

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

Б3.В.ОД.4 Вирусология

**Направление подготовки (специальность) 111900.62. Ветеринарно-санитарная
экспертиза**

Профиль подготовки (специализация) 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 Иммунитет и профилактика при вирусных болезнях	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 Лабораторная диагностика	20
3.	Методические указания по выполнению практических занятий	23
2.15	Практическое занятие № 1 Лабораторная диагностика лейкоза.	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 однонитчатыми, так и двунитчатыми молекулами РНК и ДНК. ДНК может быть как линейной, так и кольцевой молекулой, РНК – как непрерывной, так и фрагментированной и кольцевой молекулой.

Вирусные ДНК.

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

Вирусные РНК

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

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

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

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

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

В зараженной клетке вирусный геном кодирует синтез двух групп белков:

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

Стабильное связывание происходит вследствие свободного перемещения рецепторов в липидном бислой 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 втячивается

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

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

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

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

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

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

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

«Слияние снаружи» происходит при высокой множественности инфекции и обнаруживается в течение первых часов после заражения. Такой тип слияния описан для парамиксовирусов, обусловлен белками заражающего вируса и не требует внутриклеточного синтеза вирусных компонентов. «Слияние изнутри» происходит при низкой множественности инфекции, обнаруживается на сравнительно поздних стадиях инфекционного процесса и обусловлено вновь синтезированными вирусными белками. «Слияние изнутри» описано для многих вирусов: вирусов герпеса, 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 адено-вирусов, вируса полиомы и SV40 является ДНК, ковалентно связанная с одним из внутренних вирусных белков.

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

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

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

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

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

2. Второй этап репродукции - экспрессия вирусного генома: 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 РНК к белку.

ДНК → РНК → белок.

В хранении и передаче информации участвуют 3 основных процесса:

репликация – копирование ДНК с образованием идентичных дочерних молекул;

транскрипция – процесс переписывания генетической информации с ДНК на РНК с последующим переносом её к рибосомам;

трансляция – процесс перевода информации в специфическую аминокислотную последовательность белка.

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

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

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

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

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

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

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

Особенности репродукции ДНК-содержащих вирусов репродуцирующихся в ядре и в цитоплазме

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

Экспрессия генома для вирусов этих семейств осуществляется по следующей схеме:

ДНК – иРНК - белок

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

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

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

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

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, буньиавирусов, 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 однонитевую ДНК. Далее идет построение комплементарной ДНК нити. Образованная 2-нитевая ДНК объединяется (интегрирует) с геномом хозяина. Последующая экспрессия не обязательна. Если экспрессия происходит, то интегрированная ДНК (иДНК) – транскрибируется транскриптазой клетки хозяина. Образуются матричные РНК разной длины, они транслируются с образованием полипротеинов. Полипротеины расщепляются на отдельные вирусные белки. В состав вирионов входят транскрипты, содержащие весь геном.

РНК – ДНК – иРНК - белок

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

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

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

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

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

Во-первых, некоторые вирусы могут ингибировать активность одного из основных факторов инициации транскрипции (TFIID), происходит это за счет протеазной активности вирусных белков, которые расщепляют одну из субъединиц фактора TFIID. Такой механизм использует полиовирус, а вирус везикулярного стоматита оказывает опосредованное действие, на клеточные факторы ингибиции транскрипции. Кроме того, вирусные белки способны ингибировать транспорт клеточных мРНК в цитоплазму, снижать активность клеточных РНК-полимераз.

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

Для вирусов гриппа характерен сплайсинг.

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

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

Сборка вирусных частиц.

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

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

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

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

Выход вирусов из клетки.

Существуют 2 способа выхода вирусного потомства из клетки.

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

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

1. 3 Лекция №3 (2 часа).

Тема: «Иммунитет и профилактика при вирусных болезнях»

1.3.1 Вопросы лекции:

1. Факторы неспецифической защиты организма животных.
2. Факторы специфического иммунитета: гуморальные и клеточные.
3. Характеристика вакцин живых и инактивированных.
4. Характеристика сплит-вакцин.

1.3.2 Краткое содержание вопросов:

1. Факторы неспецифической защиты организма животных.

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 сенсибилизации.

Неспецифические ингибиторы. Клетки организма способны вырабатывать особые вирусопротивные вещества - ингибиторы, способные взаимодействовать с вирусами подавляя их активность. Сывороточные ингибиторы разделяют на : термолабильные (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.

2. Факторы специфического иммунитета: гуморальные и клеточные.

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 сенсибилизованные лимфоциты.

Иммунные механизмы обеспечивают: 1) гуморальные факторы; 2) клеточные факторы. Как известно, вирусы для макроорганизма представляют собой чрезвычайные раздражители, т. е. антигены. Антигенныесть 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.

3. Характеристика вакцин живых и инактивированных.

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.

Антigenности 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 антидиотипических 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 мало- и 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 инактивированными. 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.

В инактивированной вакцине вирусный геном должен быть переведен в инактивную форму или разрушен. Остаточная инфекционность инактивированных вакцин даже при химической или физической инактивации 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 инактивированных 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, гельфильтрацией, дифференциальным центрифугированием. Поскольку инактивированные 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 инактивированной вакцины является выбор инактиватора и условий инактивации которые позволяют максимально сохранить антигенные свойства вакцины.

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

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

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

Основным недостатком инактивированных 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 инактивированной вакцины с определенной периодичностью, что может приводить с течением времени к аллергизации организма. При инактивации вируса часть антигенов может полностью или частично разрушаться, что также снижает качество вакцины.

4. Характеристика сплит-вакцин.

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 реагенны, 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 (эпипептидам). Микробную клетку можно заставить синтезировать субъединичную или молекулярную вакцину.

Принцип создания генно-инженерных вакцин заключается 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 встроенного 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 адьювантов и иммуностимуляторов.

При выборе вакцины врач должен руководствоваться: 1) технологией ведения животноводства; 2) эпизоотологической характеристикой хозяйства; 3) длительностью и напряженностью постvakцинального иммунитета; 4) практическим удобством применения вакцин; %0 возможностью обеспечить механизм в иммуногенезе при использовании живых и инактивированных вакцин.

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 вируссодержащим 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 вируссодержащим 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 (моющая, биохимическая лаборатория, дезинфекционная), отдел культивирования клеток и тканей, помещение для работы с РЭК, виварий, боксы для работы с вирусами, помещения для идентификации вирусов (серологические лаборатории), помещение для приема патологического материала. Лаборатория должна быть изолирована от других лабораторий и вспомогательных отделов.

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

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

В вирусологических лабораториях установлен специальный режим.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10. Источники внутри лабораторных заражений:

1. Клинические пробы

2. Работа с инфицированными животными

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

4. Дезинфекция посуды и спецодежды

5. Несчастный случай, авария

2.2 Лабораторная работа №2 (2 часа).

Тема: «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 раскрытоого зонтика.

Тельца-включения и элементарные тельца вирусов указывают на присутствие вирусов в патологическом материале. Тельца-включения – это внутриклеточные элементы, образующиеся в клетках как результат размножения 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 центрифugирования 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 холода (18...20 ч при температуре 2...-4 °C).

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

Вирусы являются антигенами, так как их белковая оболочка вызывает выработку специфических антител. Антитела накапливаются в основном в сыворотке крови. Они способны соединяться в комплекс антиген + антитело только со своим антигеном. Если

антigen – 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) иммунофлюoresценции (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: « Вирусы бешенства. Лабораторная диагностика бешенства

2.3. 1 Цель работы: ознакомится с лабораторными методами диагностики бешенства

2.3.2 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 материала для постановки биопробы

4. Отработать методику заражения белых мышей интракраниально и подкожно

2.3.3 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 вируссодержащей 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 иммунционной 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 флюоресцирующим 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 наличие в патологическом материале антигена вируса бешенства. При наличие 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 °C 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.

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ

3.1.Практическое занятие № 1 (2 часа).

Тема: «Лабораторная диагностика лейкоза»

3.3.1 Задание для работы:

1. Характеристика возбудителя лейкоза крупного рогатого скота.
2. Методы лабораторной диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

3.3.2 Краткое описание проводимого занятия:

Основу диагностики лейкоза крупного рогатого скота составляет серологический метод исследования - реакция иммунодиффузии (РИД). Из числа положительно реагирующих по РИД животных (инфицированных БЛКРС) с помощью гематологического и клинического методов выявляют больных лейкозом.

При первичной постановке диагноза в хозяйстве, ферме, стаде проводят диагностический убой больных животных с последующими патологоанатомическим и гистологическим исследованиями.

Больными признают РИД-положительных животных, у которых при однократном гематологическом исследовании установлены изменения, характерные для данной болезни, по "лейкозному ключу". Сущность метода - выявление при помощи РИД в сыворотке крови животных специфических преципитирующих антител к ВЛКРС.

Пробы крови для исследований берут не ранее чем через 15 суток после введения животным вакцин или аллергенов, за 30 суток до отела и спустя такой же срок после него.

Специфические антитела появляются в крови через 1 - 2 мес после заражения вирусом лейкоза и сохраняются пожизненно.

Серологическому исследованию на лейкоз подвергают сыворотки крови от животных в возрасте 6 мес и старше.

Для постановки РИД используют диагностический набор, который состоит из специфического антигена вириуса лейкоза крупного рогатого скота, специфической преципитирующей сыворотки к вириусу лейкоза крупного рогатого скота, отрицательной сыворотки и других компонентов. К набору прилагается наставление по его применению для серологической диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Испытуемые сыворотки получают из крови исследуемого животного в количестве 2-3 мл и направляют в лабораторию с сопроводительным документом, в котором указывают название хозяйства, номер (кличку), возраст, пол, породу животного.

Постановка РИД.

Компоненты реакции и подготовка их к работе. Лиофилизованный антиген, специфическую преципитирующую и отрицательную сыворотки растворяют дистиллированной водой в объеме, указанном на этикетке. Растворенные диагностикумы можно хранить при температуре 4°C не более двух недель.

Расплавленный агаровый гель, имеющий температуру 50-65°C, разливают слоем 2-3 мм в обезжиренные чашки Петри или на стекла, установленные в горизонтальном положении, и оставляют их при комнатной температуре на 1 ч.

Лиофилизованный антиген, контрольные и испытуемые сыворотки вносят в лунки пастеровскими пипетками, которые для каждого диагностикума должны быть отдельные. Пипетки для испытуемых сывороток промывают после каждой пробы. Лунки заполняют сверху, не допуская переливания жидкости через край.

Антиген вносят в центральную лунку, две диаметрально противоположные лунки заполняют специфической сывороткой.

После заполнения лунок чашки Петри выдерживают 48 ч при температуре 18-27°C (стеклянные пластинки - при той же температуре во влажной камере).

Учет и оценка результатов реакции.

Реакцию учитывают через 48 ч в проходящем свете и оценивают при наличии четкой контрольной линии преципитации между антигеном и специфической преципитирующей сывороткой и отсутствии таковой с отрицательной контрольной сывороткой.

При оценке результатов реакции с испытуемыми сыворотками прежде всего устанавливают специфичность образовавшихся линий преципитации.

Специфической считают линию преципитации, которая образуется между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном и соединяется с контрольной линией преципитации, то есть идентична ей. Неспецифической считают линию преципитации, которая образуется между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном, но не сливается с контрольной линией преципитации, а пересекает ее или упирается в нее, образуя угол.

В зависимости от наличия специфических антител против ВЛКРС и типа получившихся линий преципитации реакцию оценивают как положительную или отрицательную.

Реакцию считают положительной, если между лунками с испытуемой сывороткой и антигеном образуется линия преципитации, которая соединяется с контрольной линией и идентична ей линия преципитации отсутствует, но контрольная полоса образует изгиб вблизи лунки с испытуемой сывороткой к лунке с антигеном; кроме специфической линии преципитации, образуется дополнительная линия, которая располагается ближе к лунке с испытуемой сывороткой и обусловлена наличием антител к полипептидному антигену p24 ВЛКРС. Реакцию считают отрицательной, если контрольная линия преципитации продолжается до лунки с испытуемой сывороткой без изгибов.

При наличии слабо различимого изгиба линии преципитации у лунки с испытуемой сывороткой животное исследуют вновь через три-четыре недели.

В случаях, когда линия преципитации плохо просматривается или имеется зона опалесценции вокруг лунок, реакцию следует переставить.

При сдвиге контрольной линии преципитации в сторону лунок с антигеном необходимо провести проверку компонентов реакции на активность в контрольной тест-системе.

Животных, сыворотки крови которых дали положительный результат в РИД, считают зараженными вирусом лейкоза, и их необходимо исследовать гематологическим методом.

Гематологический метод заключается в количественной и качественной оценке лейкоцитов периферической крови животных, отнесенных по результатам РИД к группе инфицированных ВЛКРС

При гематологическом исследовании осуществляют:
подсчет количества лейкоцитов при помощи электронного счетчика частиц или в камере Горяева;
дифференцированный подсчет лейкоцитов в мазках (выведение лейкоформулы) или лимфоцитов при помощи фазово-контрастного микроскопирования крови в камере Горяева;
оценку количества лейкоцитов и абсолютного количества лимфоцитов по "лейкозному ключ" (постановку гематологического диагноза).

Для количественной и качественной оценки лейкоцитов берут пробы крови в пробирки с антикоагулянтом. В качестве антикоагулянта используют трилон-Б, гепарин. Пробы крови должны быть исследованы не позднее 36 ч с момента взятия.

Определение количества лейкоцитов.

Подсчет лейкоцитов в камере Горяева.

Дифференцированный подсчет лейкоцитов (выведение лейкоцитарной формулы) проводят при обнаружении повышенного количества их. Для этих целей готовят мазки крови.

1. Выполнить постановку РИД.

2. Выполнить выведение лейкоформулы и заполнить таблицу.

№ пробы	Результат РИД	Кол-во лейкоцитов	Лейкоформула							
			Э	Б	нейтрофилы			лимфоциты		МОН
					Ю	П-Я	С-Я	М	Ср	
1.										
2.										
3.										