учете результатов реакции проводят расчет коэффициента специфичности, который равен отношению оптической плотности (ОП) продукта реакции в лунках с контрольным положительным антигеном (ОП1) к оптической плотности субстратной смеси в лунках с контрольным отрицательным антигеном (ОП2). Реакцию считают положительной, если коэффициент специфичности не ниже 2,1, и отрицательной, если ниже 2,1.

Постановка иммуноферментного метода для обнаружения (или титрования) антител такая же, как при обнаружении и идентификации вируса антигена, но с той разницей, что материалом служит исследуемая сыворотка крови.

2.17 Лабораторная работа №17 (2 часа).

Тема: «Полимеразная цепная реакция, её использование в виурсологии.»

2.17.1 Цель работы: изучить суть использования метода ПЦР, ознакомиться с оборудованием ПЦР лаборатории.

2.17.2 Задачи работы:

1. Изучить сущность полимеразной цепной реакции
2. Изучить компоненты ПЦР
3. Ознакомиться с оборудованием ПЦР лаборатории
4. Провести учет результатов ПЦР

2.17.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Оборудование ПЦР лаборатории.
2. Набор для ПЦР

2.17.4 Описание (ход) работы:

Принцип ПЦР был описан в 1986 г. К. Mullis, получившим за это Нобелевскую премию в 1993 г. В основе этого метода лежит многократное копирование с помощью фермента ДНК-полимеразы определенного фрагмента ДНК, который является маркерным для данного вида. Механизм копирования таков, что комплементарное достраивание нитей может начаться не в любой точке последовательности ДНК, а только в определенных стартовых блоках - коротких двунитевых участках. Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют затравки, представляющие собой специально синтезированные *in vitro* олигонуклеотиды длиной около 20 нуклеотидов, называемые праймерами. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что синтез ДНК, осуществляемый ДНК-полимеразой, протекает только между ними. В результате происходит экспоненциальное увеличение количества копий специфического фрагмента по формуле 2^n , где n - число циклов амплификации. Поскольку праймеры входят в состав амплифицируемого фрагмента, его размер определяется числом олигонуклеотидных пар между 5'-концами праймеров. Обычно размер фрагмента составляет несколько сотен нуклеотидных пар.

Построение новых ДНК нитей из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов осуществляется фермент термостабильная ДНК-полимераза, называемая Таq-полимеразой. Процесс амплификации заключается в повторении циклов амплификации, состоящих из денатурации ДНК (1 мин), отжига праймеров (1—2 мин) и построения фрагмента (1—2 мин). В результате 30—35 циклов амплификации синтезируется 10^8 копий фрагмента, что делает возможным визуальный учет результатов после электрофореза в агарозном или акриламидном геле. Использование термостабильной ДНК-полимеразы позволило автоматизировать процесс амплификации с помощью специального прибора, называемого термоциклером. Этот прибор автоматически осуществляет смену температур согласно заданной программе и числу циклов амплификации.

Каждый цикл ПЦР состоит из 3 этапов:

1) денатурация ДНК (плавление) - молекулу ДНК нагревают до температуры 92-95 °С в течение 20-60 секунд в результате чего цепи ДНК расходятся;

2) отжиг или присоединение праймера с ДНК-матрицей для осуществления этого процесса температуру снижают до 50-65 °С на 40-60 секунд;

3) элонгация - синтез ДНК с помощью ДНК-полимеразы (достройка праймера). Достраивание происходит при температуре 68-72 °С в течение 20-60 секунд.

По окончании 3 этапа образуется две 2-х цепочечные ДНК.

Продолжительность реакции определяется числом циклов, необходимых для синтеза ДНК амплификонов в количестве, достаточном для дальнейшего исследования или индикации. Индикация может быть проведена следующими способами: методом электрофореза с окрашиванием бромистым этидием, использованием генных зондов, колориметрическим, флюорометрическим, радиоизотопным определением при использовании в системе ПЦР меченых предшественников синтеза нукleinовых кислот.

Компоненты ПЦР:

1) фермент Таq - ДНК-полимераза - синтезирует цепь ДНК до 1000 пар оснований в 1 минуту;

2) пара олигонуклеотидных праймеров - они имеют длину 20-30 нуклеотидов. Праймеры должны быть комплементарны выбранному месту в матрице. Особенно жесткие требования предъявляются к комплементарной концевой части праймера. Чем больше нуклеотидов в праймере, тем специфичнее ПЦР;

3) четыре типа дезоксирибонуклеотидтиофасфатов: дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ - содержание их должно быть в равном соотношении;

4) копируемая ДНК;

5) ионы Mg^+ необходимы для функционирования фермента Таq - ДНК-полимераза;

6) буфер - обеспечивает оптимальные условия для работы фермента;

7) минеральное масло насыпают на поверхность реакционной смеси для предотвращения испарения в процессе ПУР.

Технология идентификации ДНК-содержащих вирусов заключается в следующем: а) из исследуемого материала выделяется ДНК-матрица; б) в пробирке смешиваются компоненты реакции. На первом этапе пробирки с инкубационной смесью нагревают до температуры денатурации ДНК (90-100 °C), при этом две цепи ДНК расходятся. Затем проба инкутируется при температуре гибридизации праймеров с ДНК-матрицей (55-65 °C) и на последнем этапе ДНК-полимераза осуществляет комплементарное достраивание нитей ДНК-матрицы с помощью дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (72°C). В результате проведенного цикла происходит удвоение искомого генетического материала. В следующем цикле синтез осуществляется с 4 копий, далее с 8 и т.д. до 20-30 циклов. В результате образуется миллион копий специфического участка ДНК вируса. В ПЦР любая вновь синтезированная молекула ДНК служит матрицей для синтеза молекул ДНК соответствующих по длине и последовательности участку ДНК, выбранному для амплификации. Праймеры ориентированы таким образом, что синтез с помощью полимеразы протекает только между ними, удваивая количество копий заданного участка ДНК. Оптимальная длина амплифицируемого участка 200-500 пар нуклеотидов, но может достигать и 3000-4000 (до 10 000) нуклеотидов. Но длинные неограниченные копии ДНК могут синтезироваться лишь с исходных «родительских» цепей ДНК, и за 20 циклов ПЦР может образоваться лишь 20 таких копий, это очень мало по сравнению с исходным материалом. В качестве исходной ДНК может быть использована ДНК (или кДНК, полученная с помощью предварительной обратной транскрипции РНК), выделенная как из свежих тканей так и из замороженных, высущенных или фиксированных препаратов. Подготовка пробы материала (выделение ДНК и РНК) должна проводится в условиях исключающих перекрестное загрязнение исследуемых проб выделяемыми нуклеиновыми кислотами. ПЦР дает возможность не только амплифицировать нужную ДНК, но и вносить в нее необходимые изменения. Эта возможность обусловлена тем что с одной стороны праймеры физически входят в состав ДНК-продукта, а с другой стороны вблизи 5'- конца может отличаться от последовательности ДНК-мишени. Праймер, имеющий на 5'- конца некомплементарный довесок длиной до 45 нуклеотидов, эффективно работает в ПЦР. Это обстоятельство открыло необычные возможности для молекулярной биологии и генной инженерии.

Рассмотрим основные характеристики ПЦР-анализа: надежность, чувствительность, специфичность

2.18 Лабораторная работа №18 (2 часа).

Тема: «Метод ДНК-зондов – сущность, постановка»

2.18.1 Цель работы: ознакомиться с методикой получения ДНК-зонда

2.18.2 Задачи работы:

1. Техника получения ДНК-зона
2. Применение ДНК-зона
3. Преимущества и недостатки метода ДНК-зондов

2.18.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Оборудование ПЦР лаборатории.
2. Набор для ПЦР

2.18.4 Описание (ход) работы:

Методы ДНК (или РНК)-зондов основаны на реакции гибридизации нуклеиновых кислот — способности односторонних комплементарных цепей ДНК или РНК формировать двуспиральные структуры. Реакция может протекать между комплементарными молекулами вида: ДНК + ДНК, ДНК + РНК, РНК + РНК.

Геном вирусов, представленный в виде специфической последовательности нуклеотидов в молекулах нукleinовых кислот, наиболее информативен и является надежным критерием для идентификации.

У большинства ДНК-содержащих вирусов (адено-, герпес-, покс-, папилломавирусы и др.) нукleinовая кислота находится в виде двух цепей, которые связаны (водородная связь) комплементарно через азотистые основания (аденин—тимин, гуанин—цитозин).

Так, у адено-вирусов таких нуклеотидных пар 35—36,5 тыс., у герпес-вирусов — 125—240 тыс., у покс-вирусов — 130—375 тыс. и т. д.

Если водный раствор ДНК нагреть до 100 °C или сильно защелочить ($\text{pH} > 13$), то комплементарные пары оснований теряют связь, и ДНК быстро диссоциирует на две отдельные цепи. Этот процесс называется денатурацией или плавлением.

Если комплементарные цепи ДНК выдерживать в течение определенного времени при температуре 65 °C, они легко спариваются, восстанавливая структуру двойной спирали. Этот процесс получил название ренатурация или гибридизация.

Все типы реакций гибридизации зависят от солевого состава среды, температуры инкубации, длины реагирующих цепей, их нуклеотидного состава.

Любой вирус включает одну специфическую для него молекулу ДНК (или РНК) со строго определенной последовательностью нуклеотидов. Чтобы в исследуемом материале обнаружить вирусную нукleinовую кислоту, можно воспользоваться ее способностью после разделения цепей (если она двусpirальная) образовывать снова двойную цепь с комплементарной ей молекулой нукleinовой кислоты, предварительно как-либо помеченной. Такая меченая односпиральная молекула нукleinовой кислоты, комплементарная молекуле нукleinовой кислоты определенного вируса, называется ДНК-зондом. Для каждого вида вируса зонд готовят заранее и вводят в него метку в виде атома радиоактивного фосфора (^{32}P) или в виде биотина, или другим веществом.

Методы ДНК-зондов сводятся к следующему: получение односпирального фрагмента ДНК определенного вида и его метки — это ДНК-зонд;

выделение из исследуемого материала нукleinовых кислот и их денатурация;

контакт образовавшихся односпиральных молекул ДНК (или РНК) с ДНК-зондом при 55—65 °C, приводящих к образованию двусpirальных молекул (гибридизация) в случаях их взаимной комплементарности;

удаление всех негибридизированных односпиральных молекул нукleinовых кислот (отмывают или добавляют нуклеазы);

обнаружение (по метке) образовавшихся двусpirальных молекул нукleinовых кислот, которые и будут указывать на наличие в исследуемом материале того вида вируса, на который был получен ДНК-зонд.

Если использовали радиоактивный зонд, то результаты учитывают методом авторадиографии или путем подсчета импульсов в счетчике.

Существует большое количество модификаций метода гибридизации с меченными нукleinовыми кислотами. Их можно разделить на две основные группы: способы гибридизации в растворе и способы гибридизации на твердых носителях.

Наиболее популярен метод гибридизации с использованием носителей — нитроцеллюлозных или нейлоновых фильтров и твердых полимеров. Он заключается в том, что одну нукleinовую кислоту (чаще исследуемую), предварительно денатурированную, иммобилизуют на носителе (фильтре), проводят гибридизацию с ДНК-зондом и непрореагировавшие молекулы зонда отмывают, а иммобилизованные меченные гибриды остаются на фильтре. Сигнал, подаваемый связанным зондом, обнаруживают посредством авторадиографии, если зонд был радиоактивным, или путем образования цветных пятен, если использовали меченный ферментом зонд.

Методы ДНК (РНК)-зондов из диагностической практики постепенно вытесняются новым методом — полимеразной цепной реакцией.

Одноцепочечную ДНК (оцДНК) можно получить из последовательностей, клонированных в нитчатых фагах типа M13 или в фагмидах, активированных фаговой суперинфекцией, но при этом иногда возникают сложности с клонированием только одной из двух комплементарных цепей. Специфическое мечение одной цепи ДНК осуществляют с помощью рассеянной затравки или уникальных праймеров; при этом меченный зонд синтезируется в тех же количествах, что и немеченая ДНК-матрица, и перед гибридизацией нужно провести денатурацию зонда. Одноцепочечные ДНК-зонды применяются в опытах по гибридизации *in situ* весьма ограниченно. В последние годы РНК-зонды (рибо-зонды) стали широко использоваться для выявления мРНК как при изотопной, так и при неизотопной ГИС. Это связано с более высокой стабильностью гибридов РНК—РНК по сравнению с гибридами РНК—ДНК и доступностью плазмидных векторов и векторов других типов, содержащих промоторы для РНК-полимераз. Мечение РНК-зондов проводят с помощью транскрипции *in vitro*. Вкратце процесс сводится к следующему. В вектор по обе стороны от последовательности, которую нужно пометить, встраивают промоторы для РНК-полимераз бактериофагов и проводят инкубацию в присутствии меченых рибонуклеотидов. В результате синтезируются меченные РНК-фрагменты разной длины, но не больше заданной величины, такие, что в них отсутствуют последовательности, комплементарные вектору. Используя векторы, содержащие по разные стороны от сайта клонирования промоторы для разных РНК-полимераз, можно получить отдельно смысловые и антисмысловые зонды. Антисмысловой зонд комплементарен мРНК и гибридизуется с ней, а последовательность смыслового зонда идентична последовательности мРНК, и гибридизации не происходит. Отсутствие гибридизации со смысловым зондом можно считать отрицательным контролем. Возможность пометить рибо-зонды до высокой удельной активности и обработка препаратов РНКазой после гибридизации для расщепления негибридизованного одноцепочечного РНК-зона позволяет существенно снизить фон.

Олигонуклеотиды широко используются для выявления мРНК, особенно в тех случаях, когда последняя присутствует в больших количествах (например, мРНК легкой цепи иммуноглобулинов в плазматических клетках). Это самые короткие из используемых зондов и обычно их метят путем химического или ферментативного достривания с одного или обоих концов меченными нуклеотидами. Олигонуклеотидные зонды не дают столь высокой чувствительности, как зонды, помеченные с помощью ник-трансляции или рассеянной затравки, и для повышения чувствительности используют при гибридизации смесь примерно 20 разных олигонуклеотидов. Теоретически любые олигонуклеотиды в геноме человека длиной более 16 звеньев являются уникальными и, следовательно, обеспечивают более специфичную гибридизацию. Кроме того, олигонуклеотидные зонды для любой секвенированной нуклеотидной последовательности или для последовательностей, предсказанных исходя из соответствующих последовательностей аминокислот, можно быстро синтезировать с помощью автоматического синтезатора. Такие олигонуклеотиды применяют как по отдельности, так и в разных сочетаниях, но в последнем случае необходимо исследовать специфичность каждого олигонуклеотида, поскольку стабильность образующихся гибридов варьирует. Для мечения олигонуклеотидных зондов не подходит ни один из описанных выше методов, так как олигонуклеотиды нельзя клонировать или получить в двухцепочечной форме. В этом случае молекулы-свидетели включают в олиго-нуклеотид с помощью одного из четырех методов: концевого ферментативного включения, химического мечения, фотомечения, включения меченых нуклеотидов в ходе синтеза. Зонды, получаемые при помощи ПЦР. Последнее время для получения меченых зондов стали применять ПЦР. Достоинство этого метода состоит в том, что метку можно ввести в зонд непосредственно в ходе ПЦР, без предварительного его клонирования. Кроме того, используя недавно разработанную модификацию ПЦР, так называемую обратную ПЦР, можно получить зонды и для фланкирующих исследуемую область неизвестных последовательностей. Для синтеза и

мечения одноцепочечных ДНК можно использовать асимметричную ПЦР, проводимую при молярном отношении праймеров от 20:1 до 50:1. При этом образуется небольшое количество двухцепочечной меченой ДНК, и для синтеза только одноцепочечной ДНК необходим один праймер и большие количества матрицы. Выход синтезированного зонда при такой реакции намного меньше, чем при обычной ПЦР. Размер меченого зонда при эффективном неизотопном мечении составляет не более 1 т.п.н., и благодаря однородности образующихся меченых фрагментов они не гибридизуются между собой, как это происходит с ник-транслированными зондами.

Достоинства метода: высокая чувствительность и специфичность; быстрота анализа; универсальность; отсутствие необходимости в стерильной работе, математической обработке результатов. Недостатки: относительная технологическая сложность и трудность получения зонда; если метка радиоактивная, то нельзя зонд нарабатывать впрок, так как период полураспада ^{32}P — 14 сут, а ^{131}I — 8 сут; если метка нерадиоактивная, то чувствительность метода снижается в 10 раз и более.

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ
ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ (не предусмотрено РУП)

4. МЕТОДИЧЕСКИЕ МАТЕРИАЛЫ
ПО ПРОВЕДЕНИЮ СЕМИНАРСКИХ ЗАНЯТИЙ (не предусмотрено РУП)