

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б1.В.14 Вирусология

Направление подготовки: 36.03.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза»

Профиль образовательной программы: Ветеринарно-санитарная экспертиза

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. Принципы систематики вирусов. Характеристика ДНК-содержащих вирусов.....	7
1.4	Лекция № 4. Характеристика РНК – содержащих вирусов.....	12
1.5	Лекция № 5. Бактериофаги.....	14
1.6	Лекция № 6. Репродукция вирусов.....	17
1.7	Лекция № 7. Патогенез вирусных инфекций.....	24
1.8	Лекция № 8. Особенности противовирусного иммунитета.....	28
1.9	Лекция № 9. Профилактика и химиотерапия вирусных болезней.....	30
1.10	Лекция № 10. Вирусы бешенства.....	32
1.11	Лекция № 11. Вирусы болезни Ауески.....	34
1.12	Лекция № 12. Вирусы гриппа.....	36
1.13	Лекция № 13. Вирусы ящура.....	38
1.14	Лекция № 14. Вирусы лейкоза крупного рогатого скота.....	40
2.	Методические указания по выполнению лабораторных работ.....	47
2.1	Лабораторная работа № ЛР-1 Правила работы с вирусами. Устройство вирусологической лаборатории.....	47
2.2	Лабораторная работа № ЛР-2 Правила отбора патологического материала от больных животных и трупов. Подготовка патологического материала к исследованию.....	48
2.3	Лабораторная работа № ЛР-3 Методы диагностики вирусных болезней.....	51
2.4	Лабораторная работа № ЛР-4 Индикация вирусов в патологическом материале путем обнаружения телец-включений.....	53
2.5	Лабораторная работа № ЛР-5 Действие на вирусы физических и химических факторов.....	55
2.6	Лабораторная работа № ЛР-6 Лабораторные животные их использование в вирусологии.....	58
2.7	Лабораторная работа № ЛР-7 Использование куриных эмбрионов в вирусологии.....	60
2.8	Лабораторная работа № ЛР-8 Использование культур клеток в вирусологии.....	64
2.9	Лабораторная работа № ЛР-9 Индикация вируса в культуре клеток.....	68
2.10	Лабораторная работа № ЛР-10 РГА и РТГА их использование в вирусологии.....	69
2.11	Лабораторная работа № ЛР-11 РДП в геле, применение в вирусологии.....	72
2.12	Лабораторная работа № ЛР-12 РИФ, её применение в вирусологии.....	74
2.13	Лабораторная работа № ЛР-13 Молекулярно-генетические методы в вирусологии.....	77
2.14	Лабораторная работа № ЛР-14 Лабораторная диагностика бешенства.....	79

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. Честь 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 1971г. – вирусы микоплазм; Даймонд в 1972г. – 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, отграничивающим 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 внеклеточную форму существования - вирион.

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

1.2.1 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 из 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 геном 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 обнаруживаются 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 одонитчатыми, 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 поксвирусов. 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 вируса. РНК может обладать инфекционной активностью в зависимости от своей структуры. Структура вирусных РНК чрезвычайно разнообразна. У вирусов обнаружены одонитчатые 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.

Одонитчатые РНК. Молекулы одонитчатых 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 одонитчатые 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: «Принципы систематики вирусов. Характеристика ДНК-содержащих вирусов»

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Принципы систематики вирусов.
2. Характеристика Poxviridae и Asfaviridae
3. Характеристика Herpesviridae и Hepadnoviridae
4. Характеристика Parvoviridae и Adenoviridae

1.3.2 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 отсутствию наружной мембраны, 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); \pm
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 и Asfaviridae

Многие поксвирусы 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 мембраны аппарата Гольджи.

Вирион плеоморфной 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 мембраны аппарата Гольджи.

Организация генома и репликация

Репликация вируса происходит в цитоплазме. Синтез ранних м.РНК происходит с обеих цепей ДНК с помощью ферментов сердцевины (core), включая вирусспецифическую ДНК-зависимую РНК-полимеразу. Затем образованные РНК-транскрипты (иРНК) выходят из core 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, гликозилирование, сульфирование, ацетилирование и т.д.). Это необходимо для морфогенеза вирионов.

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

Семейство Asfaviridae. Включат 1 род Asfavirus - вирус африканской чумы свиней (АЧС).

Характеристика семейства Asfaviridae – вирион сложноорганизованный, d=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 мембраны эндоплазматического ретикулаума.

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

3. Характеристика Herpesviridae и Hepadnoviridae

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

«Marek's disease – lake viruses» - Болезнь Марекса

«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 сердцевин (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.

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.Блумбергом в 1964 году в сыворотке крови австралийского аборигена, 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 паразитическое 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 слюну, от инфицированной матери плоду, скрытая интранатальная 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
 - а) HBsAg – поверхностный, растворимый или австралийский АГ
 - б) HBcAg – антиген сердцевин (core)
 - в) HBeAg – находится в сердцевине вириона, но в отличие 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, ампликации, 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

4. Характеристика Parvoviridae и Adenoviridae

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 гемагглютинирующей активностью. Семейство Parvoviridae включает 2 подсемейства: Parvovirinae - вирусы позвоночных. Включает 2 рода: Parvovirus –парвовирус собак, парвовирус свиней, парвовирус цыплят, вирус алеутской болезни норки; Dependovirus - Аденоассоциированные вирусы бычий (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 из 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 сар - белку связанному с 5' концом иРНК.

Характеристика Adenoviridae, включает 2 рода: Mastadenovirus –вирусы млекопитающих; Aviadenovirus – вирусы птиц, у человека аденовирусы 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 аденовируса 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 гемагглютинирующей активностью

Цикл репродукции аденовирусов разделяют на раннюю и поздние фазы.

Вначале идет синтез вирусных РНК на матрице ДНК, до начала репликации ДНК. Ранние транскрипты считываются 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.

1. 4 Лекция №4 (2 часа).

Тема: «Характеристика РНК – содержащих вирусов »

1.4.1 Вопросы лекции:

1. Характеристика семейства Reoviridae
2. Характеристика семейства Rhabdoviridae
3. Характеристика семейства Paramyxoviridae
4. Характеристика семейства Orthomyxoviridae
5. Характеристика семейства Picornaviridae

1.6.2 Краткое содержание вопросов:

1. Характеристика семейства Reoviridae

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

Распространены повсеместно. Ортореовирусы человека, как правило авируленты, но могут вызывать заболевания верхних дыхательных путей и энтериты у детей. У мышей ортореовирусная инфекция сопровождается диареей, замедлением развития, гепатитами, желтухами, миокардитами, 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 Rotovirus – вирус позвоночных.

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

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 Rhabdoviridae

Семейство Rhabdoviridae включает 6 рода: 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 гематопозитического некроза рыб. Для вирусов этого рода температура необходимая для репродукции, обычно

15-28 °С, 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 виды 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 москиты, мухи, клещи, комары, 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 вирусной транскриптазы. Образуются полиаденилированные мРНК. Трансляция 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»

3. 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 паратифа

Morbilivirus- 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»

4. Характеристика семейства Orthomyxoviridae

Семейство 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 (НА – 15 разновидностей) и нейраминидазой (НА – 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.

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 выделялись от клещей и moskitov.

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 мембраны

1. 5 Лекция № 5 (2 часа).

Тема: «Бактериофаги»

1.5.1 Вопросы лекции:

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

1.5.2 Краткое содержание вопросов:

1. История открытия бактериофагов

Бактериофаги – вирусы бактерий или просто фаги, были открыты в 1916 г. 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, гнойных 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 Гамалеем. 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, построена 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 ион Ca^{++} . Актиноподобный белок хвостового отростка способен сокращаться, что обеспечивает проникновение стержня через клеточную и цитоплазматическую мембрану. 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 полый - 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 Ca^{2+} . 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 редутивной 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 Ca^{2+} , 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 нуклеиновой 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 тимидилат 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 М13, не вызывающий при выходе из клетки ее гибели.

1. 6 Лекция №6 (4 часа).

Тема: «Репродукция вирусов»

1.6.1 Вопросы лекции:

1. Типы инфекций на уровне клетки. Условия продуктивной инфекции.
2. 1 этап репродукции вирусов – начало инфекции:
 - а) адсорбция вируса на клетке
 - б) проникновение вируса в клетку
 - в) раздевание или депротенинизация вируса
3. Второй этап репродукции - экспрессия вирусного генома: транскрипция, трансляция, репликация генома, сборка вирусных частиц, выход вируса из клетки.
4. Особенности репродукции ДНК-содержащих вирусов репродуцирующих в ядре и в цитоплазме
5. Особенности репродукции РНК-содержащих вирусов с позитивным и негативным геномом, ретровирусов.

1.6.2 Краткое содержание вопросов:

1. Типы инфекций на уровне клетки. Условия продуктивной инфекции.

На протяжении многих десятилетий единственно правильной считалась точка зрения, что встреча инфекционного агента с организмом неминуемо должна заканчиваться развитием

конфликтной ситуации, то есть болезнью. Мнения о результатах этого конфликта также не отличались большим разнообразием - полагали, что болезнь всегда завершается либо выздоровлением, либо смертью.

Взаимодействие вируса с хозяином необходимо рассматривать в 2-х аспектах на уровне взаимодействия вируса с клеткой и на уровне взаимодействия вируса с организмом. Цель взаимодействия вируса с клеткой создание вирусного потомства. Проникновении вируса в клетку может привести к продуктивной инфекции – при которой происходит репродукция вируса, которая заканчивается формированием вирусного потомства и часто гибелью клетки. Взаимодействия вируса с клеткой может привести к абортивной – при которой процесс репродукции прерывается на какой-либо стадии (в связи с непермиссивностью клетки или дефективностью вируса или с присутствием в клетке каких-либо веществ блокирующих стадию репродукции). При проникновении вируса в клетку может произойти объединение вирусного и клеточного геномов такой тип взаимодействия – называется интегративной инфекцией.

В настоящее время различают следующие виды вирусной инфекции:

1. Абортивная инфекция характерна для вирусов которые не могут осуществлять полный цикл репродукции в данном организме, но это не означает что эта инфекция не имеет последствий для хозяина. Например, инфекция грызунов вирусом SV40 - является непермиссивной, но приводит к развитию процесса трансформации клеток. (Непермиссивная клетка не способна поддерживать репродукцию вируса после попадания его в клетку.)
2. Острая инфекция с последующим освобождением от вируса посредством иммунного ответа хозяина.
3. Острая инфекция с последующей латентной инфекцией, при которой вирус находится в неинфекционной форме периодами реактивации и выхода из организма. Вирусы, вызывающие такого рода инфекцию способны к продуктивной инфекции при определенных условиях в одних клетках и вызывают непермиссивную инфекцию в других клетках.
4. Острая инфекция с последующей персистентной инфекцией, при которой инфекционный вирус постоянно выделяется, либо присутствует в зараженной ткани. Персистентная инфекция возникает тогда, когда иммунный ответ хозяина не может элиминировать вирус в течение острого периода инфекции.
5. Медленные прогрессирующие инфекции. Эти инфекции характерны для нециркулирующих агентов (прионы), которые вызывают поражения мозга.

Прежде чем приступить к рассмотрению деталей процесса размножения вирусов необходимо дать ряд ключевых положений и определений.

Для того чтобы вирус мог репродуцироваться он должен заразить клетку. Спектр клеток и хозяев биологическими особенностями вирусов.

Чтобы вирус создал в клетке потомство нужно, чтобы клетка была восприимчивой к вирусу. Клетка восприимчива, если она чувствительна и пермиссивна. Чувствительная клетка имеет на своей поверхности структуры, так называемые рецепторы, с которыми взаимодействуют вирусные белки благодаря чему вирус может проникнуть в клетку. Но для того, чтобы проникший в клетку вирус мог репродуцироваться, клетка должна быть пермиссивной (от лат. *permissum*- разрешение, соглашение). Клетка пермиссивна - если она обеспечивает полный цикл репродукции вируса завершающийся формированием вирионов. (Клетка может быть чувствительной и непермиссивной и наоборот).

Процесс репродукции можно условно разбить на несколько стадий, пренебрегая тем, что один процесс постепенно переходит в другой, и через несколько часов процессы происходят одновременно.

2. 1 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 аденовирусов – 12 фибров. 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 мембраны, 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 впячивается внутрь клетки. В результате инвагинации образуется замкнутая вакуоль, содержащая вирусную частицу (в течение 1 минуты возникает до 2000 вакуолей).

Покрываемые вакуоли сливаются с другими более крупными вакуолями, образуя рецептосомы. Рецептосомы – содержат рецепторы, но не содержат клатрин. Рецептосомы сливаются с лизосомами.

Эндоцитоз обеспечивает транспорт вирусной частицы в соответствующие внутриклеточные участки (таким путем ядерные вирусы попадают в ядро, а реовирусы 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 мембраны. 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 гликопротеидов, находящихся на поверхности вирусной частицы.

Функцию белка слияния у вируса гриппа выполняет малая гемагглютинирующая субъединица, 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 сердцевина, 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 аденовирусов, вируса полиомы и SV40 является ДНК, ковалентно связанная с одним из внутренних вирусных белков.

В ряде случаев способность вирусов вызвать 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, околоядерном 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 аденовирусов 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.

3. Второй этап репродукции - экспрессия вирусного генома: транскрипция, трансляция, репликация генома, сборка вирусных частиц, выход вируса из клетки.

Вторая фаза репродукции: экспрессия вирусного генома (expression – лат. - выражение). Эта фаза состоит из следующих событий:

- 1) транскрипция,
- 2) трансляция,
- 3) репликация,
- 4) сборка вирусных частиц,
- 5) выход вируса из клетки.

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

ДНК → иРНК → 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 иРНК с последующим переносом её к рибосомам;

трансляция – процесс перевода информации в специфическую аминокислотную последовательность белка.

Репликация. Репликация ДНК в клетке происходит в результате деления 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, эндонуклеазы. 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, иницирующих факторов. Каждая аминокислота кодируется триплетом (три нуклеотида 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. Особенности репродукции ДНК-содержащих вирусов репродуцирующих в ядре и в цитоплазме

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

4. Особенности репродукции ДНК-содержащих вирусов репродуцирующих в ядре и в цитоплазме

У ДНК-содержащих вирусов, репродуцирующих 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.

5. Особенности репродукции РНК-содержащих вирусов с позитивным и негативным геномом, ретровирусов.

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 узнать иРНК. Узнает она благодаря сар - 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. Образовавшаяся + 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.

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 однострунчатую 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 иницирующих 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 интронов 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 неcodируемые 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 гепересвирусов – 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, аденовирусы, 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.

1.7 Лекция №7 (2 часа).

Тема: «Патогенез вирусных инфекций»

1.7.1 Вопросы лекции:

1. Стадии вирусного патогенеза на уровне клетки и организма
2. Повреждение вирусом клеток
3. Персистенция вируса, латентность и медленные вирусные инфекции

1.7.2 Краткое содержание вопросов

1. Стадии вирусного патогенеза на уровне клетки и организма.

Патогенез вирусных инфекций включает комплекс процессов, происходящих при взаимодействии инфекционного агента (вируса) с организмом хозяина. Необходимо учитывать, что в данном случае инфекционный агент является внутриклеточным генетическим паразитом. В основе взаимодействия лежит инфекционный процесс на уровне клетки.

Ф.Феннер и С.Мимс предложили схему стадий вирусного патогенеза на уровне клетки и уровне организма. Схема упрощена и идеализирована в том, смысле, что не все вирусы используют все эти стадии каждый раз, когда заражают своего хозяина.

Специфические стадии вирусного патогенеза.

Проникновение вируса в организм.

Способы проникновения вируса в организм.

1. Воздушно-капельный способ.
2. Проникновение вирусов в организм возможно как через поврежденную так и неповрежденную кожу.
4. Трансмиссивный путь передачи вирусов.
5. Половой путь
6. Парентеральный путь.
7. Вертикальный путь передачи вируса.

Первичная репликация.

Многие вирусы, вызывающие системные генерализованные инфекции прежде чем распространиться по системам реплицируются в месте первичного проникновения в организм хозяина.

Распространение вируса.

Вирусы могут распространяться несколькими путями в зависимости от места проникновения и поражаемых ими органов-мишеней:

1. Нейрогенный путь.
2. Лимфогенный путь.
3. Гематогенный путь.

Клеточный и тканевой тропизм.

Тропизм вируса к определенным клеткам и органам характерно для большинства вирусных инфекций. В основе тропизма лежит чувствительность к вирусу определенных клеток, а следовательно, тканей и органов.

2. Повреждение вирусом клеток

Значительное разнообразие типов взаимодействия между вирусами и клеткой обусловлено генетическими характеристиками вируса и клетки. Основным проявлением вирулентности вируса являются разрушение зараженных вирусом клеток в тканях-мишенях и возникающие в результате разрушения тканей физиологические изменения в организме хозяина.

В клетках зараженных цитолитическим вирусом происходят резкие биохимические сдвиги. При репродукции вируса в зараженной клетке образуются ранние белки, подавляющие синтез клеточных белков. На поздних стадиях инфекционного цикла в клетке накапливаются большое количество вирусных макромолекул, часть из которых представлена капсидными белками. Капсидные белки часто бывают токсичны для клетки, вызывая цитопатический эффект. Под действием вируса повышается проницаемость мембран лизосом и выход ферментов в цитоплазму. Происходит округление клеток, прогрессирует автолитический процесс, осуществляемый лизосомальными ферментами.

Наиболее характерными морфологическими изменения в клетках, зараженных вирусом это обнаруженные еще в прошлом веке – тельца-включения. Тельца включения

могут быть представлены скоплениями вирионов, вирусных белков, продуктами деструкции клеток. В связи с тем, что их можно видеть с помощью светового микроскопа, тельца включения полезны, как гистологические индикаторы вирусной инфекции.

Некоторые вирусы могут вызывать слияние клеток в культуре с образованием поликариоцитов или синцитиев.

При репродукции вируса в клетке возможно возникновение хромосомных aberrаций.

Поражение клеток может происходить не от прямого токсического действия вируса, а вследствие иммунной реакции на продукты вирусной инфекции.

В результате интеграции вирусного генома в клеточный возможна трансформация клеток.

Многочисленные изменения, происходящие в зараженной клетке, в конечном итоге могут привести к гибели клетки.

Иммунный ответ и другие защитные факторы хозяина.

При вирусной инфекции, кроме гуморального и клеточного специфического иммунного ответа, действует ряд других факторов защиты хозяина, контролирующих развитие, ограничение и подавление болезни.

3. Персистенция вируса, латентность и медленные вирусные инфекции

В обычных условиях большинство вирусных инфекций относится к самоограничивающимся. Однако при некоторых обстоятельствах вирусы могут персистировать или становиться латентными в организме хозяина. При этом клинические проявления или реактивация вируса могут развиваться значительно позже момента заражения.

Персистентными называются инфекции, при которых инфекционный вирус воспроизводится и продолжительно выделяется из организма хозяина в течение значительно большего периода, чем при обычной инфекции. Персистентные инфекции с периодическими обострениями, в промежутках между которыми вирус обнаружить не удается, называются *латентными инфекциями*. Персистентные инфекции, при которых вирус обнаруживается и часто выделяется, однако заболевание клинически не проявляется либо связано с иммунопатологическими нарушениями, называются *хроническими инфекциями*. Персистентные инфекции с длительным инкубационным периодом, который предшествует медленно прогрессирующему заболеванию, приводящему к смерти называется *медленные инфекции*.

Многие хронические инфекции, вызываемые вирусами, развиваются в результате иммуносупрессии. Например, вирус опоясывающего лишая остается латентным в сенсорных ганглиях, рецидивы встречаются нечасто.

Факторы патогенности персистентных инфекций.

Существуют механизмы при помощи которых вирусы, обуславливающие такие инфекции, ускользают от защитных механизмов хозяина, обеспечивающих элиминацию вируса при острых инфекциях.

Из классификации видов вирусной инфекции очевидно, что острая инфекция способна перейти в персистентную и латентную инфекцию.

При каких условиях возможно формирование персистентной и латентной инфекции?

1. Отсутствие разрушения клеток т.е. отсутствие развития цитопатического эффекта. При острой инфекции репродукция вируса приводит к разрушению клетки и это способствует более быстрому выведению вируса из организма.
2. Определенный механизм поддержания вируса в клетке.
3. Отсутствие или резкое снижение иммунного ответа со стороны хозяина на персистентный вирус.

Механизмы формирования персистентных инфекций.

1. Ограничение цитолитического эффекта.

А) Существуют вирусы, для которых продуктивная инфекция не характеризуется разрушением клеток и такие вирусы способны к персистенции.

Б) При определенных условиях некоторые цитотоксические вирусы могут персистировать.

В) Литические вирусы могут перейти в нелитические при появлении мутантных вирусов или мутантных клеток

Поддержания вирусного генома в постоянно инфицированных клетках. Если клетка делится то, она должна реплицировать не только свой геном, но и вирусный.

А) Интеграция вирусного генома в клеточный.

Б) Сохранение вирусного генома в виде плазмиды.

Отсутствие или резкое снижение иммунного ответа со стороны хозяина.

Прежде чем рассмотреть механизмы вызывающие снижение иммунного ответа остановимся на основных компонентах противовирусного иммунитета.

Эффективными антивирусными системами для вирусной инфекции являются антитела и Т-клетки. Антитела распознают свободный вирус и клетки, зараженные вирусом. Антитела могут образовываться как поверхностным белкам так и к внутренним структурным и неструктурным белкам.

Изменения в структуре или в экспрессии вирусных капсидных или поверхностных белков может быть важным механизмом, позволяющим избежать воздействия антител.

Механизмы ускользания от иммунного ответа.

Ограничение экспрессии вирусных генов. Ограничение экспрессии вирусных генов снижает литические воздействия вирусов и способствует тому, что зараженная клетка не распознается иммунными клетками. Эта стратегия обычна для всех вирусов может привести к персистенции.

Поражение отдельных органов и тканей.

Другая стратегия ускользания от действия иммунной системы – поражение тканей и клеток, недоступных для иммунной системы. Таким местом для персистенции является центральная нервная система. Установлено 2 фактора преимущества персистенции в ЦНС у вирусов: во-первых, присутствие гематоэнцефалического барьера, который ограничивает транспорт лимфоцитов; во-вторых, наличие специализированных клеток, таких как нейроны в которых экспрессия молекул МНС I и II класса крайне низкая и следовательно они не могут быть распознаны Т-клетками.

Антигенная вариация. Появление мутантов в популяции вирусов в процессе их персистирования является установленным фактом.

Ускользание вируса от распознавания его Т-клетками.

Изменения в вирусных белках в местах реагирования с молекулами МНС, а так же в областях молекулы белка, которые реагируют с соответствующими антиген-специфическими рецепторами (АСР) Т-клеток. (Так замена одной аминокислоты в вирусных белках может изменить распознавание CD8+ Т-клетками). Накопление вариантов, ускользающих от действия цитотоксических лимфоцитов, является существенным моментом в установлении персистенции.

Супрессия клеточно-поверхностных молекул, требуемых для Т-клеточного распознавания.

Вмешательство в презентацию антигена.

Вмешательство в функции цитокинов.

Иммунологическая толерантность.

Таковы на сегодняшний день основные механизмы избегания вирусами иммунного ответа со стороны хозяина. По-видимому, каждый вирус обладает не только одним механизмом защит. А использует их различные комбинации. Механизм перехода из латентной или персистентной инфекции в продуктивную неизвестен. Считают, что основными стимулами для этого являются иммуносупрессия, гормональные изменения, стресс, повреждение нерва, ультрафиолетовое облучение и т.д.

1.8 Лекция №8 (2 часа).

Тема: «Особенности противовирусного иммунитета»

1.8.1 Вопросы лекции:

1. Понятие “вирусный антиген”, “иммунитет”.
2. Факторы неспецифической защиты организма животных покровы и их выделения, температура тела, неспецифические ингибиторы, комплемент, интерферон.
3. Факторы специфического иммунитета: гуморальные и клеточные. Роль Т - и В - лимфоцитов в формировании противовирусного иммунитета.

1.8.2 Краткое содержание вопросов:

1. Понятие “вирусный антиген”, “иммунитет”.

Иммунитет – это целостная система биологических механизмов самозащиты организма, с помощью которых он распознает и уничтожает все чужеродное, если оно проникает в организм или возникает в нём.

Вирусные антигены могут быть вирионными и вирусиндуцированными. Вирионные входят в состав вирусной частицы, а вирусиндуцированные обнаруживаются лишь в зараженной клетке и могут быть представлены как суперкапсидными белками экспрессированными на поверхности зараженной клетки, так и неструктурными белками.

В понятие противовирусный иммунитет входят три категории защитных механизмов:

- естественная видовая резистентность;
- неспецифические факторы резистентности;
- специфические факторы иммунитета.

Естественная видовая резистентность – невосприимчивость, обусловленная врожденными биологическими особенностями, присущими данному виду животных. Признак, передающийся по наследству, например невосприимчивость крупного рогатого скота к вирусу африканской чумы свиней. В основе естественной видовой резистентности лежат различные механизмы естественной неспецифической резистентности (кожа, слизистые оболочки, функции выделительной системы, защитная роль температуры, влияние гормонов, фагоцитоз).

2. Факторы неспецифической защиты организма животных покровы и их выделения, температура тела, неспецифические ингибиторы, комплемент, интерферон.

Неспецифические факторы резистентности – обеспечиваются неспецифическими ингибиторами, способными нейтрализовать инфекционную и гемагглютинирующую активность вирусов; системой интерферонов – способной блокировать репродукцию вирусов; NK – натуральными киллерами – способные распознавать и уничтожать зараженную вирусом клетку без предварительной сенсibilизации.

Неспецифические ингибиторы. Клетки организма способны вырабатывать особые вирусотропные вещества - ингибиторы, способные взаимодействовать с вирусами подавляя их активность. Сывороточные ингибиторы разделяют на : термолabile (β-ингибиторы) и термостабильные (α- и γ- ингибиторы).

Различные вирусы (даже одного вида) различаются по чувствительности к ингибиторам. Между ингибиторами и антителами имеется разница во взаимодействии с вирусом. Комплекс ингибитор - вирус не фиксирует комплемент, вирус соединяется с антителами при одновременном присутствии ингибитора, комплекс ингибитор вирион менее прочен. Помимо сывороточных ингибиторов описаны ингибиторы в тканях, секретах и экскретах.

Интерфероны – общее название, под которым в настоящее время объединяют ряд белков со сходными свойствами, выделяемых клетками организма в ответ на вторжение вируса.

Противовирусный эффект интерферонов заключается в подавлении синтеза вирусной РНК, подавлении синтеза белков оболочки вируса. Иммуномодулирующий эффект интерферонов – способность регулировать взаимодействие клеток, участвующих в иммунном ответе. Эту функцию интерфероны выполняют, регулируя чувствительность клеток к цитокинам и экспрессию на мембранах клеток молекул главного комплекса гистосовместимости I типа.

Противоопухолевый эффект интерферонов связан с их способностью замедлять или подавлять рост культуры клеток и активировать противоопухолевые механизмы иммунной системы.

Непрямые противоопухолевые эффекты интерферона:
стимуляция активности клеток иммунной системы;
усиление экспрессии на клетках молекул гистосовместимости I класса.

3. Факторы специфического иммунитета: гуморальные и клеточные. Роль Т - и В - лимфоцитов в формировании противовирусного иммунитета.

Специфическая защита животных от вирусов осуществляется иммунной системой, которая обладает уникальной способностью распознавать множество разнообразных агентов (микроорганизмы, в том числе и вирусы, токсины и др.) – антигенов и вырабатывать в ответ на это распознавание специфические антитела и сенсibilизированные лимфоциты.

Иммунные механизмы обеспечивают: 1) гуморальные факторы; 2) клеточные факторы. Как известно, вирусы для макроорганизма представляют собой чрезвычайные раздражители, т. е. антигены. Антигенность их связана с белками, входящими в состав оболочек. У вирусов различают два типа антигенов: S – внутренний и Vi – внешний. Позже начинают развиваться специфические факторы, представляющие заключительный и наиболее мощный эшелон защиты организма, а именно гуморальный и клеточный факторы. Доказано, что гуморальные факторы при вирусных инфекциях составляют основу противовирусного иммунитета. При вирусных инфекциях образуются вируснейтрализующие, комплементсвязывающие и преципитирующие антитела. Специфические противовирусные антитела вырабатываются на рибосомах плазматических клеток - в лимфоцитах при тесном взаимодействии их с Т-лимфоцитами и макрофагами.

Противовирусные антитела связаны с глобулиновой фракцией сывороточных белков (Ig): A, M, G, E, D. Наибольшее значение имеют IgG, IgA и IgM, в то время как защитная функция IgD и IgE сравнительно невелика, а IgE связывают с возникновением аллергии.

Формы взаимодействия антител. В основе первичного взаимодействия антител с гомологичным вирусом лежит процесс специфической адсорбции: молекула антитела присоединяется к поверхности вирусной частицы, изменяет ее физико-химические свойства. В результате вирус становится неспособным соединяться с рецепторами чувствительной клетки и проникать в нее.

Таким образом, противовирусный иммунитет, как и иммунитет против других инфекционных агентов, - это комплекс защитных факторов, направленных на сохранение и восстановление постоянства внутренней среды организма в целом, гомеостаза клеток в частности. Вместе с тем противовирусный иммунитет имеет и присущее ему своеобразие, заключающееся прежде всего в том, что в нем главенствуют процессы, происходящие на клеточном и молекулярном уровнях.

1.9 Лекция №9 (2 часа).

Тема: «Профилактика и химиотерапия вирусных болезней»

1.9.1 Вопросы лекции:

1. Принципы получения живых вакцин, достоинства и недостатки.
2. Принципы получения инаktivированных вакцин их достоинства и недостатки.
3. Субъединичные вакцины и ДНК - вакцины их достоинства и недостатки.
4. Химиотерапия вирусных инфекций.

1.9.2 Краткое содержание вопросов

1. Принципы получения живых вакцин, достоинства и недостатки.

Вакцины - это биологические препараты, приготовленные из возбудителей инфекционных болезней или продуктов их жизнедеятельности, которые содержат в своем составе специфический антиген в количестве, достаточном для обеспечения иммунитета у привитых животных.

Антигенности вирусов обусловлена их белками, входящими в состав оболочек. У вирусов различают два типа антигенов: S – внутренний, Vi – внешний.

Специфическая профилактика вирусных болезней обеспечивается применением различных типов вакцин: цельновирионных; вакцин из живых рекомбинантов; синтетических пептидов и антиидиотипических вакцин.

Живые цельновирионные вакцины могут быть гомологичными из ослабленных вирусов, против которых используются с профилактической целью, и гетерологичные их гетерологичных вирусов.

Противовирусные вакцины должны отвечать следующим требованиям: быть специфичными, т.е. иметь антигенную идентичность с возбудителем болезни; полную общую безвредность; иммунологическую реактогенность; стерильность и иммуногенность.

Живые аттенуированные противовирусные вакцины получают путем: 1) адаптации патогенных вирусов к маловосприимчивым или невосприимчивым организмам; 2) селекции природно-ослабленных штаммов вирусов при атипично или латентно протекающих инфекциях; 3) использование гетерогенных антигенно родственных апатогенных штаммов в качестве живых вакцин.

Главным преимуществом живых вакцин является то, что они активируют все компоненты иммунной системы, вызывая сбалансированный иммунный ответ. Живые вакцины, полученные на основе аттенуированных вакцинных штаммов вирусов, обладают рядом преимуществ перед инаktivированными. Главное из них – высокая напряженность и длительность создаваемого ими иммунитета, приближающегося к постинфекционному. Важное достоинство живых вакцин – возможность для большинства из них однократного введения.

Вторым преимуществом живых вакцин является возможность применять их не только подкожно, но и перорально, интраназально и аэрозольно.

Однако живые вакцины наряду с отмеченными преимуществами имеют и ряд недостатков: они обычно сохраняют некоторый уровень остаточной патогенности, хотя он может быть и очень низким.

2. Принципы получения инаktivированных вакцин их достоинства и недостатки.

В инаktivированной вакцине вирусный геном должен быть переведен в инаktivную форму или разрушен. Остаточная инфекционность инаktivированных вакцин даже при химической или физической инаktivации генома может быть обусловлена разнообразными генетическими воздействиями между отдельными интактными

фрагментами нуклеиновых кислот. Инактивация направлена на вирусный геном и по возможности не должна затрагивать белковый каркас вирусной частицы.

Изготовление инаktivированных вакцин начинается с выбора штамма вируса, культивирования и накопления производственного штамма в чувствительной биосистеме (в организме лабораторного животного РЭК, культуре клеток). Далее происходит очистка и концентрирование вируса методами низкоскоростного центрифугирования, гельфльтрацией, дифференциальным центрифугированием. Поскольку инаktivированные вирусы неспособны размножаться то для создания достаточно напряженного иммунитета необходимо вводить большое количество вирусного материала, кроме того особое требование предъявляют к чистоте препарата. Вакцина не должна содержать балластных веществ.

Важным условием создания инаktivированной вакцины является выбор инаktivатора и условий инаktivации которые позволят максимально сохранить антигенность вакцины.

Из физических факторов наиболее часто используют γ -лучи, УФ-лучи, влияние температуры. Но чаще в качестве инаktivаторов используют химические вещества такие как формальдегид, β -пропиолактон, гидроксилламин.

Инаktivированные вакцины должны быть проверены на авирулентность. Безопасность проверяют на чувствительных биосистемах.

Для повышения иммуногенности инаktivированной вакцины в ее состав вводят адъюванты- это вещества химической природы неспецифически повышающие иммунный ответ на введение вакцины. В качестве адъювантов используют гидроксил алюминия, минеральные масла, сапонин и др. К адъювантам предъявляют требование они не должны быть токсичными, не вызывать побочных реакций в организме, не обладать антигенной активностью, должны стимулировать длительный иммунитет.

Основным недостатком инаktivированных вакцин является то, что они уступают аттенуированным живым вирусам в отношении индукции Т-клеточного иммунитета. Кроме того, для эффективной индукции В-клеточного (гуморального) иммунитета необходимо вводить относительно большие дозы инаktivированной вакцины с определенной периодичностью, что может приводить с течением времени к алергизации организма. При инаktivации вируса часть антигенов может полностью или частично разрушаться, что также снижает качество вакцины.

3. Субъединичные вакцины и ДНК - вакцины их достоинства и недостатки.

Известно три метода получения субъединичных вакцин. Первый состоит в получении большого количества вируса, его очистке и выделении иммуногенных субъединиц (так называемые «сплит-вакцины»), однако этот способ дорогостоящий. Второй метод – химический синтез специфического иммуногена, что требует знания структуры и аминокислотного состава антигенных детерминант. Детерминантные участки, которые включают в себя несколько аминокислот, могут быть синтезированы химически и соединены с белком-носителем, таким, как бычий, сывороточный альбумин, затем сцепленный белок используется в качестве вакцины.

Процесс получения субъединичных вакцин сложный и дорогостоящий. Субъединичные вакцины менее реактогенны, имеют неограниченные возможности использования в составе ассоциированных вакцин.

Создание синтетических вакцин проблематично, поскольку многие вирусные протективные антигены - представляют собой конформационные кислотные участки собранные вместе благодаря пространственной организации белка, а конформация имеет важное значение для иммунного ответа.

Третий способ - генно-инженерный. Это микробиологический синтез продуктов, аналогичных протективным антигенным детерминантам (эпитопам). Микробную клетку можно заставить синтезировать субъединичную или молекулярную вакцину.

Принцип создания генно-инженерных вакцин заключается в том, что необходимый ген (отвечающий за выработку белка вируса) вырезается из ДНК вируса и с помощью ферментов - рестриктаз, вшивается в вектор – плазмиду чаще всего E. Coli. Затем рекомбинантная ДНК вводится в бактериальную клетку E. Coli. В ней происходит её репликация и экспрессия встроеного гена, что ведет к синтезу соответствующего белка. После того как в бактериальной популяции будет накоплен необходимый белок, его выделяют, очищают и используют в качестве материала для создания вакцины. Однако многие вирусные белки успешно синтезируемые в микроорганизмах обладают низкой иммуногенной активностью.

Субъединичные вакцины обладают значительными преимуществами по сравнению с традиционными препаратами: они безопасны, так как не содержат вируса, способного вызвать заражение, свободны от вредных примесей, стабильны и не требуют хранения в рефрижераторах. Главным недостатком субъединичных вакцин является их слабые иммуногенные свойства. Для преодоления этого недостатка ведется поиск новых адъювантов и иммуностимуляторов.

При выборе вакцины врач должен руководствоваться: 1) технологией ведения животноводства; 2) эпизоотологической характеристикой хозяйства; 3) длительностью и напряженностью поствакцинального иммунитета; 4) практическим удобством применения вакцин; 5) возможностью обеспечить механизм в иммуногенезе при использовании живых и инактивированных вакцин.

4. Химиотерапия вирусных инфекций.

Создание, отбор и применение высокоактивных и малотоксичных антивирусных препаратов (АВП), предупреждающих проникновение вирусов в организм (профилактический эффект)

Подавляющих размножение вирусов уже проникших в ткани и органы организма (терапевтический эффект)

По характеру действия и клинической значимости АВП подразделяются: этиотропные; иммуномодулирующие; патогенетические; симптоматические.

1.10 Лекция №10 (2 часа).

Тема: «Вирусы бешенства»

1.10.1 Вопросы лекции:

1. Определение болезни, клиническая картина, патогенез, патоморфологические изменения.
2. Характеристика возбудителя: морфология, химический состав, устойчивость к физико-химическим воздействиям, антигенная активность, антигенная структура, антигенная вариабельность и родство.
3. Локализация вируса, выделение из организма. Культивирование. Особенности репликации.
4. Лабораторная диагностика бешенства, иммунитет и специфическая профилактика

1.10.2 Краткое содержание вопросов:

1. Определение болезни, клиническая картина, патогенез, патоморфологические изменения.

Бешенство – остро протекающая инфекционная болезнь теплокровных животных и человека, характеризующаяся поражением центральной нервной системы

Бешенство распространено повсеместно. В Оренбургской области бешенство регистрируется ежегодно. Бешенством болеют все виды теплокровных животных и человек. Резервуаром вируса бешенства являются - дикие животные

Степень и скорость распространения бешенства зависят:

- 1 - образа жизни диких животных разных видов

2 - вирулентности местных штаммов вируса

3 - характера эпизоотического процесса.

Чувствительность животных к полевым штаммам вируса бешенства зависят от заражаемой дозы, места введения, возраста животного, патогенных свойств вируса.

Болезнь может протекать в буйной и тихой форме. При буйной форме в развитии болезни выделяют 3 стадии: продромальную стадию, стадию возбуждения, стадию параличей.

Продромальная стадия характеризуется: продолжительностью от 12 часов до 3 суток

В местах укуса возникает сильный зуд. К концу продромальной стадии затрудняется глотание (следствие пареза мышц глотки). Характеризуется изменением поведения животного.

Стадия возбуждения характеризуется: продолжительностью 3-4 дня. У собак исчезает чувство страха, возникает стремление убежать, нарастает агрессивность, животное нападает на других животных и людей. Возможны судороги. Постепенно развиваются параличи, приводящие к афонии, отвисанию нижней челюсти, косоглазию.

Стадия параличей характеризуется: продолжительностью 1-4 дня. В этот период возникают параличи задних конечностей, затем туловища, передних конечностей.

При тихой (паралитической) форме бешенства стадия возбуждения выражена слабо

Атипичная форма бешенства отмечается у крупного рогатого скота зараженного от лисиц.

Патологоанатомические изменения при бешенстве следующие: трупы истощены, на них следы укусов, расчесов, шерсть в области нижней челюсти и подгрудка смочена слюной и загрязнена. Катаральное воспаление слизистых оболочек верхних дыхательных путей. Головной мозг и его оболочки с точечными кровоизлияниями. Сосуды мозга расширены.

2. Характеристика возбудителя: морфология, химический состав, устойчивость к физико-химическим воздействиям, антигенная активность, антигенная структура, антигенная вариабельность и родство.

Вирус бешенства относится к семейству Rhabdoviridae род Lyssavirus. Вирион сложноорганизованный, $d=75-80$ нм, длина 180 нм, построен по спиральному типу симметрии. Геном представлен 1-нитевой негативной РНК, кодирует 5 структурных вирусных белка. Обладает гемагглютинирующими свойствами.

Устойчивость вируса к физико-химическим воздействиям:

Низкие температуры консервируют вирус

При температуре 23 °С вирус инактивируется через 28-53 дня, при 50 °С через 1 час, 60 °С -10 минут, 70 °С – мгновенно, 1-5 % р-р формалина за 5 минут, 2% р-р фенола за 24 часа, 5% р-р фенола за 5-10 минут, 1% $KMnO_4$ за 20 минут, 3-5% HCl за 5 минут, 19% раствор йода за 5 минут.

Антигенная структура вируса бешенства представлена: 1) Гликопротеидным антигеном вирусной мембраны – индуцирует образование вируснейтрализующих антител; 2) Внутренним нуклеокапсидным антигеном - индуцирует образование комплементсвязывающих и преципитирующих антител.

3. Локализация вируса, выделение из организма. Культивирование. Особенности репликации.

Вариабельность патогенных штаммов: 1) усиленный штаммы или ремфорс; 2) а) Улу-Фато (болезнь «безумной» собаки), б) от крупного рогатого скота в Кадейросе, в) от людей на о. Троица; 3) от песцов при «дикивание»; 4) штамм Флури; 5) объединены вирусы, выделенные от людей.

На лабораторных животных при интрацеребральном заражении. В первичной культуре клеток почки хомячка. Эмбриона овец, куриных фибробластов, слюнных желез

собак. В перевиваемой культуре клеток ВНК-21, кроличьего эндотелия, почек эмбриона свиней, и др.

Чувствительность животных к полевым штаммам вируса бешенства *зависят* от заражаемой дозы, места введения, возраста животного, патогенных свойств вируса.

Особенности репродукции вируса бешенства:

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 полиаденилированные мРНК. Трансляция 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. Лабораторная диагностика бешенства, иммунитет и специфическая профилактика

Диагноз на бешенство ставят с учетом эпизоотических данных, клинических признаков болезни, результатов лабораторных исследований.

Патологоанатомические изменения не характерные.

Иммунитет: Постинфекционного иммунитета - нет.

Поствакцинальный иммунитет может быть создан применением специфических вакцин. При своевременном применении вакцины инфицированному организму, она оказывает лечебный эффект.

Бешенство необходимо дифференцировать от энцефаломиелита, болезни Ауески, нервной формы чумы, незаразных болезней, сопровождающихся сильными болями.

В настоящее время для профилактики бешенства используют живые и инаktivированные вакцины. Их можно условно разделить на 3 группы: а) вакцины первого поколения. Приготовленные из головного мозга животных, инфицированных вирусом фикс; б) вакцины второго поколения, готовят из штаммов адаптированных к культуре клеток; в) генно-инженерные вакцины.

Разработаны и успешно применяются вакцины для пероральной иммунизации диких плотоядных животных. Проведен был эксперимент - скармливались приманки с вакциной и определяли напряженность иммунитета. Иммунитет у лисиц до 1 года - это период наблюдения и передавался лисят в течение 45-дней (период наблюдения) у них обнаруживались антитела.

1.11 Лекция №11 (2 часа).

Тема: «Вирусы болезни Ауески»

1.11.1 Вопросы лекции:

1. Определение болезни, клиническая картина, патологоанатомические изменения.
2. Характеристика возбудителя: морфология и химический состав, устойчивость к физико-химическим факторам. Антигенная активность, антигенная вариабельность и родство.
3. Культивирование. Особенности внутриклеточной репродукции.
4. Источники и пути передачи инфекции. Диагностика. Иммунитет и специфическая профилактика.

1.11.2 Краткое содержание вопросов

1. Определение болезни, клиническая картина, патологоанатомические изменения.

Болезнь Ауески - Aujeszky's disease. Morbus Auyeskyi (псевдобешенство) - остро протекающая болезнь сельскохозяйственных животных всех видов, пушных зверей и грызунов, характеризующаяся энцефаломиелитом, пневмонией и проявляющаяся лихорадкой, судорогами, возбуждением, а также сильным зудом и расчёсами у всех видов животных кроме свиней.

Продолжительность инкубационного периода зависит от: метода заражения, вирулентности вируса, устойчивости животного.

Клинические признаки: у свиней болезнь проявляется без признаков зуда. Особенно тяжело болеют поросята-сосуны и отъемыши. При внутриутробном заражении или в течение первых 10 дней после рождения — болезнь носит септический характер. У поросят в возрасте от 10 дней до 3 месяцев клинические признаки: повышение температуры тела до 41-42 ° С. Угнетение, слизистые истечения из носа, признаки поражения центральной нервной системы — манежные движения, стремление вперед, животные упираются головой в стенку.

Клинические признаки у крупного рогатого скота

Повышение температуры до 42 °С, прекращается жвачка, появляется сильный зуд в области ноздрей, губ, щек, глаз. Животные трутся зудящими местами об окружающие предметы. Нарастает возбуждение но агрессивности не наблюдается. Смерть наступает через 1-2 суток с момента появления клинических признаков.

Клинические признаки у лошадей. Заболевание длится 2-4 дня доброкачественно.

Признаков поражения центральной нервной системы - нет.

Клинические признаки болезни Ауески у плотоядных. Сильный зуд, беспокойство, извращение аппетита, отмечается нападение на других животных, но не на людей. Гибель через 2-3 дня.

Патологоанатомические изменения при болезни Ауески: на трупах павших при явлении зуда, видны расчесы и разрывы кожи.

2. Характеристика возбудителя: морфология и химический состав, устойчивость к физико-химическим факторам. Антигенная активность, антигенная вариабельность и родство.

Вирус болезни Ауески — Psuedorabies virus, относится к семейству Herpesviridae, подсемейству Alphaherpesvirinae, роду Varicellovirus. Вирион сложноорганизованный состоит из сердцевин (core), капсида, тегумента, пеплоса, d=180-190 нм. Кубический тип симметрии. Геном 2-нитевая линейная ДНК, размер генома – 125-240 kbp, кодирует около 50 белков, из них 6 – входят в состав капсида, 15-тегумента, 10-пеплоса.

Устойчивость вируса болезни Ауески к физико-химическим воздействиям.

Низкие температуры консервируют вирус. Нагревание до 100°C обезвреживает вирус за 1 мин, до 70°C за 10-15 мин, 50°C за 30-40 мин. Вирус чувствителен к эфиру, хлороформу. Устойчив к широким колебаниям pH 5-9. Быстро инактивируется 3%-ным раствором щелочи, 5 %-ным раствором хлорной извести.

Антигенная активность. В оболочке вируса различают 3 основных гликопротеина: Д1, Д2, Д3, на которые при инъекции вырабатываются антитела. комплементсвязывающие - на 3 день и титр удерживаются 30-40 дней, преципитирующие, вируснейтрализующие — появляются на 5-7 дней, максимального титра достигают на через 3-4 недели, титр сохраняется до 1,5 лет.

3. Культивирование. Особенности внутриклеточной репродукции.

Культивирование: перевиваемой культуре клеток куриных эмбрионов, почек крупного рогатого скота, свиней, HeLa, КЭМ-Ла, - с образованием бляшек под агаровым покрытием, ЦПЭ – в виде синцитиев и округления клеток.

Хорошо культивируется в организме взрослых кроликов при в/м, п/к, и/ц заражении. Возможно культивирование в 10-12 дневных куриных эмбрионах на ХАО или в желточном мешке.

Особенности репродукции: проникновение – слиянием вирусной и клеточной мембран, место репродукции – ядро и цитоплазма клеток, формирование суперкапсидной оболочки происходит путем модификации ядерной мембраны.

Выход из клетки – путем «почкования».

4. Источники и пути передачи инфекции. Диагностика. Иммуитет и специфическая профилактика.

Локализация вируса: вирус имеет тропизм к нервной ткани, однако имеются свои особенности в патогенезе в зависимости от способа заражения, вида и возраста животных.

При проникновении возбудителя через слизистые оболочки ВДП и ЖКТ у свиней в месте проникновения происходит репродукция с увеличением концентрации вируса. Далее вирус по тройничному, обонятельному и языкоглоточному нервам проникает в головной мозг. Репродукция вируса в ЦНС сопровождается развитием энцефалита.

При проникновении через кожу вирус репродуцирует в месте внедрения и гематогенным и лимфогенным путями распространяется по организму. Болезнь сопровождается признаками тяжелой септицемии и нервными явлениями. Помимо этих признаков могут отмечаться признаки поражения дыхательной системы – пневмонии, отек легких и др., и признаки поражения пищеварительной системы - диарея.

Источники возбудителя болезни: больные животные или бессимптомные вирусоносители, боенские отходы. Диагностика болезни Ауески на основании: эпизоотологических данных, симптомов болезни, патологоанатомических изменений, результатов лабораторных исследований: РН, РСК, РДП, МФА.

Вирусологические исследования - выделение в организме кроликов, культуре клеток с последующей идентификацией выделенного вируса в РИФ, РДП, РН, РНГА, ИФА

Иммуитет: Гуморальный и клеточный иммуитет проявляется на 8-10 день после инфицирования или вакцинации, достигает пика через 30 дней и сохраняется 5-6 месяцев, иногда до 4,5 лет. Молодняк имеет иммуитет за счёт колостральных антител продолжительностью 5-7 дней.

Профилактика осуществляется инаktivированными и живыми вакцинами – эмбриональная гидроксидалюминиевая формолвакцина ВГНКИ, сухая живая культуральная вирусвакцина против болезни Ауески крс, живая вакцина из штамма болезни Ауески БУК-628, ВК.

1.12 Лекция №12 (2 часа).

Тема: «Вирусы гриппа»

1.12.1 Вопросы лекции:

1. Морфология, систематика возбудителя. Устойчивость к физико-химическим факторам.
2. Культивирование вируса. Репродукция в клетке
3. Антигенная структура, антигенная вариабельность. Дрейф, шифт.
4. Источники и пути передачи возбудителя болезни. Патогенез. Клинические признаки. Патологоанатомические изменения.
5. Иммуитет. Диагностика.

1.12.2 Краткое содержание вопросов:

1. Морфология, систематика возбудителя. Устойчивость к физико-химическим факторам.

Вирус гриппа относится к семейству Orthomyxoviridae род Influenzavirus A. Характеристика вируса гриппа: вирион сложноорганизованный, 80-120 нм. Геном – РНК односторонней фрагментированной. Спиральный тип симметрии.

Белки вируса гриппа: капсидные - NP - нуклеопротеид, PB1 - транскриптаза, PB2 - эндонуклеаза, PA - репликаза; суперкапсидные - HA – гемагглютинин, NA – нейраминидаза, M – мембранный белок

Геном представлен РНК- 1 нитевой фрагментированной, кодирует 3 неструктурных белка.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям: при температуре 65 °С – погибает через 5-10 минут, прямой солнечный свет инактивирует вирус за 40 часов. Вирус стабилен при pH 7,0-8,0, неблагоприятна кислая среда. Вирус разрушается дезинфицирующими веществами: 0,1% I₂; 1% раствором Люголя; 3% хлорная известь; 2% KOH; 5% креолин, эфиром, детергентами. Формалин инактивирует вирус, но не влияет на его гемагглютинирующие и Аг свойства.

Антигенная структура вируса гриппа представлена: поверхностным V-антигеном – HA и NA. Антитела к HA обладают вируснейтрализующей активностью.

Внутренний S-антиген, представлен NP и М-антигеном, которые являются типоспецифическим антигеном. Вирус обладает гемагглютинирующей активностью.

2. Культивирование вируса. Репродукция в клетке

Вирус гриппа культивируется в РЭК 9-11 дневного возраста в аллантоисную или амниотическую полости. Выделенный вирус обнаруживается в РГА.

Вирус можно культивировать в культуре клеток, а также в организме лабораторных животных (хомячки, крысы, мыши).

Особенности репродукции: проникновение в клетку происходит путем рецепторного эндоцитоза. Репродукция происходит в ядре и в цитоплазме. Зрелые вирионы покидают клетку путем «почкования». вирусы гриппа обладают гемагглютинирующими свойствами.

3. Антигенная структура, антигенная изменчивость. Дрейф, шифт.

Вирусы гриппа рода А вызывают заболевание у человека, животных и птиц, рода С – у человека и свиней, а также иногда гриппоподобные заболевания у животных и человека, протекающие в основном в латентной форме. Антигенная структура вирусов гриппа представлена двумя антигенами: 1) общий S-антиген, связанный с внутренними белками вирионов, по которому определяются роды вируса в РСК; 2) Vi-антиген связан с белками внешней оболочки – гемагглютинином (H-антиген) и нейраминидазой (N-антиген) ответствен за создание иммунитета.

Антигенная изменчивость:

Дрейф – постепенные, незначительные изменения антигенных детерминант, в результате образуются новые варианты, вызывающие межэпизоотические вспышки болезни. Новые варианты могут возникать на иммунном фоне в результате естественной селекции их предыдущих штаммов. Антигенные изменения, происходящие при дрейфе, проявляются на уровне нейраминидазы вируса гриппа. Такие явления наблюдаются у вирусов гриппа А человека, свиней, лошадей, птиц.

Шифт – резкая, полная смена одного или обоих антигенов, в результате возникают совершенно новые вирусы, так называемые пандемические штаммы, вызывающие заболевания одновременно в нескольких странах и даже континентах. Такие штаммы вирусов гриппа возникают при рекомбинации между вирусами человека, животных, птиц.

4. Источники и пути передачи возбудителя болезни. Патогенез. Клинические признаки. Патологоанатомические изменения.

Патогенез. Вирус гриппа, попадая с воздухом на слизистые оболочки дыхательных путей, проникает в эпителиальные клетки, где происходит его репродукция, деструктивные изменения и гибель клеток. Выделяющийся из клеток вирус поражает новые участки эпителиальной ткани; в процесс вовлекается поверхность слизистой оболочки. В воспалившихся тканях накапливаются токсические продукты распада, которые, попадая в лимфу и кровь, вызывают дегенеративные изменения в различных тканях. У животного повышается температура, в крови накапливаются специфические антитела. При угнетении защитных механизмов бурно развивается вторичная условно-патогенная микрофлора, усиливающая воспалительный процесс в легких.

Источниками вируса гриппа являются – больные животные и птицы.

Заражение происходит - воздушно-капельным путем

Клинические признаки: повышение температуры: свиней 41- 42 °С, лошадей 39 - 40 °С, птиц 44 °С. Признаки поражения респираторного тракта. У птиц болезнь может протекать и в кишечной форме

Клинические признаки. Инкубационный период при гриппе длится от 1 до 7 сут. На степень проявления клинических признаков заболевания большое влияние оказывают условия содержания, индивидуальная резистентность животных. При типичном течении гриппа повышается температура. Слизистые оболочки глаз набухшие, отечны, из угла глаз выделяется серозно-катаральный экссудат. Животные кашляют, чихают и др. Возможно поражение желудочно-кишечного тракта (поносы), развитие плевропневмонии и др. Гибель взрослых животных не превышает 2...4 %, в то время как смертность молодняка (поросят) достигает 70 %, а птиц - до 100 %.

Патологоанатомические изменения. При остром течении гриппа обнаруживают выраженный отек легких; слизистые оболочки верхних дыхательных путей набухшие, отечные, иногда с кровоизлияниями, лимфоузлы увеличены, с точечными кровоизлияниями. При подостром течении в легких обнаруживают признаки крупнозно-некротического и гнойного воспаления.

Эпизоотологические особенности. К вирусу гриппа восприимчивы лошади, свиньи, птицы, а также человек. Источники возбудителя — больные и переболевшие животные и птицы. Кроме того, вирус может попасть в организм с кормом и водой; носителем вируса зачастую оказывается обслуживающий персонал. Путь заражения - воздушно-капельный. Грипп животных протекает в форме эпизоотии в хозяйствах, где много способствующих распространению болезни факторов (сырость, скученность, плохое кормление и т.д.). Заболеваемость нередко достигает до 100%, летальность сильно варьирует и зависит от многих факторов.

5. Иммуитет. Диагностика.

У лошадей после переболевания продолжительность иммунитета 1 год; после вакцинации с использованием живых или инактивированных вакцин 1 год. Переболевшие свиньи приобретают иммунитет продолжительностью до 8-10 месяцев. У кур после переболевания иммунитет до 1-2 лет; после вакцинации до 1 года.

Для профилактики гриппа используют вакцины: 1) Живая из аттенуированного вируса; 2) Убитая цельновирионная; 3) Субвирионная (из расщепленных вирионов); 4) Субъединичная – содержит только НА и NA.

Диагноз ставят комплексно с учетом эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных, которые должны быть подтверждены лабораторными исследованиями. Лабораторная диагностика включает обнаружение вируса гриппа в РГА, идентификация в РТГА и выделение вируса в куриных эмбрионах с последующей идентификацией выделенного вируса.

1.13 Лекция №13 (2 часа).

Тема: «Вирусы ящура»

1.13.1 Вопросы лекции:

1. Характеристика болезни; клиническая картина, патологоанатомические изменения.
2. Общая характеристика вируса ящура: морфология, устойчивость, антигенная структура, антигенная активность.
3. Культивирование. Особенности внутриклеточной репродукции.
4. Источники и пути передачи инфекции, диагностика, иммунитет.

1.13.2 Краткое содержание вопросов:

1. Характеристика болезни; клиническая картина, патологоанатомические изменения.

Определение болезни: Ящур (aphthae erizooticae) – это острое лихорадочное высоко контагиозное заболевание парнокопытных животных, протекающее циклически с появлением характерных пузырьков и эрозий на слизистой оболочке пищеварительного тракта, выстланном плоским эпителием, и на участках кожи, на непокрытых волосами.

Характерной особенностью ящурной инфекции является острое стадийное течение: инкубационный период, продромальный период, клинический период.

Исход болезни: выздоровление; гибель животного.

Продолжительность инкубационного периода.

В среднем 2-7 дней, минимальный 12-14 часов, максимальный 14-21 день.

Клинические признаки в начале болезни неспецифические.

Повышение температуры, угнетенное состояние, унижение жвачки, уменьшение выделения молока у дойных коров. При доброкачественном течении болезни на 2-3 сутки на поверхности губ, щек, языка образуются афты - пузырьки, заполненные серозной жидкостью. Афты могут образовываться на коже венчика, межпальцевой щели, основания рогов, коже вымени. Образование афт на конечностях сопровождается хромотой. Афты вначале болезни имеют размер с булавочную головку, затем они увеличиваются в размере, сливаются друг с другом - образуя разлитые поражения. Афты разрываются и на их месте остаются эрозии.

При злокачественном течении наблюдается поражение сердечной и скелетной мышц - «тигровое» сердце. Животные при злокачественном течении погибают. Злокачественное течение чаще наблюдается у молодняка (гибель может достигать до 80 и более %), афт как правило нет.

2. Общая характеристика вируса ящура: морфология, устойчивость, антигенная структура, антигенная активность.

Семейство: Picornaviridae Род: Aphthovirus

Характеристика вируса ящура

Простоорганизованный, $d=24,5$ нм, кубический тип симметрии. Геном представлен 1-нитевой РНК (с позитивной полярностью), кодирует синтез 4 структурных белка. Обладает гемагглютинирующими свойствами.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям

Вирус устойчив к эфиру и хлороформу. Легко инактивируется при pH 6,0 и ниже под действием ультрафиолетовых и γ -лучей. Сохраняется в навозной жиже - 39 дней, в сточных водах - 103 дня, на поверхности стога сена от 1 до 10 дней. Высокие температуры инактивируют вирус при 50 °C за 30 мин, при 60 °C - 5-15 мин, при 80-100 °C - моментально. При низкой температуре вирус сохраняет вирулентность: при 4 °C - 5-8 мес., при -40-70 °C - несколько лет. В не проваренных мясных изделиях (окорок, бекон) сохраняется от 110 до 180 дней, в различных колбасах - 56 дней. Хлорная известь, креолин, крезол, формалин - инактивируют вирус через несколько часов.

3. Культивирование. Особенности внутриклеточной репродукции.

Вirus культивируется на естественно-восприимчивых животных

Лабораторных животных: новорожденных мышатах, крольчатах, хомячках 60-дневного возраста, взрослых морских свинках.

Культуре клеток почек восприимчивых животных, эпителия языка крупного рогатого скота, перевиваемых линиях ВНК-21 - с выраженным ЦПД.

Хорошо культивируется в организме взрослых кроликов при внутримышечном, подкожном и внутримозговом заражении, в 10...12-суточных куриных эмбрионах на хорион-аллантоисной оболочке или в желудочном мешке. В первичных культурах фибробластов куриного эмбриона, клеток почек свиней, крольчат, крупного рогатого скота и обезьян, легких эмбриона свиней вызывает ярко выраженное цитопатогенное действие в виде округления клеток и образования многоядерных гигантских клеток.

Антигенная структура.

VP1 - индуцирует выработку вируснейтрализующих антител, VP2,

VP3, VP4. В вируссодержащей суспензии присутствуют инфекционные и неинфекционные вирусные частицы: 140S – полные вирионы; 75S – капсиды без РНК; 12S-14S – белковые субъединицы и Via-антиген

Антигенная вариабельность

Известно 7 антигенных типов вируса ящура: А, О, С, Sat-1, Sat-2, Sat-3, Азия-1. Типы вируса ящура А.О.С. - это европейские и название дано было по первым буквам провинций в которых были впервые выделены эти штаммы, Sat-1, Sat-2, Sat-3, - это Южноафриканские штаммы, Азия-1 - впервые выделен из Азиатских стран.

4. Источники и пути передачи инфекции, диагностика, иммунитет.

Источники инфекции - больные животные и вирусоносители.

Важную эпизоотологическую роль в распространении ящура играют диких парнокопытных животных.

Вirus очень контагиозен

Переносчиками возбудителя могут быть невосприимчивые к ящуру животные (собаки, кошки, лошади, птицы)

В инкубационный период вирус может выявить в молоке, сперме, слюне.

В период клинического проявления – наибольшее количество вируса содержится в эпителии и жидкости везикул.

В экскретах и секретах больного животного вирус содержится – более 10 дней.

Переболевшие животные могут оставаться вирусоносителями: 50% крупного рогатого скота – могут выделять вирус в течение 8 мес. (некоторые животные остаются носителями до 2 лет)

Иммунитет

Продолжительность иммунитета у переболевших животных составляет у крупного рогатого скота – 8-12 мес., у свиней - 10-12 мес., у овец 18 мес.

Возникает тканевой и гуморальный иммунитет. Гуморальный играет более важную роль в защите. Для профилактики используют инаktivированные вакцины: а) лапинизированные гидроокисьалюминиевые сапонинформолвакцины; б) гидроокисьалюминиевая сапонинформолвакцина из культурального вируса; в) из суспензионной культуры клеток ВНК-21/13. Иммунитет после вакцинации 4-6 месяцев, после ревакцинации более продолжительный. Инаktivированные вакцины моно и поливалентные против одного или нескольких типов вируса ящура. Живые вакцины не применяют. Проводятся работы по созданию синтетических вакцин

1.14 Лекция №14 (2 часа).

Тема: «Вирусы лейкоза крупного рогатого скота»

1.14.1 Вопросы лекции:

1. Характеристика возбудителя лейкоза крупного рогатого скота.
2. Клинические признаки и патологоанатомические изменения при лейкозе крупного рогатого скота
3. Источники и пути передачи возбудителя лейкоза крупного рогатого скота.
4. Диагностика лейкоза крупного рогатого скота.

1.14.2 Краткое содержание вопросов:

1. Характеристика возбудителя лейкоза крупного рогатого скота.

Лейкоз крупного рогатого скота (лат. — Bovine leucosis; гемобластоз, хроническая инфекционная болезнь опухолевой природы) — хроническая болезнь опухолевой природы, протекающая бессимптомно или характеризующаяся лимфоцитозом и злокачественным разрастанием кроветворных и лимфоидных клеток в различных органах.

Возбудитель болезни. Вирус лейкоза крупного рогатого скота — РНК-содержащий вирус род Deltaretrovirus (опухолевые вирусы) семейства Retroviridae. Основным признаком всех представителей семейства Retroviridae является наличие в вирионе обратной транскриптазы. ВЛКРС — это экзогенный вирус в отношении крупного рогатого скота и других чувствительных видов животных. Репликация вируса ограничивается клетками лимфоидной популяции и не выявлена в других тканях организма.

ВЛКРС репродуцируется в перевиваемых, хронически инфицированных культурах клеток тканей животных разных видов.

Установлено, что ВЛКРС чувствителен к температурным воздействиям, разрушается при повторяющихся замораживаниях и оттаиваниях и при прогревании при 56 °С в течение 15 мин. Пастеризация молока (74 °С в течение 16 с) разрушает ВЛКРС. Полная инаktivация вируса в молоке или вирусосодержащей жидкости (кровь, молозиво) установлена при 50 °С в течение 70 с, при 70...74 °С — за 17 с. Прямой солнечный свет инаktivирует ВЛКРС в течение 4 ч, УФ-лучи — в течение 30 мин. Вирус полностью теряет активность в 2%-ных растворах гидроксида натрия и формальдегида и других дезинфектантов в общепринятых концентрациях.

Таким образом, решающее этиологическое значение ВЛКРС при возникновении гемобластозов крупного рогатого скота доказано. Вместе с тем при изучении вирусной этиологии опухолей и лейкозов животных накапливались достоверные данные о том, что канцерогенный эффект вирусов проявляется в зависимости от иммунобиологического состояния организма и воздействия стресс-факторов. Отмечается также более выраженная генетическая устойчивость отдельных пород и линий животных к ВЛКРС.

Эпизоотология. В естественных условиях к ВЛКРС восприимчив крупный рогатый скот. Лейкозом болеют молодые и взрослые животные всех разводимых пород и помесей, но чаще эту болезнь отмечают у животных старше 4 лет. Телята до 6-месячного возраста устойчивы к ВЛКРС, что обусловлено, вероятно, колостральным иммунитетом. Уровень инфицированных животных в возрасте 6...24 мес также низкий.

Источник возбудителя инфекции — больные гемобластозами животные. В естественных условиях вирус лейкоза может передаваться пренатально и постнатально. Вирус передается от матери потомству трансплацентарно во время последних 6 мес внутриутробной жизни. Постнатальная (т. е. горизонтальная) передача включает передачу вируса через молоко или при контакте. В большинстве случаев (более 90 %) вирус передается с инфицированными лимфоцитами.

Основным естественным фактором передачи ВЛКРС считается молоко инфицированных и особенно больных на клинико-гематологических и опухолевых стадиях коров. Учитывая возможность переноса ВЛКРС ничтожным количеством крови,

следует иметь в виду, что при несоблюдении правил асептики и антисептики болезнь может распространиться во время проведения ветеринарных и зоотехнических процедур (ятрогенный фактор передачи): ректальные исследования, фиксация за носовые перегородки, бонитировка, массовые вакцинации, взятия крови, проведение хирургических операций и т. п.

По интенсивности развития эпизоотического процесса гемобластозы крупного рогатого скота относятся к медленно развивающимся инфекционным болезням.

Контагиозность лейкоза незначительна. Сезонность не проявляется. Природно-географические и климатические факторы не влияют на распространение болезни.

В некоторых стадах инфицированность составляет от 10 до 50 %, тогда как гематологические сдвиги, характерные для гемобластозов, устанавливают не более чем у 10 % животных, а клинические признаки наблюдают у 1...2 % больных ЖИВОТНЫХ.

Патогенез. При лейкозе крупного рогатого скота патогенез связан с монотропизмом ВЛКРС к тканям органов кроветворения и иммуногенетическим состоянием макроорганизма. Взаимодействие микро- и макроорганизмов при лейкозах проявляется в виде инап-парантной инфекции, или гематологических изменений белой крови, или образования опухолей кроветворных органов. Злокачественная трансформация клеток кроветворных органов характеризуется сложным процессом, который обуславливается как вирусными, так и клеточными генами и ферментными системами. Вирус лейкоза, находясь в клетке, не вызывает ее гибели, как это наблюдается практически при всех вирусных болезнях, а способствует нарушению процессов нормального созревания и дифференциации клеток кроветворных органов, что приводит к злокачественному перерождению их.

Находясь в клетке, вирус лейкоза длительное время может оставаться латентным, не провоцируя болезнь. Основным в патогенезе лейкоза является нарушение нормального процесса пролиферации и дифференциации клеток кроветворной ткани. Чаще поражаются лейкобластические клетки, что приводит к интенсивной пролиферации различных типов лейкоцитов в кроветворных органах. Неконтролируемо размножающиеся клетки крови распространяются по организму и попадают в различные органы и ткани, образуют опухоли, вызывающие изменения структуры и функции пораженных органов вследствие атрофии специфических клеток. Нарушения проявляются на молекулярном, клеточном и органном уровнях, что приводит к расстройству кроветворения, увеличению числа лимфоцитов. У больных лейкозом животных выявляют изменения структуры лимфоидных клеток, рибонуклеопротеидных комплексов, ведущие к упрочению связи между РНК и белками. В геноме бласттрансформированной клетки изменения рассматриваются как факторы, действия которых влияют на дифференцировку клетки.

У некоторых, чаще всего взрослых животных, несущих наследственную предрасположенность, при дополнительных молекулярно-биологических и иммуно-биологических перестройках в клетке болезнь проявляется гематологическими и реже опухолевыми изменениями в органах кроветворения.

2. Клинические признаки и патологоанатомические изменения при лейкозе крупного рогатого скота

Течение и клиническое проявление. Лейкозы характеризуются длительным латентным периодом (инкубационный период), во время которого в крови выявляют ВЛКРС и антитела к нему. При спонтанном заражении этот период длится от 2 до 6 лет. Клинические проявления зависят от вовлечения в патологический процесс органов — лимфатических узлов, селезенки, сычуга, сердца, почек, половых и др. Инфекционный процесс при лейкозе развивается медленно и незаметно.

В развитии лейкозного процесса у крупного рогатого скота различают четыре стадии: предлейкозную, начальную (доклиническую), развернутую (клинико-гематологическую) и конечную, или терминальную (опухолевую), стадии.

Предлейкозная стадия у зараженных ВЛКРС животных проявляется в виде относительного лимфоцитоза (до 14 тыс/мкл, или $14 \cdot 10^9/\text{л}$) за счет лимфоидных клеток, характерных для подозрительных по заболеванию по «лейкозному ключу». Обнаружить другие патологические изменения не удается.

Начальная стадия характеризуется отсутствием клинических признаков болезни, но более постоянными изменениями количественного и качественного состава крови. Число лейкоцитов колеблется от 15 до 40 тыс/мкл [$(15...40) \cdot 10^9/\text{л}$], а среди лимфоцитов преобладают юные и средние клетки. Гематологические изменения могут многие годы оставаться стабильными. При этом общее состояние животного — упитанность, молочная продуктивность и воспроизводительная функция не вызывают подозрений на лейкоз. Лишь при обострении хронического течения болезни могут появляться такие признаки, как снижение удою, истощение и другие, и лейкозный процесс переходит в развернутую стадию.

Развернутая стадия характеризуется кроме гематологических сдвигов разнообразием специфических и неспецифических клинических признаков. У животного ухудшается общее состояние, отмечаются быстрая утомляемость, плохой аппетит, снижаются удои, прогрессирует истощение, наблюдается атония преджелудков, сменяющаяся диареей. Перкуссией нередко устанавливают увеличение сердца, число пульсовых ударов достигает ... 120 в минуту, пульс слабого наполнения, волна малая. Сердечный толчок ослаблен. При сердечной слабости у животного развиваются отеки подкожной клетчатки в области подгрудка и межжелудочного пространства.

Наименование вопроса №3. Источники и пути передачи возбудителя лейкоза крупного рогатого скота.

Специфическим клиническим признаком лейкозов крупного рогатого скота является прогрессирующее значительное увеличение поверхностных (околоушных, нижнечелюстных, заглоточных, предлопаточных, надвыменных и др.) лимфатических узлов. Отмечается симметричное, но неравномерное увеличение их. Лимфатические узлы достигают величины от 5 до 20 см и более, они безболезненные, подвижные, эластичной или плотной консистенции.

У молодняка наряду с увеличением лимфатических узлов в области голодной ямки, поясницы, шеи часто отмечают опухолевидные разрастания зобной железы, обуславливающие затрудненное дыхание. При значительном увеличении селезенки перкуссией устанавливают притуплённый или тупой звук, в некоторых случаях болезненность. Возможен разрыв селезенки, и животное внезапно погибает вследствие внутреннего кровоизлияния. Отмечают также увеличение печени. В тяжелых случаях ее границы сдвигаются назад и вниз, что устанавливают перкуссией.

Значительное увеличение некоторых лимфатических узлов, а также опухолевых разрастаний в тазовой и брюшной областях можно установить при ректальном исследовании. У некоторых (3...5 % случаев) больных лейкозами животных отмечают экзофтальм (пучеглазие).

При развернутой стадии лейкозного процесса отмечают лейкемическую картину крови (40 тыс. и более лейкоцитов в 1 мкл крови, т. е. более $40 \cdot 10^9/\text{л}$), увеличение числа молодых, недифференцированных клеток в лейкоцитарной формуле (доля таких клеток может достигать 5 %). Продолжительность этой стадии варьируется от нескольких месяцев до 1...2, иногда и 3 лет.

Терминальная (опухолевая) стадия лейкоза характеризуется дальнейшим развитием патологического процесса и более отчетливым проявлением клинических признаков: резким увеличением лимфатических узлов, которые могут заметно выступать на теле; отеками подкожной клетчатки в области подгрудка, межжелудочного пространства,

конечностей. Число лейкоцитов в крови иногда снижается, при этом преобладают их патологические формы. Это приводит к крайнему истощению органов кроветворения, блокаде иммунной системы и заканчивается смертью животного.

У крупного рогатого скота может встречаться *кожная форма лейкоза*. На теле животного появляются узелковые припухлости диаметром до 2,5 см, хорошо заметные на шее, спине, крестце и бедрах. В течение нескольких недель происходит облысение припухлости, ее поверхность покрывается корочкой, состоящей из эпителия и экссудата. Затем корочки отпадают, а облысевшие участки вновь покрываются шерстью. Однако через несколько месяцев после кажущегося выздоровления наступает рецидив с появлением тех же признаков болезни. Происходит инфильтративное поражение висцеральных органов, и животное погибает.

3. Источники и пути передачи возбудителя лейкоза крупного рогатого скота.

Источник возбудителя инфекции — больные гемобластозами животные. В естественных условиях вирус лейкоза может передаваться пренатально и постнатально. Вирус передается от матери потомству трансплацентарно во время последних 6 месяцев внутриутробной жизни. Постнатальная (т. е. горизонтальная) передача включает передачу вируса через молоко или при контакте. В большинстве случаев (более 90 %) вирус передается с инфицированными лимфоцитами.

Основным естественным фактором передачи ВЛКРС считается молоко инфицированных и особенно больных на клинко-гематологических и опухолевых стадиях коров. Учитывая возможность переноса ВЛКРС ничтожным количеством крови, следует иметь в виду, что при несоблюдении правил асептики и антисептики болезнь может распространиться во время проведения ветеринарных и зоотехнических процедур (ятрогенный фактор передачи): ректальные исследования, фиксация за носовые перегородки, бонитировка, массовые вакцинации, взятия крови, проведение хирургических операций и т. п.

По интенсивности развития эпизоотического процесса гемобластоzy крупного рогатого скота относятся к медленно развивающимся инфекционным болезням.

Контагиозность лейкоза незначительна. Сезонность не проявляется. Природно-географические и климатические факторы не влияют на распространение болезни.

4. Диагностика лейкоза крупного рогатого скота.

Первичный диагноз в хозяйстве ставят на основании эпизоотологических, клинко-гематологических, серологических и патологоанатомических данных с обязательным проведением гистологического исследования.

Животное считают больным лейкозом при наличии одного из следующих показателей: 1) клинических признаков болезни; 2) положительных результатов гематологических исследований; 3) обнаружении у павшего (убитого) животного характерных патологоанатомических изменений; 4) установлении положительного результата гистологического исследования патологического материала в случае падежа (убоя) животных.

Клинические признаки проявляются, как правило, к концу болезни, поэтому в диагностике заболевания они имеют лишь вспомогательное значение.

Гематологическое исследование заключается в обнаружении в периферической крови повышенного числа лейкоцитов, в основном лимфоидного ряда, и слабодифференцированных клеток (родоначальных, пролимфоцитов, лимфобластов), а также полиморфных, атипичных клеток кроветворных органов.

Подсчет лейкоцитов проводят при помощи электронного счетчика или в камере Горяева, а процентное соотношение отдельных форм лейкоцитов крови — в окрашенном мазке под микроскопом. Результаты гематологических исследований оценивают по так называемому лейкозному ключу и морфологическому характеру клеток крови.

Если количество лейкоцитов у животных будет ниже числа, указанного во второй графе таблицы, то результат исследования на лейкоз считают отрицательным, если выше, то готовят мазки и определяют лейкоцитарную формулу. У быков-производителей во всех случаях независимо от числа лейкоцитов выводят лейкоцитарную формулу.

Серологический метод диагностики основан на выявлении в сыворотке крови животных при помощи РИД антител к антигену ВЛКРС. Специфические антитела появляются в крови крупного рогатого скота через 2 мес после заражения, т. е. значительно раньше, чем гематологические изменения, и сохраняются пожизненно. РИД представляет собой основной метод серологического исследования животных в государственных программах по борьбе с лейкозом крупного рогатого скота во многих странах, в том числе в России.

Кроме того, с этой целью возможно применение других реакций: связывания комплемента (РСК); иммунофлюоресценции (РИФ); радиоиммунопреципитации (РИП); нейтрализации (РН), иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР). Все перечисленные методы направлены на выявление антител к одному из двух структурных белков ВЛКРС — gp24 и p51.

Животных, давших положительные результаты в РИД, считают инфицированными, животных с гематологическими изменениями в картине крови или с клиническими признаками — больными лейкозом.

Патологоанатомические признаки. При патологоанатомическом исследовании трупов животных выявляют увеличение лимфатических узлов, особенно средостенных и брыжеечных, которые не спаяны между собой. Поверхность разреза их саловидная, рисунок строения слегка или совсем стерт. Селезенка увеличена (длиной от 48 до 100 см). Поверхность разреза ее красная, сочная, зернистая. Увеличенные фолликулы обычно вишнево-красного или сероватого цвета. Они возвышаются над поверхностью разреза. У некоторых животных фолликулы могут быть малиново-красного цвета. Макроскопических изменений в почках обычно не выявляют. Однако иногда можно наблюдать сероватую бугристость размером от 1 до 5 мм и более.

При гистологическом исследовании выявляют системную диффузную лейкозную инфильтрацию во всех органах кроветворения: костном мозге, селезенке, лимфатических узлах, а также в пейеровых бляшках и солитарных фолликулах кишечника, печени, почках, сердце, легких, скелетной мускулатуре.

При изучении гемобластозов установлено, что у крупного рогатого скота наиболее часто встречаются две группы — лимфоидные лейкозы и лимфосаркомы. Лимфоидные лейкозы подразделяют на две основные группы — острые и хронические. В основе этого подразделения лежит строение опухолевых клеток. К острым отнесены лейкозы, клеточный субстрат которых представлен бластами, а к хроническому — лейкозы, когда основная масса опухолевых клеток дифференцирована и состоит в основном из зрелых элементов. Продолжительность заболевания не определяет отнесение того или иного лейкоза к группе острых или хронических. Из лимфоидных лейкозов у крупного рогатого скота чаще встречается хронический и реже — острый.

При гистологическом анализе необходимо учитывать: в лимфатических узлах — общий рисунок строения, состояние капсулы, трабекул, светлых центров, синусов, мягкотных тяжей; в селезенке — состояние капсулы, трабекул, белой и красной пульпы, наличие границ фолликулов; в паренхиматозных органах — наличие и локализацию лимфоклеточных инфильтратов.

При дифференциальной диагностике следует принимать во внимание ряд хронических инфекционных болезней крупного рогатого скота (актиномикоз, туберкулез, паратуберкулез, бруцеллез), а также некоторые незаразные заболевания (гепатиты, циррозы, амилоидную дистрофию и другие заболевания печени, маститы, пневмонии, ретикулоперикардиты, нефриты), сопровождающиеся лейкозоподобными изменениями гематологических показателей, называемых лейкемоидными реакциями.

Иммунитет, специфическая профилактика. Естественный иммунитет при гемобластозах крупного рогатого скота имеет ряд специфических особенностей, отличающих его от естественного иммунитета при других инфекционных болезнях. Главное отличие заключается в том, что антитела не способны элиминировать ВЛКРС, который обычно присутствует в инфицированных лимфоцитах в непродуктивном состоянии и защищен от действия антител.

Проблема специфической профилактики лейкоза крупного рогатого скота не решена, хотя исследования в этой области активно продолжаются. В частности, в России ведутся изыскания с целью создания вакцины против лейкоза крупного рогатого скота с использованием вируса осповакцины как вектора генов протективных антигенов ВЛКРС.

Профилактика. Общие мероприятия по профилактике лейкоза крупного рогатого скота включают в себя соблюдение ветеринарно-санитарных требований при содержании, кормлении и ветеринарном обслуживании животных. Продажу, сдачу на убой, выгон, размещение на пастбищах и все другие перемещения и перегруппировки животных, реализацию животноводческой продукции проводят только с ведома и разрешения ветеринарных специалистов. Осуществляют карантинирование в течение 30 дней вновь поступивших животных для проведения клинического осмотра, серологического и гематологического исследований.

Контроль за благополучием поголовья скота осуществляют на основании показателей послеубойной экспертизы на мясокомбинатах; данных экспертизы при внутрихозяйственном убое животных, вскрытиях трупов животных; результатов плановых серологических и гематологических исследований на лейкоз; результатов контрольного убоя животных с повышенным уровнем лимфоцитов в крови и патоморфологических исследований биоматериалов.

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ЛАБОРАТОРНЫХ РАБОТ

2.1 Лабораторная работа №1 (2 часа).

Тема: «Правила работы с вирусами. Устройство вирусологической лаборатории»

2.1.1 Цель работы: ознакомиться с планировкой и оборудованием вирусологической лаборатории, её документацией, правилами и техникой безопасности при работе с вирусосодержащим материалом

2.1.2 Задачи работы:

1. Зарисовать план вирусологической лаборатории.
2. Записать правила работы с вирусами
3. Организовать рабочее место.

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 вирусосодержащим материалом

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 (моечная, 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 инаktivацией использованного материала, должны осуществляться только в вирусологическом отделе.

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

В вирусологических лабораториях установлен специальный режим.

1. Все работы с вирусами, вирусосодержащим 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 вирусодержащего 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 с наружи 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, интранозальной заражение животных

4. Дезинфекция посуды и спецодежды

5. Несчастный случай, авария

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «Правила отбора патологического материала от больных животных и трупов. Подготовка патологического материала к исследованию»

2.2.1 Цель работы: ознакомиться с правилами и техникой взятия, упаковки и транспортировки, сохранения и подготовки вирусосодержащего материала для заражения лабораторных животных, куриных эмбрионов, культуры клеток

2.2.2 Задачи работы:

1. Подготовить 10% вирусосодержащую суспензию из патологического материала
2. Поставить бактериологический контроль вирусосодержащей суспензии.
3. Ознакомиться с ведением журналов в лаборатории.

2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Журналы учета зараженных животных; Журнал учета выделенных вирусов и их уничтожения; Журнал движения производственных штаммов; Журнал учета движения производственных или музейных штаммов и др. книги учета.

2. Пенициллиновые 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 пенициллиновые флаконы, стерильные резиновые пробки, пинцеты, спиртовки, центрифуга, бумажные фильтры,

3. Таблица по теме.

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 вирусосодержащего 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 уоя. 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 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 оспе - 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 пенициллиновые 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 недели 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.

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 антибиотками 30-60 мин при комнатной температуре.

2) фильтруя через бактериальные фильтры.

После освобождения от бактериальной микрофлоры ставят 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 положительном результате бак.контроля – рост колоний на питательных средах – обработку антибиотиками повторяют и снова ставят бак.контроль. На время постановки бак.контроля ВСС хранят в холодильнике.

Учет, хранение и транспортировка вирусов.

Для всех вирусологических лабораторий установлен единый порядок обращения с вирусами, предусматривающий правила хранения, регистрации, передачи внутри лаборатории и за её пределы.

ВСМ должен быть снабжен этикеткой с указанием вируса, штамма, дата получения, номер пассажа, объем и другие сведения. Данные этикеток должны совпадать с записями в журнале. В лаборатории ведется журнал вирусологических экспертиз;

Журнал учета зараженных животных;

Журнал учета выделенных вирусов и их уничтожения;

Журнал движения производственных штаммов;

Журнал учета движения производственных или музейных штаммов и др. книги учета.

Штаммы вирусов хранятся в холодильнике под замком с пломбой и печатью. Штаммы должны храниться в условиях обеспечивающих их максимально длительную жизнеспособность.

Для вирусологических лабораторий предусмотрен единый порядок обращения с вирусами, предусматривающий правила их хранения, регистрации, передачи внутри лаборатории и за её пределами.

Вирусосодержащие материалы (ВСМ) в пробирках, флаконах и других сосудах должны быть непременно снабжены этикеткой, на которой указаны вирус, штамм, дата

получения, номер пассажа, объем и другие сведения. Данные этикеток должны полностью совпадать с записями в журнале штаммов лаборатории. Штаммы хранят в холодильнике под замком с пломбой или печатью.

При транспортировке все необходимо как можно быстрее поместить его в условия, обеспечивающие замедление процессов инактивации вируса. Такие условия обеспечивают низкие температуры (используют охлаждающие смеси) или консервирующие вещества. Выбор метода консервирования обусловлен видом патологического материала, методом его исследования, длительностью транспортировки.

2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

Тема: «Методы диагностики вирусных болезней»

2.3.1 Цель работы: ознакомиться с порядком и методами проведения диагностических исследований при вирусных заболеваниях

2.3.2 Задачи работы:

1. Ознакомиться с экспресс методами диагностики вирусных болезней, их значением.

2. Рассмотреть методику выделения вируса в чувствительных биосистемах и его идентификации.

3. Изучить принцип ретроспективной диагностики и её особенности.

2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Аппарат Такачи
2. Аппарат Флоринского
3. ПЦР - лаборатория

2.3.4 Описание (ход) работы:

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 раскрытого 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).

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 (рН 7,2...7,4), затем освобождают ее от крупных частиц путем центрифугирования в течение 20...30 мин при оборотах 2000...3000 мин⁻¹. Для подавления бактериальной микро- и 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.

Большое значение имеет другая биологическая система для выделения вирусов – живые куриные эмбрионы 5...13-суточного возраста. Вирусы в них могут репродуцироваться 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 °C 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 и 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.

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.

2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).

Тема: «Индикация вирусов в патологическом материале путем обнаружения телец-включений»

2.4.1 Цель работы: ознакомиться с техникой приготовления и способами окрашивания мазков, препаратов-отпечатков и гистосрезов для выявления внутриклеточных включений.

2.4.2 Задачи работы:

1. Изучить характеристику телец-включений и элементарных телец, методику приготовления и окраски препаратов
2. Приготовить мазки и отпечатки из различных органов
3. Провести окраску препаратов по Селлерсу
4. Провести микроскопию готовых препаратов на обнаружение телец Бабеша-Негри.

2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Микроскопы (соответственно количеству студентов).
2. Демонстрационные препараты с включениями Бабеша-Негри.
3. Предметные стекла.
4. Патологический материал.

5. Пастеровские пипетки.

6. Реактивы для окрашивания по Романовскому, Селлерсу.

2.4.4 Описание (ход) работы:

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 округлой, 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
2. скоплением неструктурных вирусных белков в цитоплазме и ядре
3. скоплением деструктивного клеточного материала

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.

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 оксифильными 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 реактивом до появления темно-коричневой окраски мазка, тщательно промывают водой, высушивают. Рассматривают с иммерсионной системой.

Окраска по Селлерсу

Окраска по Романовскому

2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

Тема: «Действие на вирусы физических и химических факторов»

2.5.1 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.

2.5.2 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

2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Автоклавы, сухожаровые шкафы.
2. Пробирки с вирусосодержащим патологическим материалом, колбы с вирусосодержащим материалом, контейнеры с инструментами.
3. Раствор 2% KOH, 3 % H₂SO₄.

2.5.4 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, аденовирусы, 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 pH. Есть вирусы, устойчивые к кислым значениям pH (2,2-3,0), например, вирусы, вызывающие кишечные инфекции и проникающие в организм алиментарным путем. Однако большинство вирусов инактивируется при кислых и щелочных значениях pH.

Физические и химические факторы воздействуя 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;
- мочевины и гуанидин, которые вызывают главным образом разрыв водородных связей;
- высокие и низкие значения pH.

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 приводит к отделению белковых субъединиц различной степени агрегации. Но если белковые фрагменты смешать при pH 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 pH. Скорее всего это связано с его взаимодействием с аминок группами 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 °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°C, а вирус желтухи астр при температуре 32°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 продуцироваться 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 солевых растворах инактивируются быстрее, чем неочищенные препараты

2.6 Лабораторная работа №6 (2 часа).

Тема: «Лабораторные животные их использование 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, интрацеребрально, интерперитонеально.
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. Пенициллиновые 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 разгрызания животным кожи и мышечных тканей и гибели, то это свидетельствует о заражении вирусом Ауески.

Полученный от зараженного животного вирусосодержащий 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) инфекций.

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, репродуцирующиеся в нервных клетках, называются нейротропными (вирус бешенства), в клетках кожи - дермотропными (вирус оспы), в клетках легких - пневмотропными (вирус гриппа). Вирусы репродуцирующиеся 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).

Вирусосодержащий 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), внутрикожное (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 вирусологии»

2.7.1 Цель работы: изучить строение куриного эмбриона, ознакомиться с методами заражения их вирусосодержащим 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. Вирусосодержащий 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: экстремелией, 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 мочеислые соли, фосфорные и азотистые соединения. Заражают на 9 - 12 день инкубации.

Хориоаллантаисная 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 вирусосодержащего 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 длинной 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).

Заражение 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 вирусосодержащего материала, поэтому вирусы, выделенные заражением в амнион, обычно пассируют 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, суспензия из шприца свободно вводится в яйцо. Иглу извлекают, место отверстия протирают раствором йода, отверстия запечатывают смесью парафина с вазелином или коллодием. 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.

Заражение на хорионаллантоисную оболочку. Первый метод используется для выделения и культивирования вирусов, образующих на оболочке бляшки или оспины (вирусы оспы, инфекционного ларинготрахеита птиц и др.), а также для титрования этих агентов, так как число инфицированных частиц можно рассчитать по количеству бляшек или оспин. 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 нанесения 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 зубо-врачебным 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 скорлупную 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 мембраны. 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 скорлупную оболочку и по этой капле осторожно проводят иглой с загнутым острием в направлении, параллельном поверхности яйца, это делается для того, чтобы, поцарапав под скорлупную 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 лейкопластыря или закрывают покровным стеклом или другим прозрачным материалом. Яйца после заражения инкубируют в горизонтальном положении, не переворачивая.

Вирius 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: «Использование культур клеток в вирусологии»

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 толщиной 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 удастся сделать из эмбриональных органов. Чаще всего используют почки, легкие, кожу, тимус, тестикулы 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 контаминантов.

Из первичных культур клеток можно получить субкультуры путем снятия со стекла раствором версена и ресуспендирования 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 неопределенно 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 обезьян, 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 °С) 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 °С 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 (капельно-плазменные, 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, амниона 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, аминокептид 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^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , 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 обязательно 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 глутамину, 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 аденозиндифосфорной кислоты (АДФ), аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ) и др.

Приготовление растворов для культур клеток требует соблюдения ряда условий: чистоты химических веществ, последовательности растворов 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 бидистиллированной воде. Они обеспечивают сохранение рН, 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 рН, 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 пробирки: 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 °С, 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 пенициллиновых флаконах. Заражают культуру клеток и через определенное время инкубации стекло вынимают, промывают в теплом растворе Хенкса, просушивают фильтровальной бумагой и фиксируют в раствора 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 гематоксилин-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 гематоксилин-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: «РГА и РТГА их использование в вирусологии»

2.10.1 Цель работы: ознакомить студентов с сущностью и методикой постановки РГА и идентификации вируса в РТГА

2.10.2 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.

2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

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

2.10.4 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, ньюкасская болезнь, грипп птиц др.). Ряд вирусов обнаружили с помощью данных методов.

Компоненты: РГА

Исследуемый вируссодержащий материал (экстраэмбриональная жидкость, суспензии хорион-аллантоисных оболочек и тканей куриных эмбрионов, экстракты 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 гемагглютинирующей 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 ВСМ	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
ВСМ										

	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
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 агглютинированно вирусом и на дне отчетливый «зонтик», но в центре незначительное количество неагглютинированных эритроцитов.

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

- - все эритроциты не агглютинированны 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 вирусосодержащего 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, вирусосодержащий материал (рабочая доза вируса в титре 4 ГАЕ), взвесь эритроцитов 0,5 - 1%.

Подготовка сыворотки.

В сыворотках содержатся 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 двукратные 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.

2.11 Лабораторная работа №11 (2 часа).

Тема: «РДП в геле, применение в вирусологии»

2.11.1 Цель работы: изучить сущность и технику постановки реакции диффузионной преципитации.

2.11.2 Задачи работы:

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

2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Диагностический набор для постановки РДП
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.

2.11.4 Описание (ход) работы:

Реакция диффузией 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 диффузионной 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, рН 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 рН 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 контролю №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 °С, 18-25°, 37-38 °С на 24-72 ч (в зависимости от вида вируса). Реакцию оценивают визуально в косопрходящем 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°) набирают нужное количество (3-4 мл) расплавленного (50-60°) 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 °С).

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 пластинки, 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.

2.12 Лабораторная работа №12 (2 часа).

Тема: «РИФ, её применение в вирусологии»

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

2.12.2 Задачи работы:

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

2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Таблицы по теме занятия

2.12.4 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 облучения 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 флуоресцирующих 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 антиметаболических 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 флуоресцирующих 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 флуоресцирующее антитело фиксируется на нем. В люминесцентном микроскопе комплекс антиген-флуоресцирующее антитело излучает свечение, цвет которого зависит от вида флюорохрома.

Комплекс антител с флюорохромом называется конъюгатом.

Задачи, решаемые с помощью иммунофлуоресценции:

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 иммунофлуоресценции:

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

Не должно быть иммунофлуоресценции при окрашивании нормальной конъюгированной сывороткой.

Флуоресценция должна блокироваться в результате предварительного применения специфической немеченой сывороткой (специфическая ингибция 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. Флуорохромами, применяемыми в основном для приготовления конъюгатов 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. Конъюгирование флуорохрома 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 конъюгирования, конъюгат необходимо очистить от непрореагировавших компонентов, органических растворителей и солей буферных растворов пропусканием его через активированный уголь, сефадекс или ионообменные смолы. Хранить конъюгат 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 конъюгат на 10 - 60 минут и помещают во влажную камеру при 37°C. Отмыть физиологическим раствором от непрореагировавшего конъюгата. Подсушить. Нанести нефлуоресцирующее иммерсионное масло и исследовать под люминесцентным микроскопом.

С целью уменьшения неспецифической флюоресценции препарат обрабатывают смесью конъюгатов - конъюгат - ФИТЦ со специфическими антителами и конъюгат РСХ с альбумином. Конъюгат ФИТЦ реагирует с антигеном, а конъюгат РСХ с тканевым белком. Правильно подобранная смесь конъюгатов должна обеспечивать изумрудно-зеленое специфическое свечение внутриклеточно-расположенных вирусов, четко контрастирующее на фоне оранжево-красной или желто-оранжевой флюоресценции окружающих клеток и прочих гетерогенных частиц.

Непрямой метод флюоресцирующих антител

Процесс выявления вирусного антигена проходит в два этапа.

I этап - обработка препарата гомологичным нефлуоресцирующими 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 продуцентами 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 иммунофлуоресценции:

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

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

в) флуоресценция должна блокироваться в результате предварительного применения наметенной специфической иммунной сыворотки (специфическая ингибция). Чаще бывает сильное ослабление свечения;

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

Задание №1

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

2.13 Лабораторная работа №13 (2 часа).

Тема: «Молекулярно-генетические методы в вирусологии»

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

2.13.2 Задачи работы:

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

2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Оборудование ПЦР лаборатории.

2. Набор для ПЦР

2.13.4 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 осуществляет фермент термостабильная ДНК-полимераза, называемая Taq-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 ампликонов 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 нуклеиновых кислот.

Компоненты ПЦР:

- 1) фермент Taq - 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 дезоксирибонуклеотидтрифосфатов: дАТФ, дТТФ, дГТФ, дЦТФ - содержание их должно быть в равном соотношении;
- 4) копируемая ДНК;
- 5) ионы Mg^{+} необходимы для функционирования фермента Taq - ДНК-полимераза;
- 6) буфер - обеспечивает оптимальные условия для работы фермента;

7) минеральное масло наслаивают 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 °С), при этом две цепи ДНК расходятся. Затем проба инкубируется при температуре гибридизации праймеров с ДНК-матрицей (55-65 °С) и на последнем этапе ДНК-полимераза осуществляет комплементарное достраивание нитей ДНК- матрицы с помощью дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (72°С). 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, высушенных или фиксированных препаратов. Подготовка пробы материала (выделение ДНК и РНК) должна проводиться 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 необъятные возможности для молекулярной биологии и геной инженерии.

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

2.104 Лабораторная работа №14 (2 часа).

Тема: «Лабораторная диагностика бешенства»

2.14. 1 Цель работы: ознакомится с лабораторными методами диагностики бешенства

2.14.2 Задачи работы:

1. Изучить правила взятия, транспортировки патологического материала для лабораторной диагностики бешенства

2. Приготовить препараты для обнаружения телец Бабеша-Негри

3. Отработать методику приготовления материал для постановки биопробы

4. Отработать методику заражения белых мышей интрацеребрально и подкожно

2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:

1. Микроскопы (соответственно количеству студентов),

2. Демонстрационные препараты с включениями Бабеша-Негри, предметные стекла, патологический материал, пастеровские пипетки, реактивы для окрашивания по Романовскому, Селлерсу,

3. Белые мыши,

4. Мозговая ткань
5. Оборудование для приготовления вирусосодержащей суспензии и инструменты для заражения (набор инструментов для вскрытия черепной коробки)
6. Дезинфицирующий раствор.

2.14. 4 Описание (ход) работы:

Диагностику бешенства проводят на основании комплекса эпизоотологических, клинических, патологоанатомических и лабораторных методов исследований. Учитывая, опасность болезни окончательный диагноз может быть поставлен только лабораторными методами, результаты которых служат основным критерием диагностики. Для проведения лабораторных исследований существует ГОСТ. Согласно которому для лабораторных исследований в качестве патматериала в лабораторию направляют трупы мелких животных целиком, а от крупных голову с двумя первыми шейными позвонками. К патологическому материалу прилагается сопроводительный документ. Все лабораторные исследования включают обнаружение антигена, телец включений, выделение вируса на белых мышах и идентификации выделенного вируса.

Для обнаружения антигена вируса бешенства в исследуемом материале необходимо приготовить не менее двух мазков-отпечатков из каждого отдела мозга. Один мазок используют для постановки РИФ, а другой для определения специфичности РИФ (подавление РИФ).

Метод иммунофлюоресценции

Сущность метода заключается в соединении меченых антител со специфическим антигеном и наблюдении светящихся комплексов «антиген-антитело» в полях зрения люминисцентного микроскопа. На препарат наносят антирабический флюоресцирующий гамма-глобулин, выдерживают для взаимодействия с целью образования комплекса АГ-АТ, промывают для удаления несвязавшихся антител. Просушивают мазок и просматривают в люминисцентный микроскоп с использованием эмирсионной системы. Положительным результатом является обнаружение в мазках специфических гранул светящихся ярко-зеленым цветом.

Метод подавления иммунофлюоресценции.

Сущность метода заключается в способности рабического антигена, связанного с нефлюоресцирующими антителами, вторично не входить в соединение с флуоресцирующим специфическим конъюгатом. При постановке данного метода на препарат наносят антирабический гамма-глобулин выдерживают для образования комплекса, а затем наносят антирабический флюоресцирующий гамма-глобулин, выдерживают, промывают для удаления несвязавшихся антител. Если при микроскопировании препарата свечение наблюдается не будет, то это свидетельствует о наличии в патологическом материале антигена вируса бешенства. При наличии свечения, это говорит о неспецифичности реакции иммунофлюоресценции.

Реакция диффузной преципитации.

Сущность метода заключается в свойстве антител-преципитинов и гомологичных им антигенов диффундировать в агаровом геле и при соединении образовывать видимые визуально линии преципитатов-комплексов «антиген-антитело». В лунки в качестве антигена используют мозговую ткань взятую из каждого отдела мозга у крупных животных, а у мелких из всего мозга. Мозговую ткань растирают до пастообразной консистенции и вносят в лунки, в качестве антител используют антирабический иммуноглобулин. Реакцию помещают в термостат при температуре 37 °С при условии влажной камеры. Положительным результатом считают наличие линии преципитации различной степени интенсивности между лункой с исследуемым а.

Метод выявления телец Бабеша-Негри

Сущность метода заключается в выявлении в клетках нервной ткани специфических цитоплазматических включений - телец Бабеша-Негри. Для постановки

этого метода из каждого отдела головного мозга готовят мазки - отпечатки, окрашивают по Селлерсу, и проводят микроскопию.

Метод выявления телец Бабеша-Негри является вспомогательным и имеет диагностическое значение только при обнаружении типичных, специфических включений.

Метод биологической пробы

Сущность метода заключается в выделении вируса от больных убитых или павших животных путем инокуляции патологического материала белым мышам и последующей его идентификации. Мышей заражают суспензией полученной из всех отделов мозга подкожно и интрацеребрально. Характерными признаками являются изменение поведения, взъерошенность шерсти, нарушение координации движения, гибель уже на 6-10 день. Срок наблюдения 30 дней.

Метод специфической биологической пробы

Сущность метода заключается в том, что мыши, зараженные мозговой тканью больных бешенством животных, заболевают бешенством, а зараженные тканью, предварительно обработанной антирабической сывороткой (иммуноглобулином), не заболевают.