

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

**Методические рекомендации для
самостоятельной работы обучающихся по дисциплине**

БЗ.В.ОД.4 Вирусология

Направление подготовки (специальность) 36.03.01 Ветеринарно-санитарная
экспертиза

Профиль образовательной программы Ветеринарно-санитарная экспертиза

Форма обучения заочная

СОДЕРЖАНИЕ		
1.	Организация самостоятельной работы	3
2.	Методические рекомендации по выполнению индивидуальных домашних задания	5
2.1.	Темы индивидуальных домашних заданий	5
2.2.	Содержание индивидуальных домашних заданий	6
2.3.	Порядок выполнения заданий	8
2.4.	Пример выполнения задания	9
3.	Методические рекомендации по самостоятельному изучению вопросов	15
4.	Методические рекомендации по подготовке к занятиям	19
4.1.	Лабораторная работа № 1 Правила работы с вирусами. Устройство вирусологической лаборатории.	19
4.2.	Лабораторная работа № 2 Методы диагностики вирусных болезней	19
4.3.	Лабораторная работа № 3 Лабораторная диагностика бешенства.	19
4.4.	Практическое занятие № 1 Лабораторная диагностика лейкоза крупного рогатого скота	19

1. ОРГАНИЗАЦИЯ САМОСТОЯТЕЛЬНОЙ РАБОТЫ

1.1. Организационно-методические данные дисциплины

№ п. п.	Наименование темы	Общий объем часов по видам самостоятельной работы (из табл. 5.1 РПД)				
		подготов ка курсовог о проекта (работы)	подготовка реферата/э ссе	индивидуал ьные домашние задания (ИДЗ)	самостоятел ьное изучение вопросов (СИБ)	подготовка к занятиям (ПкЗ)
1	2	3	4	5	6	7
1	Введение в вирусологию	-	-	-	3	-
2	Правила работы с вирусами. Устройство вирусологической лаборатории	-	-	-	3	2
3	Правила отбора патологического материала от больных животных и трупов. Подготовка патологического материала к исследованию.	-	-	-	3	-
4	Физическая структура и химический состав вирусов	-	-	-	3	-
5	Методы диагностики вирусных болезней	-	-	-	3	2
6	Индикация вирусов в патологическом материале путем обнаружения телец-включений	-	-	-	4	-
7	Действие на вирусы физических и химических факторов	-	-	-	3	-
8	Систематика вирусов				3	
9	Лабораторные	-	-	-		-

	животные их использование в вирусологии				3	
10	Использование куриных эмбрионов в вирусологии	-	-	-	3	-
11	Использование культур клеток в вирусологии	-	-	-	3	-
12	Бактериофаги	-	-	-	4	-
13	Репродукция вирусов	-	-	-	3	-
14	Патогенез вирусных инфекций	-	-	-	3	-
15	Иммунитет и профилактика при вирусных болезнях	-	-	-	3	-
16	Серологические реакции в вирусологии	-	-	-	4	-
17	Молекулярно-генетические методы в вирусологии	-	-	-	4	-
18	Вирусы бешенства			2	3	2
19	Вирусы болезни Ауески	-	-	2	4	-
20	Вирусы гриппа	-	-	2	3	-
21	Вирусы ящура	-	-	2	4	-
22	Вирусы лейкоза крупного рогатого скота	-	-	2	3	2

2. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ВЫПОЛНЕНИЮ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ДОМАШНИХ ЗАДАНИЙ

Индивидуальные домашние задания выполняются в форме контрольной работы.

2.1 Темы индивидуальных домашних заданий

1. Основные этапы развития вирусологии. Роль вирусов и инфекционной патологии животных.
2. Химический состав вирусов
3. Факторы и особенности противовирусного иммунитета.
4. Интерферон, его роль в противовирусном иммунитете и перспективы практического использования.
5. Репродукция вирусов.
6. Изменчивость вирусов.
7. Устойчивость вирусов к физическим и химическим факторам.
8. Типы симметрии вирусов. Химический состав просто- и сложноорганизованных вирусов.
9. Белки вируса и их функциональное значение.
10. Механизмы персистенции вирусов в организме животных.
11. Ингибиторы вирусов как факторы врожденного неспецифического иммунитета.
12. Противовирусные вакцины. Принципы их получения и эффективность.
13. Инактивированные вирусные вакцины. Требования, предъявляемые к ним и их получению.
14. Механизм антивирусного действия интерферона и его практическое применение.
15. Реакция нейтрализация. Сущность реакции, методика использования и две модификации. Использование реакции.
16. Реакция диффузной преципитации в геле. Опишите ее сущность, методику постановки и практическое использование.
17. Свойства первично-трипсинизированных и перевиваемых культур клеток. Использование их в вирусологической практике. Методика получения первично-трипсинизированной культуры клеток.
18. Учет, хранение и транспортировка вирусов.
19. Индикация вируса в зараженных клеточных культурах. Цитопатогенное действие вируса на клетку, методика обнаружения ЦПД.
20. Использование реакции гемадсорбции в вирусологии (РГАд).
21. Взятие и подготовка вирусологического материала для вирусологических исследований. Условия хранения вирусов в лаборатории.
22. Особенности реакции связывания комплемента с вирусными антигенами. Использование РСК в вирусологии.
23. Основные правила транспортировки ВСМ.
24. Современные методы диагностики вирусных болезней животных: ДНК-зонды, ПЦР, ИФА.
25. РСК, компоненты для реакции и их характеристика. Методика постановки РСК при определении серологического типа вируса ящура.
26. Получение и обработка патологического материала для вирусологических исследований.
27. Виды патологического материала используемого для диагностических исследований на вирусные болезни, методы получения вирусосодержащего материала.

28. Виды животных, чувствительных к вирусу болезни Ауески в естественных условиях и при экспериментальном заражении. Методы лабораторной диагностики болезни Ауески. ВСЭ при болезни Ауески
29. Вирус ящура. Основные эпизоотические данные, клинические и патологоанатомические признаки заболевания. Лабораторная диагностика ящура.. ВСЭ при ящуре.
30. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота. Краткая характеристика вируса, его культивирования и патогенность. Лабораторная диагностика болезни и специфическая профилактика. ВСЭ при инфекционном ринотрахеите.
31. Бешенство. Свойства вируса, его особенности, патогенность. Лабораторная диагностика и специфическая профилактика. ВСЭ при бешенстве
32. Методы лабораторной диагностики чумы свиней. Специфическая профилактика чумы свиней. ВСЭ при чуме свиней.
33. Болезнь Ньюкасла. Из чего складывается ранняя и ретроспективная диагностика заболевания. ВСЭ при ящуре.
34. Парагрипп крупного рогатого скота. Свойства вируса. Методы лабораторной диагностики. ВСЭ при парагриппе-3.
35. Сущность вакцинации покусанных животных и человека. Какие вакцины применяют для вакцинации животных против бешенства. ВСЭ при бешенстве.
36. Свойства вируса африканской чумы свиней. Методы культивирования в лабораторных условиях, выделения вируса и лабораторная диагностика заболевания.
37. Вирусы гриппа его характеристика, антигенный шифт и дрейф.
38. Специфическая профилактика и меры борьбы с ящуром. ВСЭ при ящуре.
39. Трансмиссивный гастроэнтерит и респираторно-репродуктивный синдром свиней. Свойства вирусов, его особенности, патогенность. Лабораторная диагностика и специфическая профилактика этих болезней. ВСЭ при ТГС и РРС свиней.
40. Клинические признаки гриппа, пути передачи, лабораторная диагностика.

2.2 Содержание индивидуальных домашних заданий

Вариант №1

1. Основные этапы развития вирусологии. Роль вирусов и инфекционной патологии животных.
2. Реакция диффузной преципитации в геле. Опишите ее сущность, методику постановки и практическое использование.
3. Виды животных, чувствительных к вирусу болезни Ауески в естественных условиях и при экспериментальном заражении. Методы лабораторной диагностики болезни Ауески. ВСЭ при болезни Ауески
4. Инаktivированные вирусные вакцины. Требования, предъявляемые к ним и их получению.

Вариант № 2

1. Химический состав вирусов.
2. Свойства первично-трипсинизированных и перевиваемых культур клеток. Использование их в вирусологической практике. Методика получения первично-трипсинизированной культуры клеток.
3. Механизм противовирусного действия интерферона и его практическое применение.
4. Вирус ящура. Основные эпизоотические данные, клинические и патологоанатомические признаки заболевания. Лабораторная диагностика ящура.. ВСЭ при ящуре.

Вариант № 3

1. Факторы и особенности противовирусного иммунитета.
2. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота. Краткая характеристика вируса, его культивирования и патогенность. Лабораторная диагностика болезни и специфическая профилактика. ВСЭ при инфекционном ринотрахеите.
3. Учет, хранение и транспортировка вирусов.
4. Индикация вируса в зараженных клеточных культурах. Цитопатогенное действие вируса на клетку, методика обнаружения ЦПД.

Вариант № 4

1. Интерферон, его роль в противовирусном иммунитете и перспективы практического использования.
2. Использование реакции гемадсорбции в вирусологии (РГАД).
3. Бешенство. Свойства вируса, его особенности, патогенность. Лабораторная диагностика и специфическая профилактика. ВСЭ при бешенстве
4. Взятие и подготовка вирусологического материала для вирусологических исследований. Условия хранения вирусов в лаборатории.

Вариант № 5

1. Репродукция вирусов.
2. Особенности реакции связывания комплемента с вирусными антигенами. Использование РСК в вирусологии.
3. Основные правила транспортировки ВСМ.
4. Методы лабораторной диагностики чумы свиней. Специфическая профилактика чумы свиней. ВСЭ при чуме свиней.

Вариант № 6

1. Изменчивость вирусов.
2. Современные методы диагностики вирусных болезней животных: ДНК-зонды, ПЦР, ИФА.
3. Болезнь Ньюкасла. Из чего складывается ранняя и ретроспективная диагностика заболевания. ВСЭ при ящуре.
4. Виды патологического материала используемого для диагностических исследований на вирусные болезни, методы получения вирусосодержащего материала.

Вариант № 7

1. Устойчивость вирусов к физическим и химическим факторам.
2. РСК, компоненты для реакции и их характеристика. Методика постановки РСК при определении серологического типа вируса ящура.
3. Получение и обработка патологического материала для вирусологических исследований.
4. Парагрипп крупного рогатого скота. Свойства вируса. Методы лабораторной диагностики. ВСЭ при парагриппе-3.

Вариант № 8

1. Типы симметрии вирусов. Химический состав просто- и сложноорганизованных вирусов.
2. Механизмы персистенции вирусов в организме животных.
3. Сущность вакцинации покусанных животных и человека. Какие вакцины применяют для вакцинации животных против бешенства. ВСЭ при бешенстве.

4. Свойства вируса африканской чумы свиней. Методы культивирования в лабораторных условиях, выделения вируса и лабораторная диагностика заболевания.

Вариант № 9

1. Белки вируса и их функциональное значение.
2. Противовирусные вакцины. Принципы их получения и эффективность.
3. Вирусы гриппа его характеристика, антигенный шифт и дрейф.
4. Специфическая профилактика и меры борьбы с ящуром. ВСЭ при ящуре.

Вариант № 10

1. Ингибиторы вирусов как факторы врожденного неспецифического иммунитета.
2. Трансмиссивный гастроэнтерит и респираторно-репродуктивный синдром свиней. Свойства вирусов, его особенности, патогенность. Лабораторная диагностика и специфическая профилактика этих болезней. ВСЭ при ТГС и РРС свиней.
3. Реакция нейтрализация. Сущность реакции, методика использования и две модификации. Использование реакции.
4. Клинические признаки гриппа, пути передачи, лабораторная диагностика.

2.3 Порядок выполнения заданий

Вариант №1

1. Основные этапы развития вирусологии. Роль вирусов и инфекционной патологии животных.
2. Реакция диффузной преципитации в геле. Опишите ее сущность, методику постановки и практическое использование.
3. Виды животных, чувствительных к вирусу болезни Ауески в естественных условиях и при экспериментальном заражении. Методы лабораторной диагностики болезни Ауески. ВСЭ при болезни Ауески
4. Инактивированные вирусные вакцины. Требования, предъявляемые к ним и их получению.

При выполнении вопроса: и «Основные этапы развития вирусологии. Роль вирусов и инфекционной патологии животных.» следует рассмотреть основные этапы развития вирусологии начиная с уровня организма до молекулярного уровня, отметить роль вирусов в возникновении и развитии острых, хронических, латентных и медленных инфекционных болезней, в том числе обратить внимание на эволюцию вирусов и болезней.

При выполнении вопроса: «Реакция диффузной преципитации в геле. Опишите ее сущность, методику постановки и практическое использование» необходимо рассмотреть цель постановки РДП, сущность этой реакции, компоненты и требования к ним, варианты постановки и технику выполнения

При выполнении вопроса: «Виды животных, чувствительных к вирусу болезни Ауески в естественных условиях и при экспериментальном заражении. Методы лабораторной диагностики болезни Ауески. ВСЭ при болезни Ауески» следует обратить внимание на спектр патогенности возбудителя болезни Ауески, чувствительность к этому вирусу сельскохозяйственных, диких животных, а также лабораторных, методы лабораторной диагностики включая экспресс-методы, выделение вируса в чувствительных биосистемах, идентификацию выделенного вируса и ретроспективную диагностику.

При выполнении вопроса: «Инактивированные вирусные вакцины. Требования, предъявляемые к ним и их получению» следует обратить внимание на способы получения инактивированных вакцин и их характеристики, их достоинства и недостатки, требования к инактивированным вакцинам.

2.4 Пример выполнения задания

Вариант №1

1. Основные этапы развития вирусологии. Роль вирусов и инфекционной патологии животных.

Быстрый прогресс в области вирусологических знаний, основанный в значительной мере на достижениях смежных естественных наук, обусловил возможность углубленного познания природы вирусов. Как ни в одной другой науке, в вирусологии прослеживается быстрая и четкая смена уровней познания – от уровня организма до субмолекулярного.

Приведенные периоды развития вирусологии отражают те уровни, которые являлись доминирующими в течение одного – двух десятилетий.

Уровень организма (30-40-е годы XX века). Основной экспериментальной моделью являются лабораторные животные (белые мыши, крысы, кролики, хомяки и т. д.), основным модельным вирусом – вирус гриппа. В 40-е годы, благодаря исследованиям австралийского вирусолога и иммунолога Ф.М. Бернета, в вирусологию в качестве экспериментальной модели прочно входят куриные эмбрионы в связи с их высокой чувствительностью к вирусам гриппа, оспы и некоторым другим.

Открытие в 1941 г. американским вирусологом Херстом феномена гемагглютинации немало способствовало изучению взаимодействия вируса с клеткой на модели вируса гриппа и эритроцитов.

Большим вкладом отечественных вирусологов в медицинскую вирусологию явилось изучение природно-очаговых заболеваний – эпидемических энцефалитов. В 1937 г. была организована первая экспедиция, возглавляемая Л. А. Зильбером, в составе которой были Е. Н. Левкович, А. К. Шубладзе, М. П. Чумаков, В. Д. Соловьев и др. Благодаря проведенным исследованиям был открыт вирус клещевого энцефалита, выявлены его переносчики – иксодовые клещи, разработаны методы лабораторной диагностики, профилактики и лечения. Советскими вирусологами были изучены вирусные геморрагические лихорадки, разработаны препараты для диагностических и лечебно-профилактических целей.

Уровень клетки (50-е годы XX века). В 1949 г. происходит значительное событие в истории вирусологии – открытие возможности культивировать клетки в искусственных условиях. В 1952 г. Дж. Эндерс, Т. Уэллер, Ф. Роббинс получили Нобелевскую премию за разработку метода культуры клеток. Использование культуры клеток в вирусологии явилось подлинно революционным событием, послужившим основой для выделения многочисленных новых вирусов, их идентификации, клонирования, изучения их взаимодействия с клеткой. Появилась возможность получения культуральных вакцин. Эта возможность была доказана на примере вакцины против полиомиелита. В содружестве с американскими вирусологами Дж. Солком и А. Сейбином, русскими вирусологами М. П. Чумаковым, А. А. Смородинцевым и др. была разработана технология производства, апробирована и внедрена в практику убитая и живая вакцины против полиомиелита. В 1959 г. была проведена массовая иммунизация детского населения в СССР (около 15 млн.) живой полиомиелитной вакциной, в результате резко снизилась заболеваемость полиомиелитом и практически исчезли паралитические формы заболевания. В 1963 г. за разработку и внедрение в практику живой полиомиелитной вакцины М. П. Чумакову и А. А. Смородинцеву была присуждена Ленинская премия. Другим важным приложением техники выращивания вирусов явилось получение Дж. Эндерсом и А. А. Смородинцевым

живой противокоревой вакцины, широкое применение которой обусловило значительное снижение заболеваемости корью и является основой для искоренения этой инфекции.

Широко внедрялись в практику и другие культуральные вакцины – энцефалитная, ящурная, антирабическая и т. д.

Молекулярный уровень (60-е годы XX века). В вирусологии широко стали использовать методы молекулярной биологии, а вирусы благодаря простой организации их генома стали распространенной моделью для молекулярной биологии. Молекулярная биология используя вирусную модель, устанавливает генетический код, механизм внутриклеточной экспрессии генома, репликацию ДНК, процессинг (созревание) информационных РНК и многое другое. В свою очередь использование молекулярных методов в вирусологии позволило установить принципы строения (архитектуры) вирусных индивидуумов – вирионов, способы проникновения вирусов в клетку и их репродукции.

Субмолекулярный уровень (70-е годы XX века). Стремительное развитие молекулярной биологии открывает возможности изучения первичной структуры нуклеиновых кислот и белков. Появляются методы секвенирования ДНК, определения аминокислотных последовательностей белка. Получают первые генетические карты геномов ДНК-содержащих вирусов.

В 1970 г. Д. Балтимором и одновременно Г. Теминым и С. Мизутани была открыта обратная транскриптаза в составе РНК-содержащих онкогенных вирусов, фермент, переписывающий РНК на ДНК. Становится реальным синтез гена с помощью этого фермента на матрице, выделенной из полисом иРНК.

В 1972 г. возникает новый раздел молекулярной биологии – геновая инженерия. В этом году публикуется сообщение П. Берга в США о создании рекомбинантной молекулы ДНК, которое положило начало эре геновой инженерии. Появляется возможность получения большого количества нуклеиновых кислот и белков путем введения рекомбинантных ДНК в состав генома прокариот и простых эукариот. Одним из основных практических приложений нового метода является получение дешевых препаратов белков, имеющих значение в медицине (инсулин, интерферон) и сельском хозяйстве (дешевые белковые корма для скота).

Этот период характеризуется важными открытиями в области медицинской вирусологии. В фокусе изучения – три наиболее массовых болезни, наносящих огромный ущерб здоровью людей и народному хозяйству – грипп, рак, гепатит.

Установлены причины регулярно повторяющихся пандемий гриппа. Детально изучены вирусы рака животных (птиц, грызунов), установлена структура их генома и идентифицирован ген, ответственный за злокачественную трансформацию клеток – онкоген. Установлено, что причиной гепатитов А и В являются разные вирусы: гепатит А вызывает РНК-содержащий вирус, отнесенный к семейству пикорнавирусов, а гепатит В – ДНК-содержащий вирус, отнесенный к семейству гепаднавирусов. В 1976 г. Барух Блумберг, исследуя антигены крови у аборигенов Австралии, обнаружил так называемый австралийский антиген, который он принял за один из антигенов крови. Позже было выявлено, что этот антиген является антигеном вируса гепатита В, носительство которого распространено во всех странах мира. За открытие австралийского антигена Б. Блумбергу в 1976 г. была присуждена Нобелевская премия.

Другая Нобелевская премия в 1976 г. присуждена американскому ученому К. Гайдушке, который установил вирусную этиологию, одной из медленных инфекций человека – куру, наблюдающейся в одном из туземных племен на острове Новая Гвинея и связанной с ритуальным обрядом – поеданием зараженного мозга умерших родственников. Благодаря усилиям К. Гайдушки, эта традиция была искоренена и число больных резко сократилось.

Роль вирусов в инфекционной патологии животных и птиц. За последние 30-40 лет вирусология сделала стремительный скачок вперед. В настоящее время вирусные болезни имеют большое значение в инфекционной патологии животных, человека и растений. Если все инфекционные болезни, вызываемые всевозможными микроорганизмами, принять за 100 %, то вирусные болезни в медицине составляют примерно 80 %, а в ветеринарии — 50 % и более. Известно свыше 500 болезней, вызываемых зоопатогенными вирусами. Вирусное происхождение установлено у таких особо опасных болезней, как ящур, чума крупного рогатого скота, чума свиней, бешенство, классическая чума птиц и т.д. Экономический ущерб складывается из прямых затрат в результате падежа животных, резкого снижения их продуктивности, затрат на лечение и косвенных затрат (ветеринарно-санитарные мероприятия и др.).

2. Реакция диффузной преципитации в геле. Опишите ее сущность, методику постановки и практическое использование.

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

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

В настоящее время используется ряд методов диффузионной преципитации: 1) метод простой диффузии в агаровый гель; 2) метод двойной диффузии в агаровый гель (в пробирках); 3) метод двойной диффузии в агаровый гель (в капиллярах) по Вязову; 4) метод простой радиальной иммунодиффузии по Манчини; 5) метод двойной диффузии в агаровый гель по Оухтерлони.

Компоненты РДП

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

Компонентами 2-го варианта: исследуемая сыворотка крови, вирусный диагностикум и 1%-ный агаровый гель. Для контрольной реакции необходимы: нормальная сыворотка крови животного — продуцента преципитирующей сыворотки, контрольный антиген — экстракт ткани здорового животного того же вида, от которого получен вируссодержащий материал (ткань должна быть аналогична той, в которой локализуется вирус). Необходимым компонентом реакции иммунодиффузии является

гелевая среда, приготовленная из агара. К агаровому гелю предъявляют следующие требования. Он должен быть прозрачным, достаточно плотным (обычно используют 1-1,5 или 2%-ный раствор агара), стерильным, рН должен быть в пределах 6,4-8,5. Чаще всего используют агар фирмы "Дифко" или очищенную агарозу. Приготовление геля из очищенного агара "Дифко" несложно. В этом случае берут 1 весовую часть агара и добавляют к ней 99 весовых частей физиологического раствора (можно использовать забуференные или буферные растворы с рН 7,3-7,4). Колбочку со смесью ставят в кипящую водяную баню, растворяют агар и добавляют консервант (мертиолят натрия 1:10000). Затем смесь разливают по пробиркам и употребляют по мере надобности.

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

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

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

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

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

Учет реакции

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

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

1. Обе линии преципитации полностью сливаются. Это говорит об идентичности обоих антигенов.

2. Линии преципитации пересекаются. Это значит, что реагирующие с АТ детерминанты АГ неидентичны и, следовательно, сами антигены различны.

3. Одна линия длиннее и продолжается за другую в виде так называемой "шпоры".

4. Обе линии преципитации перекрещиваются и сливаются одновременно. Это значит, что оба антигена содержат как одинаковые, так и различные детерминанты, которые вступают в реакцию с антителами полиспецифической сыворотки.

3. Виды животных, чувствительных к вирусу болезни Ауески в естественных условиях и при экспериментальном заражении. Методы лабораторной диагностики болезни Ауески. ВСЭ при болезни Ауески

Болезнью Ауески болеют все виды сельскохозяйственных животных, пушные звери, кошки, собаки, синантропные грызуны. Вспышка болезни Ауески в мелких хозяйствах ограничивается поражением 2...3 пометов и затухает относительно быстро. В крупных откормочных и репродукторных хозяйствах эпизоотия приобретает затяжной характер и протекает в форме явного и скрытого процесса. На зверофермах она протекает с широким охватом поголовья за счет скармливания необезвреженных мясных продуктов и боенских отходов.

Патогенез. Хотя вирус обладает тропностью к нервной ткани, патогенез заболевания имеет свои особенности в зависимости от способа заражения, вида и возраста животных.

При проникновении возбудителя через слизистую оболочку ротовой полости и верхних дыхательных путей у свиней в месте внедрения (воротах инфекции) происходит быстрая репродукция вируса, а у остальных видов животных – лишь незначительное увеличение его концентрации. После короткого периода он проникает в мозг прямым нейролимфогенным путем по обонятельному, тройничному и языкоглоточному нервам. Репродукция вируса вызывает острое воспаление мозга и его оболочек с развитием энцефалита.

При проникновении через кожу вирус довольно быстро репродуцируется в месте внедрения. Затем гематогенным и лимфогенным путями распространяется по всему организму и вызывает наряду с нервными явлениями симптомы тяжелой септицемии. При вовлечении в патологический процесс дыхательной и пищеварительной систем могут развиваться признаки отека легких, пневмония и диарея.

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

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

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

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

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

4. Инактивированные вирусные вакцины. Требования, предъявляемые к ним и их получению.

В инактивированной вакцине вирусный геном должен быть переведен в инактивную форму или разрушен. Остаточная инфекционность инактивированных вакцин даже при химической или физической инаktivации генома может быть обусловлена разнообразными генетическими воздействиями между отдельными интактными фрагментами нуклеиновых кислот. Инаktivация 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 инаktivатора и условий инаktivации которые позволят максимально сохранить антигенность вакцины.

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

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

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

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

3. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО САМОСТОЯТЕЛЬНОМУ ИЗУЧЕНИЮ ВОПРОСОВ

3.1 Происхождение вирусов. Место вирусов в биосфере. Их распространение в природе

При изучении этого вопроса следует обратить внимание на основные гипотезы о происхождении вирусов: эндогенная, протобионтов, регрессивная. Место вирусов в биосфере, способность сохраняться и распространяться в окружающей среде.

3.2 Вирусоподобные структуры плазмиды, прионы, вирионы

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности: строения вирионов, плазмид, прионов. Роль вирионов и прионов в развитии болезней. Типы плазмид, их значение. Характеристика прионных инфекций, механизм развития заболевания.

3.3. Хранение, транспортировка, консервирование вирусов. Учет и хранение вирусов в условиях лаборатории

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности: правила взятия патологического вирусосодержащего материала, методы консервирования, правила транспортировки вирусов, хранения вирусов в условиях лаборатории, правила ведения журналов учета, приема, передачи вирусов.

3.4. Правила взятия вирусосодержащего патологического материала от больных животных и трупов. Методика подготовки материала к исследованию. Особенности проведения и учета бакконтроля

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности: взятия патологического материала от больных животных и от трупов, в том числе с учетом временных ограничений, особенностей подготовки разных видов патологического материала к исследованию, правил проведения бактериологического контроля.

3.5. Формы вирусных РНК и ДНК. Функции структурных и неструктурных белков. Липиды и углеводы вирусов

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности: разнообразие форм вирусных РНК и ДНК, наличие в структуре вируса капсидных и суперкапсидных белков, образование неструктурных белков и их функции, изменение липидного и углеводного состава вирусов, репродуцирующих в клетках разных видов животных.

3.6. Значение экспресс методов, выделение вирусов в чувствительных биосистемах, признаки присутствия вирусов. Ретроспективная диагностика.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности: методы экспресс диагностики их значение для раннего обнаружения вируса или вирусных антигенов в патологическом материале, использование лабораторных животных, куриных эмбрионов, культур клеток для выделения и обнаружения вируса, правила взятия и исследования парных сывороток при проведении ретроспективной диагностики.

3.7. Приготовление препаратов для электронной микроскопии

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

1. Методика приготовления препаратов для электронной микроскопии
2. Методика окраски препаратов для электронной микроскопии.

3.8 Устройство электронного микроскопа и принцип работа

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

1. Особенности устройство разных видов электронных микроскопов
2. Принцип работы электронного микроскопа.

3.9. Механизм действия на вирусы кислот, щелочей, детергентов, ультрафиолетового, рентгеновского, γ -лучей

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности: устойчивость разных групп вирусов к воздействию физических и химических факторов, за счёт наличия суперкапсидной оболочки, особенностей строения, размеров генома и плотности упаковки нуклеиновой кислоты в капсид.

3.10 Принципы систематики вирусов. Характеристика основных ДНК-содержащих и РНК-содержащих вирусов

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

1. Систематика парвовирусов, морфология, особенности репродукции, биологические особенности.
2. Систематика аденовирусов, морфология, особенности репродукции, биологические особенности.
3. Систематика поксвирусов, морфология, особенности репродукции, биологические особенности.
4. Систематика ретровирусов, морфология, особенности репродукции, биологические особенности.
5. Систематика флавивирусов, морфология, особенности репродукции, биологические особенности.

3.11. Методика заражения лабораторных животных разными способами и правила вскрытия

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности: требования предъявляемые к лабораторным животным, цели их использования, методика заражения и вскрытия, признаки присутствия вирусов в организме зараженных животных.

3.12. Методика заражения куриных эмбрионов в различные структуры, правила вскрытия и отбор патологического материала

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности: требования, предъявляемые к куриным эмбрионам, цель их заражения, способы заражения и методика вскрытия, правила отбора патологического материала от зараженных эмбрионов с целью выделения вируса, признаки присутствия вируса в Курином эмбрионе.

3.13. Характеристика различных культур клеток: первично-трипсинизированных, субкультур, диплоидных и перевиваемых, способы получения и заражение.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности: способы получения разных типов культур клеток, характеристика, преимущества и недостатки первично-трипсинизированных, субкультур, диплоидных и перевиваемых культур клеток, признаки присутствия вируса в культуре клеток, в том числе прямыми и косвенными методами.

3.14. Характеристика бактериофагов по строению, репродукции, назначению.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

1. Строение вирусного генома, его функциональные возможности.
2. Особенности репродукции бактериофагов.
3. Влияние на геном клетки вирусного генома, возможность интеграции.
4. Применение бактериофагов

3.15 Причины и механизм развития abortивной и интегративной инфекций.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

1. Условия при которых развивается abortивная инфекция.
2. Условия возникновения и механизм развития интегративной инфекции

3.16. Латентное и хроническое течение вирусных инфекций

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности

1. Характеристика латентных вирусных инфекций.
2. Характеристика хронических вирусных инфекций.

3.17 Интерферон – стадии индукции и продукции. Противовирусное действие ИФН

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

1. Стадии индукции и продукции интерферона
2. Механизм противовирусного действия интерферона

3.18. Особенности течения серологических реакций (РСК, РДП, РН, РИФ, НРИФ, РНГА, РТГА)

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности сущность постановки, компоненты и требования к ним, условия постановки, оценка результатов, преимущества и недостатки реакции связывания комплемента (РСК), реакции диффузионной преципитации (РДП), реакции нейтрализации (РН), реакции иммунофлюоресценции (РИФ), непрямой реакции иммунофлюоресценции (НРИФ), реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), реакции торможения гемагглютинации (РТГА).

3.19. Сущность, постановка и применение ПЦР и ДНК-зондов

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности: постановки полимеразной цепной реакции, значение этого метода для диагностики

вирусных болезней, компоненты, требования к ним, условия постановки ПЦР, оценка результатов, техника приготовления ДНК-зонда, применение его для идентификации нуклеиновой кислоты вируса.

3.20. Характеристика возбудителя бешенства, стадии болезни, особенности профилактики

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности: изменчивости вируса бешенства, антигенная структура вируса бешенства, стадии течения бешенства при тихой и атипичной форме течения болезни, профилактика с применением антирабических вакцин в том числе для иммунизации диких животных.

3.21. Культивирование вируса болезни Ауески и диагностика

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

1. Культивирование и выделение вируса болезни Ауески в организме разных лабораторных животных.
2. Лабораторная диагностика болезни Ауески

3.22. Характеристика вируса гриппа. Особенности клинического проявления. Изменчивость вируса гриппа.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

1. Характеристику штаммов вируса гриппа по патогенным свойствам.
2. Механизм антигенного дрейфа и шифта вируса гриппа.
3. Методы идентификации вирусов гриппа

3.23 Характеристика возбудителя, спектр патогенности, особенности течения. Лабораторная диагностика ящура

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности.

1. Таксономия, морфология и устойчивость вируса ящура.
2. Локализация вируса ящура в организме больных животных и вирусоносителей.
3. Методы обнаружения и идентификации вируса ящура в условиях лаборатории
4. Выделение вируса ящура в чувствительных биосистемах.
5. Ретроспективная диагностика ящура

3.24. Характеристика возбудителя лейкоза крупного рогатого скота, стадии болезни, проявления.

При изучении вопроса необходимо обратить внимание на следующие особенности: строения, репродукции вируса лейкоза крупного рогатого скота, особенности культивирования и выделения вируса, проявление болезни при разных формах лейкоза, в том числе при лимфолейкозе, ретикулосаркоме, миелоидном лейкозе, слабодифференцированном и недифференцированном лейкозе.

4. МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПОДГОТОВКЕ К ЗАНЯТИЯМ

4.1 Лабораторная работа № 1 Правила работы с вирусами. Устройство вирусологической лаборатории.

При подготовки к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

1. Правила работы с вирусами и вирусосодержащим материалом
2. Спецодежда.
3. Подготовка рабочего места и дезинфекция по окончании работы.
4. Требования к устройству лаборатории, обеспеченность оборудованием, необходимые помещения.

4.2 Лабораторная работа № 2 Методы диагностики вирусных болезней.

При подготовки к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

1. Методы быстрого обнаружения вирусов в патологическом материале путем электронной, люминисцентной микроскопии.
2. Сроки проведения исследований.
3. Обоснования исследования парных сывороток и преимущества ретроспективной диагностики.

4.3 Лабораторная работа № 3 Лабораторная диагностика бешенства.

При подготовки к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

1. Правилах отбора патологического материала от животных для проведения лабораторных исследований.
2. Обнаружения антигена в исследуемом материале.
3. Выделение вируса и его идентификация.

4.5 Практическое занятие № 1 Лабораторная диагностика лейкоза крупного рогатого скота

При подготовки к занятию необходимо обратить внимание на следующие моменты.

1. Правила взятия патологического материала для исследования.
2. Этапы диагностики: экспресс-методы, вирусологические и ретроспективные методы диагностики.
3. Методику приготовления мазков для выведения лейкоформулы, изучение гистологических изменений при лейкозе.