

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО 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 подготовки: Ветеринарно-санитарная экспертиза

Форма обучения: заочная

СОДЕРЖАНИЕ

1. Конспект лекций.....	3
1.1 Лекция № 1 Физическая структура и химический состав вирусов.....	3
1.2 Лекция № 2 Репродукция вирусов.....	5
1.3 Лекция № 3 Особенности противовирусного иммунитета.....	11
2 Методические указания по выполнению лабораторных работ.....	16
2.1. Лабораторная работа № 1 Правила работы с вирусами. Устройство вирусологической лаборатории.....	16
2.2. Лабораторная работа № 2 Методы диагностики вирусных болезней.....	17
2.3 Лабораторная работа № 3 Индикация вирусов в патологическом материале путем обнаружения телец-включений.....	20
3. Методические указания по выполнению практических занятий.....	23
3.1 Практическое занятие № 1 Лабораторная диагностика бешенства.....	23

1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

1. 1 Лекция № 1. (2 часа).

Тема: «Физическая структура и химический состав вирусов»

1.1.1 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.

1.1.2 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. 2 Лекция № 2 (2 часа).

Тема: «Репродукция вирусов»

1.2.1 Вопросы лекции:

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

1.2.2 Краткое содержание вопросов:

1. 1 этап репродукции вирусов – начало инфекции:
 - а) адсорбция вируса на клетке
 - б) проникновение вируса в клетку
 - в) раздевание или депротенинизация 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). Покрытые 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, ретровирусов, возбудителей медленных инфекций и др. Этот тип слияния вызывают те же вирусные гликопротеиды, которые обеспечивают проникновение вируса в клетку.

Раздевание вируса. Проникшие в клетку вирусные частицы должны раздеться, чтобы вызвать инфекционный процесс. Раздевание заключается в удалении защитных оболочек. Конечными продуктами раздевания могут быть сердцевины, нуклеокапсиды, нуклеиновые кислоты. Эти продукты для разных вирусов могут быть разными. Например, конечным продуктом раздевания пикорнавирусов является РНК, ковалентно связанная с белком VP_g, конечным продуктом раздевания 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 разведении. Разведение вирусной частицы осуществляется постепенно в результате серии последовательных реакций. Например, в процессе разведения пикорнавирусы проходят ряд стадий с образованием промежуточных субвирусных частиц с размерами от 156 S до 12 S. Разведение вирусов ЕСНО имеет следующие стадии: вирионы (156 S) А-частицы (130 S) РНП и пустые капсиды (80 S) РНК с терминальным белком (12 S). Разведение 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 разведения теряет наружные белки и превращается в субвирусную частицу с коэффициентом седиментации 48 S. Затем частицы связываются с ядерными белками (гистонами) и формируется комплекс (с коэффициентом седиментации 190 S), способный вызвать инфекционный процесс. Вирус гриппа вначале теряет липопротеидную оболочку и превращается в субвирусную частицу, из которой после удаления М-белка освобождается нуклеокапсид.

2. Второй этап репродукции - экспрессия вирусного генома: 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 нуклеотидами или кодоном). Генетический код вырожден, то есть каждая аминокислота (кроме триптофана и метионина) кодируется более чем одним кодоном. Генетический код универсален для всей живой природы (лев и одуванчик используют одни и те же кодоны для соответствующих аминокислотных остатков). Процесс трансляции состоит из 3 фаз: 1) инициации, 2) элонгации, 3) терминации. Инициация трансляции – это процесс, основанный на узнавании рибосомой иРНК и связывании с её особым участком. Рибосома узнает иРНК благодаря «шапочке» на 5' конце и скользит к 3' концу. Трансляция иРНК начинается с инициаторного кодона АУГ, (или ГУГ, кодирующего метионин) расположенного на 5' конце, а заканчивается терминирующим кодоном. С метионина начинается синтез всех полипептидных цепей. Элонгация – это процесс удлинения полипептидной цепи, основанный на присоединении новых аминокислот

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.

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- и РНК - 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 одонитевую 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 осуществляется 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 противовирусного 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 ингибции сплайсинга за счет содержащихся в геноме нуклеотидных остатков, усиливающих сплайсинг.

Вирусные ферменты в зараженной клетке способны блокировать инициацию трансляции. Ингибция происходит за счет расщепления фактора инициации трансляции вирусной протеазой. Подобная ингибция 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 гепресвирусов – это ядерная мембрана).

Выход вирусов из клетки.

Существуют 2 способа выхода вирусного потомства из клетки.

1) Путем «лизиса» (взрыва)- при этом способе нарушается целостность клетки, в результате чего вирионы оказываются в окружающей среде. Такой способ характерен для простоорганизованных вирусов (пикорнавирусы, реовирусы, парвовирусы, 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. 3 Лекция №3 (2 часа).

Тема: «Особенности противовирусного иммунитета»

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Понятие «иммунитет», «вирусный антиген», виды иммунитета.
2. Неспецифические факторы противовирусного иммунитета: температура, ингибиторы, комплемент, интерферон, гормоны.
3. Специфические факторы противовирусного иммунитета: а) клеточный иммунитет, б) гуморальный иммунитет.
4. Иммунопатология при вирусных болезнях животных.

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Понятие «иммунитет», «вирусный антиген», виды иммунитета.

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. Признаком, 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. Неспецифические факторы противовирусного иммунитета: температура, ингибиторы, комплемент, интерферон, гормон

Неспецифические факторы резистентности – обеспечиваются неспецифическими ингибиторами, способными нейтрализовывать 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. Специфические факторы противовирусного иммунитета: а) клеточный иммунитет, б) гуморальный иммунитет

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.

4. Иммунопатология при вирусных болезнях животных.

При многих инфекционных заболеваниях возбудитель не является «объектом внимания» иммунитета, а лишь индуцирует защитные механизмы против зараженной клетки-хозяина. Это обстоятельство уже является опасным с точки зрения возможного повреждения жизненно важных тканей и органов, инфицированных вирусом, за счёт механизмов, призванных выполнять совершенно противоположные функции.

Взаимодействие вируса с иммунной системой представляет собой цепь механизмов и реакций, которая ведет к выработке иммунитета или сопровождается (рядом нежелательных «незащитных» иммунологических феноменов.) формированием иммунопатологий.

Иммунопатология включает заболевания, в основе которых лежат нарушения в системе иммунитета. Различают 3 основных вида иммунопатологии:

1. заболевания, обусловленные угнетением реакций иммунитета (иммунодефициты);
2. заболевания, зависящие от гиперреактивности системы иммунитета (аллергия и аутоиммунные заболевания).
3. болезни с нарушением пролиферации клеток СИ.

Вирусы имеют свои стратегии обхода иммунологического контроля. Вирусы со своей стороны обладают разнообразными свойствами защиты от распознавания антителами.

Наиболее эффективно этому служит смена антигенов: в вирусных белках, которые обычно становятся мишенями для антител, происходит изменение иммунодоминантных областей.

Некоторые вирусы способны противодействовать эффекту интерферонов: они продуцируют короткие отрезки РНК, которые конкурируют за протеинкиназу и каким-то образом подавляют активацию этого фермента. Ряд вирусов кодирует белки, ингибирующие перенос молекул МНС класса I на плазматическую мембрану клетки. Это дает вирусу преимущество, помогая избежать распознавания цитотоксическими Т-клетками. Отдельные вирусы обладают генами белков, гомологичных цитокиновым рецепторам или даже самим цитокинам.

Иммунный ответ при вирусных инфекциях может повреждать ткани. Эти повреждения могут быть связаны с образованием иммунных комплексов:

При выведении иммунных комплексов из организма на повреждающее действие влияет их размер. Иммунные комплексы с низкой молекулярной массой обычно легко выводятся из организма через почки без предварительной переработки фагоцитами, хотя могут длительно циркулировать в крови и откладываться на эндотелии сосудов вызывая дистрофические процессы. Крупные иммунные комплексы сравнительно мало патогенны, в норме они быстро фагоцитируются и элиминируются. Однако иногда процесс фагоцитоза иммунных комплексов приводит к выбросу из фагоцитирующих клеток пептид-гидролаз, повреждающих ткани. Наиболее патогенными являются комплексы среднего размера, которые формируются при некотором избытке антигена. При высокой концентрации они запускают цепь последовательных иммунопатологических процессов: агрегация тромбоцитов; образование микротромбов в капиллярах; привлечение и активация фагоцитов; выброс пептид-гидролаз, гистамина, цитокинов, простогландинов, лейкотриенов и других биологически активных веществ гранулоцитами и моноцитами/макрофагами.

Связывание вирусов антителами, лишенными нейтрализующей активности, иногда имеет еще одно необычное патологическое следствие: эти иммунные комплексы в результате взаимодействия с Fc-рецептором поглощаются макрофагами, в которых инфекционность вируса усиливается. Это можно наблюдать при инфекции, вызванной вирусом денге. С Fc-рецепторными взаимодействиями иммунных комплексов, вызывающими гиперактивацию системы комплемента, связан также патогенез геморрагической лихорадки и шокового синдрома денге.

Некоторые вирусные инфекции вызывают повреждение тканей и последующую воспалительную реакцию, в результате которой начинают экспонироваться ранее «скрытые» собственные антигены; они могут пройти процессинг и быть презентированы клеткам иммунной системы.

Иммунная система распознает как «чужое» аминокислотную последовательность вирусного белка, который гомологичен одному из белков организма-хозяина. В результате происходит срыв иммунологической толерантности к собственным скрытым антигенам и последующая атака иммунной системы против тканей хозяина.

Вирусы способны инфицировать клетки иммунной системы. Некоторые вирусы непосредственно инфицируют лимфоциты и макрофаги, вызывая патогенный эффект. Кроме того, иммунокомпетентные клетки служат для вирусов благоприятным местом персистенции. Вирусы в неинфекционной форме локализуются в покоящихся лейкоцитах, активация которых может вызвать и реактивацию вирусов с репликацией инфекционных вирионов.

Вирусы способны вызывать пролиферативные процессы (оказывать действие на лимфоидные ткани). Действие может проявляться: разрушением лимфоидных тканей; стимуляцией лимфоидных тканей к необычному росту; образование опухолей.

Вирусы способны подавлять функции иммунной системы - иммуносупрессия.

Основной и очевидный путь подавления функции иммунной системы у вируса - это его репликация в клетках, отвечающих за эти функции

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 (мочная, 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 предбоксы 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 вирусосодержащего 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, интраназальной заражение животных

4. Дезинфекция посуды и спецодежды

5. Несчастный случай, авария

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «Методы диагностики вирусных инфекций»

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

2.2.2 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.

2.2.3 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.

2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).

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

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

2.3.2 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.

2.3.3 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.

2.3.4 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

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

3.1. Практическое занятие № 1 (2 часа).

Тема: «Лабораторная диагностика бешенства»

3.3.1 Задание для работы:

1. Изучить правила взятия, транспортировки патологического материала для лабораторной диагностики бешенства
2. Приготовить препараты для обнаружения теляц Бабеша-Негри
3. Отработать методику приготовления материал для постановки биопробы
4. Отработать методику заражения белых мышей интрацеребрально и подкожно

3.3.2 Краткое описание проводимого занятия:

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, теляц 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 имирсионной 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 материалом и антирабической сывороткой

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.

- 1. Выполнить приготовление мазков и отпечатков из мозговой ткани**
- 2. Выполнить приготовление 10 % суспензии из мозговой ткани.**