

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ ОБУЧАЮЩИХСЯ  
ПО ОСВОЕНИЮ ДИСЦИПЛИНЫ**

**Б1. Б.17 ВИРУСОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

**Специальность 36.05.01 Ветеринария**

**Специализация Ветеринарное дело**

**Форма обучения очная**

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>1.</b>	<b>Конспект лекций</b>	<b>4</b>
	<b>Лекция № 1 Введение в вирусологию</b>	<b>4</b>
<b>1.2</b>	<b>Лекция № 2 Физическая структура и химический состав вирусов</b>	<b>6</b>
<b>1.3</b>	<b>Лекция № 3 Систематика вирусов</b>	<b>9</b>
<b>1.4</b>	<b>Лекция № 4 Репродукция вирусов</b>	<b>11</b>
<b>1.5</b>	<b>Лекция № 5 Репродукция вирусов</b>	<b>12</b>
<b>1.6</b>	<b>Лекция № 6 Патогенез вирусных инфекций</b>	<b>15</b>
<b>1.7</b>	<b>Лекция № 7 Особенности противовирусного иммунитета</b>	<b>18</b>
<b>1.8</b>	<b>Лекция № 7 Профилактика и химиотерапия при вирусных болезнях</b>	<b>23</b>
<b>1.9</b>	<b>Лекция № 8 Вирусы бешенства.</b>	<b>27</b>
<b>1.10</b>	<b>Лекция № 9 Вирусы ящура</b>	<b>29</b>
<b>1.11</b>	<b>Лекция № 10 Вирусы болезни Ауески</b>	<b>31</b>
<b>1.12</b>	<b>Лекция № 11 Вирусные пневмоэнтериты телят</b>	<b>33</b>
<b>1.13</b>	<b>Лекция № 12 Вирусные болезни свиней</b>	<b>36</b>
<b>1.14</b>	<b>Лекции №13 Грипп птиц</b>	<b>39</b>
<b>1.15</b>	<b>Лекция № 14 Вирусные болезни лошадей</b>	<b>41</b>
<b>1.16.</b>	<b>Лекция №15 Введение в биотехнологию.</b>	<b>43</b>
<b>1.17.</b>	<b>Лекция №16 Биотехнологические производства</b>	<b>46</b>
<b>1.18.</b>	<b>Лекция №17 Основные методы биотехнологии</b>	<b>49</b>
<b>2.</b>	<b>Методические указания по выполнению лабораторных работ</b>	<b>53</b>
<b>2.1.</b>	<b>Лабораторная работа № 1 Правила работы с вирусами. Устройство вирусологической лаборатории.</b>	<b>53</b>
<b>2.2.</b>	<b>Лабораторная работа № 2 Правила отбора патологического материала от больных животных и трупов. Подготовка патологического материала к исследованию</b>	<b>54</b>
<b>2.3</b>	<b>Лабораторная работа № 3 Методы диагностики вирусных болезней.</b>	<b>57</b>
<b>2.4</b>	<b>Лабораторная работа № 4 Индикация вирусов в патологическом материале путем обнаружения телец-</b>	<b>59</b>

	включений	
2.5.	<b>Лабораторная работа № 5</b> Культивирование вирусов в различных биосистемах	<b>62</b>
2.6.	<b>Лабораторная работа № 6</b> Серологические реакции в вирусологии	<b>70</b>
2.7.	<b>Лабораторная работа № 7</b> Вирусы бешенства	<b>75</b>
2.8	<b>Лабораторная работа № 8</b> Вирусы ящура	<b>77</b>
2.9	<b>Лабораторная работа № 9</b> Вирусные пневмоэнтериты телят	<b>79</b>
2.10	<b>Лабораторная работа № 10</b> Вирусы лейкоза крупного рогатого скота	<b>80</b>
2.11	<b>Лабораторная работа № 11.</b> Дифференциальная диагностики гриппа птиц от ньюкаслской болезни	<b>82</b>
2.12	<b>Лабораторная работа № 12.</b> Решение диагностических задач	<b>83</b>
2.13	<b>Лабораторная работа № 13</b> Введение в биотехнологию.	<b>87</b>
2.14	<b>Лабораторная работа № 14</b> Биотехнологические производства	<b>88</b>
2.15	<b>Лабораторная работа № 15</b> Основные методы биотехнологии	<b>90</b>

## 1. КОНСПЕКТ ЛЕКЦИЙ

### 1. 1 Лекция № 1. (2 часа).

**Тема: «Введение в вирусологию»**

#### 1.1.1 Вопросы лекции:

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

### **1.1.2 Краткое содержание вопросов:**

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

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

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

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

#### *Связь вирусологии с другими науками.*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6. Вирус имеет вне клеточную форму существования - вирион.

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

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

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

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

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

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

### **4. Происхождение и роль вирусов в биосфере.**

По вопросу о происхождении вирусов высказывались разные предположения. Одни авторы считали, что вирусы являются результатом крайнего проявления регressiveвой эволюции бактерий или других одноклеточных организмов. Согласно этой теории, свободно живущие микроорганизмы, нуждавшиеся в ряде готовых питательных веществ, могли стать паразитами других организмов, служивших для них поставщиками питательных веществ. Гипотеза регressiveвой эволюции не может объяснить разнообразия генетического материала у вирусов, неклеточной их организации, дизъюнктивного

способа репродукции и отсутствия белоксинтезирующих систем. Поэтому в настоящее время эта гипотеза имеет скорее историческое значение и не разделяется большинством вирусологов.

Согласно второй гипотезе вирусы являются потомками древних, доклеточных форм жизни – протобионтов, предшествовавших появлению клеточных форм жизни, с которых и началась биологическая эволюция. Эта гипотеза также не разделяется в настоящее время большинством вирусологов, так как она не объясняет тех же вопросов, разрешить которые оказалась бессильной первая гипотеза.

Третья гипотеза предполагает, что вирусы произошли от генетических элементов клеток, ставших автономными, хотя не ясно, какие из этих элементов дали начало столь большому разнообразию генетического материала у вирусов. Эта гипотеза, которую иронически называли гипотезой «взбесившихся генов», находит наибольшее число сторонников. Однако не в том первоначальном виде, в каком она была высказана, так как и она не объясняет наличие у вирусов форм генетического материала (однонитчатая ДНК, двунитчатая РНК), отсутствующих в клетках, образование капсида, существование двух форм симметрии и т.п.

## **1. 2 Лекция № 2 (2 часа).**

**Тема: «Физическая структура и химический состав вирусов»**

### **1.2.1 Вопросы лекции:**

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

### **1.2.2 Краткое содержание вопросов**

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

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

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

Существуют два типа строения капсидов вирионов, которые обеспечивают образование структуры с минимумом свободной энергии - спиральный тип симметрии и кубический тип симметрии. При спиральном типе симметрии капсомеры соединяются с геномом образуя спиралевидную или винтообразную структуру. При кубическом типе

симметрии капсомеры соединяются друг с другом в правильные многогранники в центре которого расположен геном. Форма ДНК- и РНК - содержащих вирусов может быть разнообразной: сферической (у вируса ринопневмонии, ящура, болезни Ауески); палочковидной (у вируса бешенства, везикулярного стоматита), кирпичевидной (вируса оспы).

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

Сложноорганизованные вирусы содержат дополнительные оболочки, белковые или липопротеидные, и имеют более сложный химический состав. Помимо нуклеиновой кислоты и белков, они содержат липиды в наружных оболочках и углеводы в составе белков наружных оболочек (гликопротеидов). Обычно липиды и углеводы имеют клеточное происхождение. В составе некоторых вирусов обнаружаются также клеточные нуклеиновые кислоты и белки.

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

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

### **Вирусные ДНК.**

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

### **Вирусные РНК**

Из нескольких сотен известных в настоящее время вирусов человека и животных РНК-геном содержит около 80 % вирусов. Способность РНК хранить наследственную информацию является уникальной особенностью 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 обслуживают процесс внутриклеточной репродукции вируса на разных его этапах, но в состав вирусных частиц не входят.

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

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

К неструктурным белкам относятся:

- 1) предшественники вирусных белков;
- 2) ферменты синтеза РНК и ДНК (РНК- и ДНК-полимеразы), обеспечивающие транскрипцию и репликацию вирусного генома;
- 3) белки-регуляторы;
- 4) ферменты, модифицирующие вирусные белки, например протеиназы и протеинкиназы.

### **Липиды и углеводы вирусов.**

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

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

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

### **Углеводы.**

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

## **1. 3 Лекция №3 (2 часа).**

**Тема: «Систематика вирусов»**

### **1.3.1 Вопросы лекции:**

1. Принципы классификации вирусов.
2. Характеристика основных ДНК-содержащих вирусов.
3. Характеристика основных РНК-содержащих вирусов

### **1.3.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1. Принципы классификации вирусов**

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

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

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

Схема предложенная А.Львовом-Хорном-Турнье, стала основой универсальной системы классификации вирусов. Система базируется на условно-выбранных иерархических уровнях, соответствующих семейству, подсемейству, роду, виду. Общее число исследованных и охарактеризованных в настоящее время вирусов животных превышает 4000, а количество штаммов и разновидностей, имеющих значение для эпизоотологии, эпидемиологии и инфекционной патологии около 30000.

## **2. Характеристика основных ДНК-содержащих вирусов.**

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

### **Организация генома и репликация**

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

Семейство Herpesviridae включает 3 подсемейства: Alphaherpesvirinae, Betaherpesvirinae, Gammaherpesvirinae: подсемейство Alphaherpesvirinae включает 4 рода: Simplexvirus, Varicellovirus, Mareks disease – lake viruses», «Infectious laryngotracheitis-lake viruses»; в подсемейство Betaherpesvirinae входит 3 рода: Cytomegalovirus, Miromegalovirus, Roseolovirus; подсемейство Gammaherpesvirinae включает 2 рода: Lymphocryptovirus, Rhadinovirus.

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

Семейство Adenoviridae включает 2 рода: Mastadenovirus, Aviadenovirus.

Цикл репродукции адено вирусов разделяют на раннюю и поздние фазы. Вначале идет синтез вирусных РНК на матрице ДНК, до начала репликации ДНК. Ранние транскрипты считываются с обеих цепей ДНК под контролем нескольких промоторов. Синтез ранних и поздних РНК идет с участием клеточных полимераз. Ранняя фаза репликации вируса завершается синтезом ДНК, идет переключение на позднюю фазу во время которой осуществляется синтез структурных белков. Сборка вирионов: упаковка ДНК происходит в уже сформировавшийся капсид. В процессе сборки образуется некоторое количество дефектных частиц, т.е. частиц с неполной ДНК. Это происходит в результате обрыва ДНК при ее упаковке в пустой капсид.

Семейство Adenoviridae включает 2 рода: Mastadenovirus, Aviadenovirus. Вирион постоорганизованный, диаметр 70-90 нм, построен по кубическому типу симметрии, Геном 2 спиральная линейная ДНК, кодирует около 40 белков.

Семейство включает 1 род Circovirus. Вирус имеет четкую специфичность в отношении вида животного хозяина. Вирусы распространены повсеместно.

Простоорганизованный, кубический тип симметрии, диаметр 12,-26,5 нм. Геном 1 спиральная циркулярная ДНК., кодирует 1 структурный и 2 неструктурных белка.

Семейство Parvoviridae включает подсемейства Parvovirinae - включает 3 рода: Parvovirus, Erythrovirus, Dependovirus. Подсемейство Densovirinae – вирусы насекомых Densovirus. Вирион простоорганизованный, кубический тип симметрии, геном спиральная линейная ДНК, кодирует 8 белков, 3 из которых формируют капсид.

### **3 Характеристика основных РНК-содержащих вирусов**

Семейство Rhabdoviridae включает 6 рода: Lyssavirus, Vesiculovirus, Ephemerovirus, Novirhabdovirus, Cytorhabdovirus, Nucleorhabdovirus.

Морфология вируса – сложноорганизованный, спиральный тип симметрии, геном представлен 1-нитевой РНК (с негативной полярностью), кодирует 5 структурных R/1 5-7/0,5 S/E V/O

Семейство Paramyxoviridae включает 2 подсемейства: Paramyxovirinae и Pneumovirinae.

Подсемейство Paramyxovirinae включает 3 рода: Respirovirus, Rubulavirys, Morbillivirus

Подсемейство Pneumovirinae включает 2 рода: Pneumovirus, Metapneumovirus

Характеристика Paramyxoviridae сложноорганизованный, д=150 нм, спиральный тип симметрии. Геном представлен 1-нитевой РНК (с негативной полярностью), кодирует 5 структурных вирусных белка

Семейство Orthomyxoviridae включает 4 рода: Influenzavirus A, Influenzavirus , Influenzavirus C, Thogotovirus.

Характеристика Orthomyxoviridae - сложноорганизованный Д=80-120 нм, спиральный тип симметрии, геном представлен 1-нитевой фрагментированной РНК.

На поверхности вируса гриппа находятся 2 вида выступов, представленные гемагглютинином (НА) и нейраминидазой (НА). Различают 15 разновидностей НА, 9 разновидностей НА

Семейство Bunyaviridae - сложноорганизованный, д=80-120 нм, спиральный тисимметрии. Геном представлен 1-нитевой фрагментированной РНК, кодирует синтез 4 структурных белков. Семейство Bunyaviridae включает 5 родов: Bunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, Phlebovirus, Tospovirus.

Семейство Picornaviridae включает 6 родов: Enterovirus, Rhinovirus, Cardiovirus , Aphthovirus, Hepatovirus, Parechovirus. - пареховирус человека. Вирус накапливается в клетках желудочно-кишечного тракта, что сопровождается диареей и часто с признаками поражения респираторного тракта. Характеристика вирионов - простоорганизованный, кубический тип симметрии. Геном представлен 1-нитевой РНК (с позитивной полярностью), кодирует синтез 4 структурных белка.

Семейство Flaviviridae Семейство Flaviviridae включает 3 рода: Flavivirus, Pestivirus, Hepacivirus. Характеристика вириона: сложноорганизованный, д=40-60 нм, кубический тип симметрии. Геном представлен 1-нитевой РНК (с позитивной полярностью), кодирует синтез 3-4 структурных белка

## **1. 4 Лекция №4 (2 часа).**

**Тема: «Репродукция вирусов»**

### **1.4.1 Вопросы лекции:**

1. Начало инфекции:
2. Адсорбция вируса на клетке

3. Проникновение вируса в клетку
4. Раздевание или депротеинизация вируса

#### **1.4.2 Краткое содержание вопросов:**

##### **1. Начало инфекции:**

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. 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 мембранны, и образования *рецепторных полей*. 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.

##### **2. Проникновение вируса в клетку**

*Проникновение вирусов в клетку* возможно 2 способами: 1) путем виропексиса или рецепторного эндоцитоза. 2) путем слияния вирусной и клеточной мембран.

*Виропексис* – частный случай рецепторного эндоцитоза – обычный путь поступления в клетку питательных веществ. Эндоцитоз обеспечивает транспорт вирусной частицы в соответствующие внутриклеточные участки.

Проникновение вируса в клетку путем слияние вирусной и клеточной мембран характерен для сложноорганизованных вирусов слияние происходит за счет точечного взаимодействия вирусного белка слияния с липидами клеточной мембранны. В результате внутренний компонент вируса оказывается в клетке. У простоорганизованных вирусов один из поверхностных белков капсида взаимодействует с липидами клеточных мембран и внутренний компонент вируса оказывается в клетке.

Проникающие 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. 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.

### **3. Раздевание или депротеинизация вируса**

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 ЕCHO имеет следующие стадии: вирионы (156 S) A-частицы (130 S) РНП и пустые капсиды (80 S) РНК с терминальным белком (12 S).

## **1.5 Лекция №5 (2 часа).**

**Тема: «Репродукция вирусов»**

### **1.5.1 Вопросы лекции:**

1. Экспрессия вирусного генома. Транскрипция
2. Трансляция
3. Репликация
4. Сборка вирусных частиц и выход вируса из клетки

### **1.5.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1.Экспрессия вирусного генома. Транскрипция**

Экспрессия вирусного генома - второй этап репродукции –включает транскрипцию, трансляцию, репликацию генома, сборку вирусных частиц и выход вируса из клетки.

Транскрипция - это переписывание ДНК на РНК по законам генетического кода. Это означает, что РНК состоит из нуклеотидных последовательностей, комплементарных ДНК. Реализация генетической информации у вирусов. Стратегия вирусного генома в отношении синтеза иРНК у разных вирусов различна. У ДНК-содержащих вирусов иРНК синтезируется на матрице одной из нитей ДНК. Формула переноса генетической информации у них такая же, как и в клетке. ДНК-содержащие вирусы, репродукция которых происходит в ядре, используют для транскрипции клеточную полимеразу. К этим вирусам относятся папилломавирусы, полиомавирусы, адено-вирусы, вирусы герпеса. ДНК-содержащие вирусы, репродукция которых происходит в цитоплазме, не могут использовать клеточный фермент, находящийся в ядре. Транскрипция их генома осуществляется вирусспецифическим ферментом -ДНК-полимеразой, которая проникает в клетку в составе вируса. К этим вирусам относятся вирусы оспы и асфавирусы. РНК-содержащие вирусы, у которых хранителем генетической информации является не ДНК, а РНК, решают эту проблему особым образом. У РНК-содержащих «плюс-нитевых» вирусов, у которых функции иРНК выполняет сам геном, передача генетической информации осуществляется по наиболее простой формуле: РНК - белок. К этой группе вирусов относятся пикорнавирусы, тогавирусы, коронавирусы. У них нет необходимости в акте транскрипции для синтеза вирусспецифических белков. Поэтому транскрипцию как самостоятельный процесс у этих вирусов не выделяют. Иначе обстоит дело у вирусов, геном которых не может выполнять функцию иРНК. В клетке синтезируется комплементарная геному РНК, которая и является информационной. Передача

генетической информации у этих вирусов осуществляется по формуле: РНК - РНК - белок. У этих вирусов транскрипция выделена как самостоятельный процесс в инфекционном цикле. К ним относятся две группы вирусов животных. Вирусы, геном которых представлен однонитчатой РНК: ортомиксовирусы, парамиксовирусы, рабдовирусы, буньявирусы. Поскольку геномная РНК этих вирусов является «минус-нитью», указанную группу вирусов называют «минус-нитевыми» вирусами. Вирусы, геном которых представлен двунитчатой РНК (диплорнавирусы). Среди вирусов животных к ним относятся реовирусы. В клетке нет фермента, который может полимеризовать нуклеотиды на матрице РНК. Эту функцию выполняет вирусспецифический фермент -РНК-полимераза, или транскриптаза, которая находится в составе вирусов и вместе с ними проникает в клетку.

Среди РНК-содержащих вирусов животных есть семейство ретровирусов, которые имеют уникальный путь передачи генетической информации. РНК этих вирусов переписывается на ДНК, ДНК интегрирует с клеточным геномом и в его составе переписывается на РНК, которая обладает информационными функциями. Путь передачи генетической информации в этом случае осуществляется по более сложной формуле: РНК - ДНК - РНК – белок. В составе этих вирусов есть уникальный вирусспецифический фермент, который переписывает РНК на ДНК. Этот процесс называется обратной транскрипцией, а фермент -обратная транскриптаза, или ревертаза. Транскрипция в зараженной клетке. Синтез комплементарных РНК на родительских матрицах с помощью родительской транскриптазы носит название первичной транскрипции в отличие от вторичной транскрипции, происходящей на более поздних стадиях инфекционного цикла на вновь синтезированных, дочерних матрицах, с помощью вновь синтезированной транскриптазы. Большая часть иРНК в зараженной клетке является продуктом вторичной транскрипции.

## **2. Трансляция.**

Процесс трансляции состоит из трех фаз: 1) инициации, 2) элонгации и 3) терминации. Трансляция в зараженных вирусом клетках. Стратегия вирусного генома, использующего клеточный аппарат трансляции, должна быть направлена на создание механизма для подавления трансляции собственных клеточных иРНК и для избирательной трансляции вирусных иРНК, которые всегда находятся в значительно меньшем количестве, чем клеточные матрицы. Этот механизм реализуется на уровне специфического узнавания малой рибосомальной субъединицей вирусных иРНК, т. е. на уровне формирования инициирующего комплекса. Поскольку многие вирусы не подавляют синтез клеточных иРНК, в зараженных клетках возникает парадоксальная ситуация: прекращается трансляция огромного фонда функционально активных клеточных иРНК, и на освободившихся рибосомах начинается трансляция одиночных молекул вирусных иРНК. Специфическое узнавание рибосомой вирусных иРНК осуществляется за счет вирусспецифических инициаторных факторов. Два способа формирования вирусных белков. Поскольку геном вируса животных представлен молекулой, кодирующей более чем один белок, вирусы поставлены перед необходимостью синтеза либо, длинной иРНК, кодирующей один гигантский полипептид-предшественник, который затем должен быть нарезан в специфических точках на функционально активные белки, либо коротких моногистронных иРНК, каждая из которых кодирует один белок. Таким образом, существуют два способа формирования вирусных белков: 1) иРНК транслируется в гигантский полипептид-предшественник, который после синтеза последовательно нарезается на зрелые функционально активные белки; 2) иРНК транслируется с образованием зрелых белков, или белков, которые лишь незначительно модифицируются после синтеза.

Модификация вирусных белков. В эукариотической клетке многие белки, в том числе вирусные, подвергаются посттрансляционным модификациям, и зрелые функционально активные белки часто не идентичны их вновь синтезированным

предшественникам. Широко распространены такие посттрансляционные ковалентные модификации, как гликозилирование, ацилирование, метилирование, сульфирование (образование дисульфидных связей), протеолитическое нарезание и, наконец, фосфорилирование. В результате вместо 20 генетически закодированных аминокислот из различных клеток разных органов эукариотов выделено около 140 дериватов аминокислот. Среди широкого спектра модифицированных реакций лишь небольшое количество процессов является обратимыми: 1) фосфорилирование-дефосфорилирование; 2) ацилирование-деацилирование; 3) метилирование-деметилирование; 4) образование дисульфидных связей.

### **3. Репликация генома.**

Репликация вирусных ДНК. Репликация генома ДНК- содержащих вирусов в основном катализируется клеточными фрагментами и механизм ее сходен с механизмом репликации клеточной ДНК. Такой механизм репликации называется полуконсервативным.

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

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

Репликация вирусных РНК. В клетке нет ферментов, способных осуществить репликацию РНК. Поэтому ферменты, участвующие в репликации, всегда вирусспецифические. Репликацию осуществляют тот же фермент, что и транскрипцию; репликаза является либо модифицированной транскриптазой, либо при репликации соответствующим образом модифицируется матрица.

Репликация однонитчатых РНК осуществляется в два этапа: вначале синтезируются комплементарные геному нити, которые в свою очередь становятся матрицами для синтеза копий генома. У «минус-нитевых» вирусов первый этап репликации - образование комплементарных нитей сходен с процессом транскрипции. Однако между ними есть существенное отличие: если при транскрипциичитываются определенные участки генома, то при репликации читаются весь геном.

### **4. Сборка вирусных частиц.**

Синтез компонентов вирусных частиц в клетке разобщен и может протекать в разных структурах ядра и цитоплазмы. Вирусы, репликация которых проходит в ядрах, условно называют ядерными. В основном это ДНК-содержащие вирусы: адено-вирусы, папо-вирусы, парво-вирусы, вирусы герпеса. Вирусы, реплицирующиеся в цитоплазме, называют цитоплазматическими. К ним относятся из ДНК-содержащих вирус осьи и большинство РНК-содержащих вирусов, за исключением ортомиксовирусов и ретровирусов. Однако это разделение весьма относительно, потому что в репродукции тех и других вирусов есть стадии, протекающие соответственно в цитоплазме и ядре.

Существуют два способа выхода вирусного потомства из клетки: 1) путем «взрыва»; 2) путем почкования. Выход из клетки путем взрыва связан с деструкцией клетки, нарушением ее целостности, в результате чего находящиеся внутри клетки зрелые вирусные частицы оказываются в окружающей среде. Такой способ выхода из клетки присущ вирусам, не содержащим липопротеидной оболочки (пикорна-, рео-, парво-, папова-, адено-вирусы). Однако некоторые из этих вирусов могут транспортироваться на клеточную поверхность до гибели клетки. Выход из клеток путем почкования присущ вирусам, содержащим липопротеидную мембрану, которая является дериватом клеточных мембран. При этом способе клетка может длительное время сохранять жизнеспособность и продуцировать вирусное потомство, пока не произойдет полное истощение ее ресурсов.

## **1. 6 Лекция №6 (2 часа).**

**Тема: «Патогенез вирусных инфекций**

### **1.6.1 Вопросы лекции:**

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

### **1.6.2 Краткое содержание вопросов**

#### **1. Стадии вирусного патогенеза на уровне клетки и организма.**

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

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

Специфические стадии вирусного патогенеза.

*Проникновение вируса в организм.*

Способы проникновения вируса в организм.

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

*Первичная репликация.*

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

*Распространение вируса.*

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

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

*Клеточный и тканевой тропизм.*

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

#### **2. Повреждение вирусом клеток**

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

В клетках зараженных цитолитическим вирусом происходят резкие биохимические сдвиги. При репродукции вируса в зараженной клетке образуются ранние белки,

подавляющие синтез клеточных белков. На поздних стадиях инфекционного цикла в клетке накапливаются большое количество вирусных макромолекул, часть из которых представлена капсидными белками. Капсидные белки часто бывают токсичны для клетки, вызывая цитопатический эффект. Под действием вируса повышается проницаемость мембран лизосом и выход ферментов в цитоплазму. Происходит округление клеток, прогрессирует автолитический процесс, осуществляемый лизосомальными ферментами.

Наиболее характерными морфологические изменения в клетках, зараженных вирусом это обнаруженные еще в прошлом веке – тельца-включения. Тельца включения могут быть представлены скоплениями вирионов, вирусных белков, продуктами деструкции клеток. В связи с тем, что их можно видеть с помощью светового микроскопа, тельца включения полезны, как гистологические индикаторы вирусной инфекции.

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

При репродукции вируса в клетке возможно возникновение хромосомных aberrаций.

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

В результате интеграции вирусного генома в клеточный возможна трансформация клеток.

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

#### *Иммунный ответ и другие защитные факторы хозяина.*

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

### **3. Персистенция вируса, латентность и медленные вирусные инфекции**

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

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

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

#### *Факторы патогенности персистентных инфекций.*

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

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

При каких условиях возможно формирование персистентной и латентной инфекции?

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

Механизмы формирования персистентных инфекций.

1. Ограничение цитолитического эффекта.

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

Б) При определенных условиях некоторые цитоцидные вирусы могут персистировать.

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

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

А) Интеграция вирусного генома в клеточный.

Б) Сохранение вирусного генома в виде плазмида.

Отсутствие или резкое снижение иммунного ответа со стороны хозяина.

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

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

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

Механизмы ускользания от иммунного ответа.

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

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

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

Ускользание вируса от распознавания его Т-клетками.

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

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

Вмешательство в презентацию антигена.

Вмешательство в функции цитокинов.

Иммунологическая толерантность.

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

### **1. 7 Лекция №7 (2 часа).**

**Тема: «Особенности противовирусного иммунитета»**

#### **1.7.1 Вопросы лекции:**

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

#### **1.7.2 Краткое содержание вопросов:**

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

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

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

В понятие противовирусный иммунитет входят три категории защитных механизмов:

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

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

##### **2. Неспецифические факторы противовирусного иммунитета: температура, ингибиторы, комплемент, интерферон, гормоны.**

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 ( $\beta$ -ингибиторы) и термостабильные ( $\alpha$ - и  $\gamma$ - 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. Этую функцию интерфероны выполняют, регулируя чувствительность клеток к цитокинам и экспрессию на мембранах клеток молекул главного комплекса гистосовместимости I типа.

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

Непрямые противоопухолевые эффекты интерферона:

- стимуляция активности клеток иммунной системы;
- усиление экспрессии на клетках молекул гистосовместимости I класса.

### **3. Специфические факторы противовирусного иммунитета: а) клеточный иммунитет, б) гуморальный иммунитет.**

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

#### **4. Иммунопатология при вирусных болезнях животных.**

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

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

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

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

*Вирусы имеют свои стратегии обхода иммунологического контроля*

Вирусы со своей стороны обладают разнообразными свойствами **защиты от распознавания антителами**.

Наиболее эффективно этому служит смена антигенов: в вирусных белках, которые обычно становятся мишениями для антител, происходит изменение иммунодоминантных областей. Антигенная изменчивость наблюдается у вирусов иммунодефицита человека и ящура, а также у вируса гриппа; в последнем случае она названа антигенным дрейфом и шифтом. Гуморальный иммунитет к этим вирусным инфекциям сохраняется лишь до появления нового сероварианта возбудителя, что не позволяет рассчитывать на долговременный эффект вакцинации.

Герпесвирусы кодируют гликопroteины, связывающие IgG через Fc-фрагмент, т. е. обладают FcγR-активностью, которая нарушает активацию комплемента и блокирует действие противовирусных антител.

Некоторые вирусы способны противодействовать эффекту интерферонов: они продуцируют короткие отрезки РНК, которые конкурируют за протеинкиназу и таким-то образом подавляют активацию этого фермента. У вируса гриппа неструктурный белок (NS) - ингибирует действие интерферона.

Ряд вирусов кодирует белки, ингибирующие перенос молекул МНС класса I на плазматическую мембрану клетки. Это дает вирусу преимущество, помогая избежать распознавания цитотоксическими Т-клетками.

Отдельные вирусы обладают генами белков, гомологичных цитокиновым рецепторам или даже самим цитокинам.

(Цитокины являются важной частью противовирусного иммунитета.) - -  
Некоторые вирусные белки вмешиваются в функцию цитокинов : например, ранние белки аденонарвусов, которые предотвращают лизис зараженных клеток фактором некроза опухолей.

- Вирус оспы кодирует белок (T2) ингибирующий действие этого же фактора (т.к. он гомологичен по клеточному рецептору фактора некроза опухолей и тем самым препятствует взаимодействию фактора некроза опухолей со своим рецептором

Белок (BCR F1) вируса Эпштейн-Барра является гомологом интерлейкина-10 и может блокировать синтез интерлейкина -2 и  $\gamma$ -ИНФ

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

(Процесс образования иммунных комплексов является нормальным механизмом выведения антигена из организма, но в некоторых случаях может быть причиной болезни. Значение иммунных комплексов в патологии животных определяется их свойствами, которые, в свою очередь, зависят от входящих в состав комплекса антигена и антител и их соотношения в составе комплекса.)

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

Это приводит к повышению проницаемости сосудов, развитию воспаления, часто сопровождающегося деструкцией тканевых структур и патогенетические последствия в виде васкулитов и гломерулонефритов наблюдаются при диарее, инфекционной анемии лошадей, болезни Гамборо, классической и африканской чуме свиней, алеутской болезни норок.

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

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

клеткам иммунной системы. Это наблюдается, например, при инфекциях нервной системы, вызванных вирусом Тейлера и вирусом гепатита мыши, когда мишениями для антител и Т-клеток становятся компоненты миелиновой оболочки аксонов.

#### *Молекулярная мимикрия*

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

Еще один механизм повреждения тканей хозяина это - Повреждение тканей хозяина цитотоксическими Т-клетками

В том числе и клеток имеющих гематоэнцефалический барьер

(При любой вирусной инфекции некоторая часть тканевых повреждений вызвана Т-клеточной активностью. Иногда в эксперименте они настолько существенны, что могут вызвать гибель животного. Яркий пример этого - поражение клеток центральной нервной системы мыши цитотоксическими Т-клетками при иммунном ответе на заражение LCMV. Удаление Т-клеток спасает животных от гибели; таким образом, именно Т-клетки, а не вирусы, повреждают ткани мозга. Подобный механизм предположительно действует в патогенезе хронического активного гепатита у человека.)

Вирусы способны инфицировать клетки иммунной системы

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

Для некоторых вирусов хозяевами являются иммунокомпетентные клетки.

Так В-лимфоциты являются клетками-хозяевами для вируса Эпштейна-Барр,  $\gamma$ -герпесвируса мышей, вируса инфекционного бронхита кур.

Т-лимфоциты – хозяева Т-клеточного лимфотропного вируса 1 и 2 типа; ВИЧ; вируса кори; герпесвируса человека 6 типа.

Макрофаги – чувствительны к вирусу висны, ВИЧ, ЦМВ.

Вирус иммунодефицита человека инфицирует Т-клетки  $CD4^+$  (фильм) Т-клетки и макрофаги поглощают ВИЧ вследствие того, что вирусный гликопротеин gp120 связывается с маркером CD4 и с определенными рецепторами для хемокинов, CCR3 и CCR5. Подобным же образом ВИЧ проникает в любую другую антигенпрезентирующую клетку. Противовирусные антитела могут способствовать этому процессу, если клетка обладает Fc-рецептором. По сути это альтернативный способ внедрения вируса в фагоцитарные клетки или механизм, усиливающий проникновение, в том случае когда CD4 присутствует в малом количестве.

Одна из основных причин иммунодефицита при ВИЧ массовая гибель Т-хелперов. Она наступает в следствие следующих событий:

Во-первых, при выходе вновь синтезированных вирионов у Т-хелперов разрушается мембрана, что ведет к гибели;

Во-вторых, Т-киллеры распознают и уничтожают инфицированные вирусом клетки несущие на своей поверхности молекулы gp 120.

Вследствие разрушения мембран Т-хелперов происходит снижение экспрессии мембранных рецепторов у В-лимфоцитов к ИЛ-2, нарушается синтез различных ИЛ (фактора роста и дифференцировки В-лимфоцитов ИЛ-4; ИЛ-5; ИЛ-6 и др) в результате нарушается система Т-киллеров. Происходит подавление системы комплемента и макрофагов.

Инфицированные вирусом макрофаги и моноциты долго не гибнут, но они не способны удалять вирус из организма.

Вирус лейкемии кошек (FeLV), парвовирусы вызывают вирус-индуцированную иммунную дисфункцию через различные механизмы.

**Вирусы способны вызывать пролиферативные процессы** (оказывать действие на лимфоидные ткани).

Действие может проявляться:

- разрушением лимфоидных тканей;
- стимуляцией лимфоидных тканей к необычному росту;
- образование опухолей.

**Вирусы способны подавлять функции иммунной системы - иммуносупрессия.**

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

## ВЫВОДЫ:

- 1) Иммунный ответ на вирусную инфекцию обеспечивается факторами неспецифической защиты (ИФН, NK, макрофагами и др.) и адаптивного иммунитета (T-киллерами, T-хеллерами, антителами)
- 2) Клетки иммунной системы находятся в непрерывном взаимодействии обеспечивая оптимальный ответ на данный возбудитель.
- 3) Взаимодействие вируса с иммунной системой организма ведет к выработке иммунитета или сопровождается формированием иммунопатологий.

## 1. 8 Лекция №8 (2 часа).

### Тема: «Профилактика и химиотерапия вирусных инфекций»

#### 1.8.1 Вопросы лекции:

1. Принципы получения живых вакцин, требования предъявляемые к живым вакцинам их преимущества и недостатки.
2. Принципы получения инактивированных вакцин, способы увеличения их иммуногенной активности, преимущества и недостатки
3. Принципы получения синтетических вакцин, их преимущества и недостатки
4. Принципы получения генно-инженерных вакцин, их преимущества и недостатки
5. Химиотерапия вирусных инфекций.

#### 1.8.2 Краткое содержание вопросов:

#### 1. Принципы получения живых вакцин, требования предъявляемые к живым вакцинам их преимущества и недостатки.

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

Антigenность 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 маловосприимчивым или невосприимчивым организмам; 2) селекции природно-ослабленных штаммов вирусов при атипично или латентно протекающих инфекциях; 3) использование гетерогенных антигенно родственных апатогенных штаммов в качестве живых вакцин.

Главным преимуществом живых вакцин является то, что они активируют все компоненты иммунной системы, вызывая сбалансированный иммунный ответ. Живые вакцины, полученные на основе аттенуированных вакцинальных 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.

## **2. Принципы получения инактивированных вакцин, способы увеличения их иммуногенной активности, преимущества и недостатки**

В инактивированной вакцине вирусный ген 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 антигенность вакцины.

Из физических факторов наиболее часто используют  $\gamma$ -лучи, УФ- лучи, влияние температуры. Но чаще в качестве инактиваторов используют химические вещества такие как формальдегид,  $\beta$ -пропиолактон, гидроксилимин.

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 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 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.

### **3. Принципы получения синтетических вакцин, их преимущества и недостатки**

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

Процесс получения субъединичных вакцин сложный и дорогостоящий. Субъединичные вакцины менее реагогены, 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.

### **4. Принципы получения генно-инженерных вакцин, их преимущества и недостатки**

Третий способ – генно-инженерный. Это микробиологический синтез продуктов, аналогичных протективным антигенным детерминантам (эпипотапам). 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 адъювантов 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.

Основные способы повышения иммуногенности вакцины:

1. включение в вакцину максимального количества эпитопов антгена;
2. адсорбция на веществах создающих депо антигена;
3. высокая степень очистки от балластных веществ;
4. смешивание с маслом, добавление растительных, микробных и других адьювантов или искусственных носителей - полиоксидоний;
5. улучшение условий процессинга и прехентации антигена.

## **5. Химиотерапия вирусных инфекций.**

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

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

По характеру действия и клинической значимости АВП подразделяются:

Этиотропные

Иммуномодулирующие

Патогенетические

Симптоматические

Этиотропные препараты можно разделить на несколько групп по действию на определенную стадию репродукции:

Ингибиторы адсорбции, проникновения и депротеинизации – ремантадин, амантадин.

Ингибиторы синтеза вирусных компонентов – группа аномальных нуклеозидов – зивудин, ацикловир, рибавирин.

Ингибиторы сборки и освобождения вирусного потомства –метисазоны.

Ингибиторы протеаз – гордокс, контрикал, апротинин и др.

Особое место занимают интерфероны и индукторы ИФН.

Использование интерфероногенов имеют преимущества перед использованием экзогенного интерферона

### **1. 9 Лекция №9 (2 часа).**

**Тема: «Вирусы бешенства**

#### **1.9.1 Вопросы лекции:**

1.Общая характеристика болезни: распространение, резервуар, клиническая картина, патологоанатомические изменения, локализация вируса в организме, выделение из организма

2. Характеристика возбудителя: морфология, химический состав, антигенная структура, антигенная активность

3. Вариабельность патогенных штаммов, культивирование, особенности репродукции

4. Диагностика, иммунитет и профилактика бешенства

#### **1.9.2 Краткое содержание вопросов:**

## **1. Общая характеристика болезни: распространение, резервуар, клиническая картина, патологоанатомические изменения, локализация вируса в организме, выделение из организма**

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

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

Степень и скорость распространения бешенства зависят:

- 1 - образа жизни диких животных разных видов
- 2 - вирулентности местных штаммов вируса
- 3 - характера эпизоотического процесса.

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

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

Проромальная стадия характеризуется: продолжительностью от 12 часов до 3 суток

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

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

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

При тихой (паралитической) форме бешенства стадия возбуждения выражена слабо

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

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

## **2. Характеристика возбудителя: морфология, химический состав, антигенная структура, антигенная активность.**

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

Устойчивость вируса к физико-химическим воздействиям:

Низкие температуры консервируют вирус

При температуре 23 °C вирус инактивируется через 28-53 дня, при 50 °C через 1 час, 60 °C -10 минут, 70 °C – мгновенно, 1-5 % р-р формалина за 5 минут, 2% р-р фенола за 24 часа, 5% р-р фенола за 5-10 минут, 1% KMnO<sub>4</sub> за 20 минут, 3-5% HCL за 5 минут, 19% раствор йода за 5 минут.

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

### **3. Вариабельность патогенных штаммов, культивирование, особенности репродукции.**

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

На лабораторных животных при интрацеребральном заражении. В первичной культуре клеток почки хомячка. Эмбриона овец, куриных фибробластов, слюнных желез собак. В перевиваемой культуре клеток ВНК-21, крольчего эндотелия, почек эмбриона свиней, и др.

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

Особенности репродукции вируса бешенства:

Проникновение в клетку - путем эндоцитоза. (слияния вирусной и клеточной мембран). После проникновения вирусная оболочка удаляется за счет лизосомной активности.

Место репродукции - цитоплазма клеток. Транскрипция (первичная) начинается с помощью вирионной транскриптазы. Образуются полиаденилированные мРНК. Трансляции мРНК происходит на рибосомах. После этого события происходит репликация генома. Затем вторичная транскрипция, трансляция и репликация с последующей сборкой вирусной частицы.

Механизм выхода из клетки - путем «почкования»

### **4. Диагностика, иммунитет и профилактика бешенства**

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

Патологоанатомические изменения не характерные.

Иммунитет: Постинфекционного иммунитета - нет.

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

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

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

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

### **1. 10 Лекция №10 (2 часа).**

**Тема: «Вирусы ящура »**

#### **1.10.1 Вопросы лекции:**

1. Общая характеристика заболевания, распространение, спектр патогенности.
2. Морфология, систематика возбудителя. Устойчивость к физико-химическим факторам.
3. Культивирование вируса. Репродукция в клетке. Антигенная структура, антигенная вариабельность.

4. Источники и пути передачи возбудителя болезни. Иммунитет. Диагностика. Профилактика.

### **1.10.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1. Общая характеристика заболевания, распространение, спектр патогенности.**

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

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

Исход болезни: выздоровление; гибель животного.

Продолжительность инкубационного периода.

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

Клинические признаки в начале болезни неспецифические.

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

При злокачественном течении наблюдается поражение сердечной и скелетной мышц - «тигровое» сердце. Животные при злокачественном течении погибают.

Злокачественное течение чаще наблюдается у молодняка (гибель может достигать до 80 и более %), афт как правило нет

#### **2. Морфология, систематика возбудителя. Устойчивость к физико-химическим факторам.**

Семейство: Picornaviridae Род: *Aphthovirus*

Характеристика вируса ящура

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

Устойчивость к физико-химическим воздействиям

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

#### **3. Культивирование вируса. Репродукция в клетке. Антигенная структура, антигенная вариабельность.**

Вирус культивируется на естественно-восприимчивых животных

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

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

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

**Антигенная структура.**

VP1 - индуцирует выработку вируснейтрализующих антител, VP2,

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

**Антигенная вариабельность**

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

#### **4. Источники и пути передачи возбудителя болезни. Иммунитет.**

##### **Диагностика. Профилактика.**

Источники инфекции - больные животные и вирусоносители.

Важную эпизоотологическую роль в распространении ящура играют диких парнокопытных животных.

Вирус очень контагиозен

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

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

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

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

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

**Иммунитет**

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

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

#### **1. 11 Лекция №11 (2 часа).**

##### **Тема: «Вирусы болезни Ауески»**

###### **1.11.1 Вопросы лекции:**

1. Характеристика болезни: определение болезни, клиническая картина, патологоанатомические изменения, патогенез
2. Характеристика возбудителя болезни Ауески: морфология, химический состав, устойчивость, антигенная активность
3. Культивирование, экспериментальная инфекция, особенности внутриклеточной репродукции
4. Локализация, выделение, вирусоносительство, источники возбудителя болезни и пути заражения. Диагностика, иммунитет, профилактика

### **1.11. 2 Краткое содержание вопросов**

#### **1. Характеристика болезни: определение болезни, клиническая картина, патологоанатомические изменения, патогенез**

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

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

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

Клинические признаки у крупного рогатого скота

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

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

Признаков поражения центральной нервной системы - нет.

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

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

#### **2. Характеристика возбудителя болезни Ауески: морфология, химический состав, устойчивость, антигенная активность**

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

Устойчивость вируса болезни Ауески к физико-химическим воздействиям.

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

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

### **3. Культивирование, экспериментальная инфекция, особенности внутриклеточной репродукции**

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

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

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

Выход из клетки – путем «почкования».

### **4. Локализация, выделение, вирусоносительство, источники возбудителя болезни и пути заражения. Диагностика, иммунитет, профилактика.**

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

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

При проникновении через кожу вирус репродуцирует в месте внедрения и гематогенным и лимфогенным путями распространяется по организму. Болезнь сопровождается признаками тяжелой септицимии 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

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

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

#### **1. 12 Лекция №12 (2 часа).**

**Тема: «Вирусные пневмоэнтериты телят»**

**1.12.1 Вопросы лекции:**

1. Причины пневмоэнтеритов
2. Характеристика возбудителей пневмоэнтеритов
3. Диагностика пневмоэнтеритов

### **1.12.2 Краткое содержание вопросов:**

#### **1. Причины пневмоэнтеритов телят.**

Подавляющий процент среди болезней сельскохозяйственных животных принадлежит болезням вирусной этиологии.

Причина такой распространенности пневмоэнтеритов заключается в том, что:

1) полиэтиологичность - пневмоэнтериты могут вызывать вирусы из разных таксономических групп: А) вирусы: парагриппа-3 (ПГ-3); инфекционного ринотрахеита (ИРТ); аденоизы (АД); вирусная диарея (ВД); респираторно-синцитиальная инфекция (РСИ); ротовирус диареи новорожденных телят. Кроме того в развитии болезни могут принимать участие парво-, корона-, рота-, рео-, и вирусы других семейств; Б) наличие сопутствующей бактериальной микрофлоры (хламидии, колибактерий); В) существуют причины предрасполагающие к болезни - стрессовые факторы: переохлаждение, транспортировка, перегруппировки, различные технологические процедуры) - приводящие к истощению иммунной системы. Эти заболевания стали носить массовый характер, когда участвуют все 3 фактора или 2 из них.

2) Сложность диагностики.

3) При данных заболеваниях очень часто отмечается вирусоносительство и вирусовыделения .

Развитие инфекционного процесса представляется следующим образом:

Вирус, как возбудитель попадет в чувствительные клетки размножается в них вызывает гибель этой клетки. Эти погибшие клетки являются отличной средой для развития бактерий. И организм отвечает воспалительной реакцией. Если организм ослаблен, то это ведет к усилению воспалительной реакции и гибели организма.

Болезни вызывающие пневмоэнтериты имеют общие свойства:

- 1) Источником болезни служат больные животные и вирусоносители;
- 2) Пути передачи: воздушно-капельный, половой, со спермой (ИРТ);
- 3) В замкнутых хозяйствах телята заражаются от матерей, но поскольку они получали антитела с молозивом, то болезнь носит тлеющий характер

В не замкнутых хозяйствах, где телята поступают из разных хозяйств и несут свои вирусы, то собравшись вместе они перезаражают друг друга и болезнь носит массовый характер.

4) Все эти вирусы в организме вызывают поражение верхних дыхательных путей, пневмонии, энтериты.

У взрослых животных при ИРТ – происходит поражение наружных половых органов: вагиниты, вульвиты,

#### **2. Характеристика возбудителей пневмоэнтеритов**

Инфекционный ринотрахеит - остро протекающая контагиозная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся общим угнетением, воспалением слизистой оболочки дыхательных путей (респираторная форма), а также развитием пузырькового воспаления половых путей (вагинальная форма).

Семейство Herpesviridae Подсемейство: Alphaherpesvirinae Род Varicellovirus

Возбудитель Herpesvirus bovis

У крупного рогатого скота болезнь проявляется в пяти формах: поражение верхних дыхательных путей, вагинит, орхит, энцефалит, конъюнктивит и артрит. Кроме того, у телят возможна пневмония. При хронической серозно-гнойной пневмонии погибают до 20 % телят. У нетелей и коров болезнь может сопровождатьсяabortами на 6...8-месячных сроках беременности. При неосложненном течении болезнь обычно заканчивается выздоровлением через 10...14 сут.

**Патологоанатомические изменения.** Характер поражения зависит от формы проявления болезни. При респираторной форме обнаруживают признаки серозного конъюнктивита, катаральногнойного ринита, ларингита и трахеита. При генитальной форме на сильно воспаленной слизистой оболочке влагалища и вульвы видны пустулы, эрозии и язвочки. Кроме вульвовагинита обнаруживают серозно-катаральный, или гнойный, цервицит, эндометрит, мастит, у быков-производителей — фимоз и парофимоз. При энцефалитах в головном мозге — гиперемия сосудов, отечность тканей и мелкие кровоизлияния.

**Парагрипп-3 (ПГ-3)** - острое контагиозное заболевание крупного рогатого скота (преимущественно молодняка до 6-месячного возраста), характеризующееся катаральновгнойным воспалением органов дыхания, лихорадкой общим угнетением, приступами сухого болезненного кашля, катаральным конъюнктивитом.

**Клинические признаки.** Диапазон проявления болезни разнообразен — от легких ринитов или бронхитов до тяжелой бронхопневмонии. Клинические признаки появляются через 24...30 ч после введения вируса: повышение температуры тела и серозные истечения из носа, которые переходят в гнойные; дыхание поверхностное и частое, хрипы продолжаются до 14 сут; возможны abortы или рождение нежизнеспособных телят.

**Патологоанатомические изменения.** В основном наблюдаются в органах дыхания: слизистая оболочка носовой полости, трахеи и бронхов покрасневшая; в трахее и бронхах слизисто-гнойный пенистый экссудат; в легких участки уплотнения красного цвета. Заглоточные и бронхиальные лимфоузлы увеличены.

**Аденовирусная инфекция (АДИ)** - Остропротекающая инфекционная болезнь, характеризующаяся поражением органов дыхания, пищеварения и конъюнктивитами.

**Особенности течения:** болеют телята в возрасте от 2 недель до 4 месяцев.

**Инкубационный период** 4-7 дней.

**Заражение** происходит: воздушно-капельным, алиментарным путем, через конъюнктиву

**Клиника:** температура 41,5 °C, серозные и гнойные истечения из носа, кашель, тимпания, колики, диарея.

**Летальность** до 60%.

**Здоровые животные** всех возрастов – вирусоносители.

**Клинические признаки.** Инкубационный период составляет 4...7 сут. Болезнь характеризуется поражением органов дыхания, пищеварения (пневмонии, энтериты и пневмоэнтериты) и реже глаз. Чаще болеют телята в возрасте от 2 нед до 4 мес. Болезнь проявляется повышением температуры тела до 41,5 °C, слезотечением, серозным истечением из носа, кашлем, затрудненным дыханием, тимпанией и диареей. Истечения из глаз и носа слизистые, а затем слизисто-гнойные и гнойные. Телята гибнут через 1...3 сут, смертность доходит до 60 %.

**Патологоанатомические изменения.** Признаки геморрагического катарального гастроэнтерита, расстройства циркуляции крови. Изменения органов дыхания: уплотнения, ателектаз и эмфизема, пневмония легких.

**Вирусная диарея (ВД или болезнь слизистых)** - оструяя контагиозная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, эрозивно-язвенным воспалением слизистых оболочек пищеварительного тракта и дыхательных путей. Сопровождается кровавой диареей, конъюнктивитом, ринитом

**Особенности течения**

Болеют крупный рогатый скота от 2 месячного до 2 летнего возраста (чаще 5-6 мес)

Поражает от 2 до 100% поголовья

**Летальность** до 50%

**Инкубационный период** 2-14 дней

Температура 40,5-42 °C, гиперемия слизистых оболочек носовой полости

На слизистой оболочке ротовой полости покраснения, эрозии, язвы.

Изнуряющий понос со зловонными фекалиями, примесью слизи, крови, пузырьков воздуха.

Респираторно-синцитиальная инфекция (РСИ) - контагиозная, остро протекающая болезнь, характеризующаяся повышением температуры, преимущественным поражением органов дыхания

Особенности течения РСИ - очень контагиозное заболевание — через 2-3 часа может охватывать почти все поголовье. (Вспышки чаще в осенне-зимний и зимне-весенний периоды).

Ярко заболевание проявляется у телят 1-3 месячного возраста.

Болезнь проявляется в виде бронхопневмоний.

При солнечной погоде и хорошем кормлении выздоровление у молодняка через 3-5 дней, у взрослых животных — 8-10 дней.

(Особенно чувствительны чистокровный крупный рогатый скот герефордской породы )

Клинические признаки. У взрослых животных респираторно-синцитиальная инфекция протекает тяжелее, чем у молодняка, и проявляется бронхопневмонией. Болезнь продолжается 3...10 сут; смертельные исходы бывают редко. Процесс ограничивается повышением температуры, катаром верхних дыхательных путей и серозным ринитом (воспаление радужной оболочки глаз); возможны пневмонии и abortiones.

Патологоанатомические изменения. При исследовании респираторных путей у погибших телят обычно выделяют гигантские синцитиальные клетки в бронхиолах, дегенерацию и некроз эпителиальных клеток бронхиол и легочной ткани, явления инфильтрации.

Ротовирусная диарея новорожденных телят - остропротекающая контагиозная болезнь, характеризующаяся поражением желудочно-кишечного тракта

Особенности течения ротовирусной диареи новорожденных телят –

Значительный экономический ущерб: - гибель животных; замедление роста и развития, затраты на лечение, организацию и проведение оздоровительных мероприятий. Заболеваемость - 60-100%, летальность - 25 %.

Болеют телята первых 2-недель до 4 реже 6-7 недельного возраста.

Инкубационный период — 14-72 часа.

(Особенно тяжело болезнь протекает при поражении животных рота- и коронавирусами)

Клинические признаки, эпизоотологические особенности. Ротовирусная диарея новорожденных телят - инфекционная, остро протекающая болезнь, характеризующаяся профузным поносом, обезвоживанием организма и депрессией. Заболеваемость достигает 90%, смертность-5-25%. Болезнь встречается в странах с развитым скотоводством. Наиболее часто болезнь регистрируют поздней зимой и ранней весной. Телята заражаются в первые часы после рождения. Инкубационный период длится 12-24 часа. У заболевших в первые дни жизни телят, наблюдаются диарея, атония, слабость, отказ от воды, потеря аппетита. Цвет фекалий зависит от вида корма, иногда с примесью крови. Температура тела иногда поднимается до 41° С. Если инфекция не осложнется *E. coli*, то через 2-3 дня телята выздоравливают. Чем моложе теленок, тем продолжительнее диарея.

Патологоанатомические изменения. Основные изменения в толстом отделе кишечника. В отдельных участках кишечника ворсинки исчезают, крипты укорочены, ворсинки неоднородны, форма эпителиальных клеток изменена (кубическая форма), что приводит к изменению функции клеток. Поступающее в кишечник молоко не переваривается, накапливается в желудочно-кишечном тракте, обуславливая появление диареи.

### **3. Диагностика пневмоэнтеритов**

Патматериал для диагностики пневмоэнтеритов

От больных в первые 2-3 дня, или от убитых с диагностической целью в острой стадии заболевания

Смывы с носа, глаз, половых органов, пробы фекалий, смывы с прямой кишки

Парные сыворотки крови (первая сыворотка в первые 3 дня болезни и 2-ая через 3 недели не менее чем от 10-15 телят)

Лаковая кровь на вирусоносительство

От убитых — кусочки легких, трахеи, селезенки, кишечника, региональные лимфоузлы

Для диагностики ротовирусной инфекции в качестве патматериала берут

Не менее 10 проб жидких фекалий (взятых в первые 1-3 дни болезни)

Фрагмент тонкого кишечника с содержимым (взятого не позднее 1-2 часов с момента гибели или вынужденного убоя)

10-15 проб парных сывороток от больных

Не менее 10 проб сыворотки от коров

10 проб молозива

Транспортируют в термосе с охлаждающей смесью

Готовят 10%-ную суспензию на растворе Хенкса, центрифицируют 1ч при 3000 минут.

### **1. 13 Лекция №13 (2 часа).**

**Тема: «Вирусные болезни свиней»**

#### **1.13.1 Вопросы лекции:**

1. Характеристика возбудителя КЧС
2. Клинические признаки КЧС, профилактика, диагностика
3. Характеристика возбудителя АЧС
4. Клинические признаки АЧС, профилактика, диагностика

#### **1.13.2 Краткое содержание вопросов:**

##### **1. Характеристика возбудителя классической чумы свиней.**

Классическая чума свиней (КЧС) - Classikal swine Fever, Swine Fiver .- высоконтагиозная инфекционная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, поражением кровеносной и кроветворной систем, крупозным воспалением легких и крупозно-дифтерическим воспалением толстого кишечника.

Болезнь часто регистрируется в виде ограниченных энзоотических вспышек, наносящих, однако, значительный экономический ущерб.

Морфология и химический состав. Возбудитель относится к семейству: Flaviviridae род Pestivirus. Вирионы - оболочечные частицы диаметром 40-60 нм с нуклеокапсидом - диаметром около 29 нм.

Устойчивость. ВКЧС считается сравнительно малоустойчивым при 38 °C в сыворотке крови сохраняется до 18-20 суток, кипячение инактивирует вирус моментально. На стенах свинарников, на полях вирус сохраняет вирулентность в течение года; в свиных тушах при минус 20-25°c сохраняется до 6 месяцев.

Антigenная структура, вариабельность и родство. По вирулентности различают A-, B- и C-варианты вируса. Антigenная активность. В сыворотке крови свиней - реконвалесцентов обнаруживают ВНА, ПА и КСА. Вируснейтрализующие антитела возникают на 3-4 неделе после иммунизации или инфицирования и сохраняются до 1 года.

Экспериментальная инфекция. Легко воспроизводится на неиммунных подсвинках массой 40-50 кг при подкожном заражении.

Культивирование. Культивирование вируса в лабораторных условиях на неиммунных свиньях можно проводить практически бесконечно, но это достаточно

дорогой и небезопасно. Вирус удается репродуцировать также в первичной культуре клеток легких, селезенки, почки и лейкоцитов без выраженного ЦПД, а в перевиваемой культуре клеток почек поросят (РК-15) с ЦПЭ.

## **2. Клинические признаки КЧС, профилактика, диагностика**

Инкубационный период в зависимости от вирулентности вируса и чувствительности животных длится 3-9 дней, реже - 12, иногда - до 20 дней. КЧС может протекать сверхостро, остро, подостро и хронически. Некоторые исследователи выделяют особую нервную форму, когда доминирующий симптом болезни - поражение ЦНС.

Сверхострое течение обычно наблюдается у молодых животных. Температура тела повышается до 41-42°C, угнетение, рвота, появление ярко-красных пятен на коже. Гибель через 1-2 дня.

Острое течение помимо неспецифических клинических признаков, наблюдается запоры сменяющиеся поносом, слизисто-гнойный ринит. Появлением на коже в области живота, внутренней поверхности бедер, шеи, у основания ушных раковин - пустул с желтоватым экссудатом. Затем на коже появляются точечные кровоизлияния, которые сливаются образуя разлитые поражения ( пятна темно-багровые ) не исчезающие при надавливании. Нарушение сердечной деятельности, учащенное дыхание, синюшность кожи ушных раковин, живота, конечностей. Гибель на 7-10 день

При острой форме наблюдает иногда нервную форму - судорожные сокращения отдельных групп мышц, параличи конечностей, нервное возбуждение и гибель.

При подостром течение болезнь длится до 3 недель, иногда животные выздоравливают. Часты осложнения вторичной бактериальной инфекцией.

Хроническое течение- болезнь длится несколько месяцев. Проявляется тяжелым крупозно-дифтеритическим поражением ЖКТ, гноино-фибринозным поражением дыхательной системы. Возможно мертворождение, abortionы, рождение слабых нежизнеспособных поросят, которые погибают в возрасте 1-2 месяцев..

Источники и пути передачи инфекции. Источник инфекции - больные животные, выделяющие вирус во внешнюю среду с мочой, фекалиями и секретами слизистых оболочек глаз и носа, а также реконвалесценты.

Диагноз ставят на основании эпизоотологических данных, симптомов болезни, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований. Эпизоотические, клинические и патологоанатомические данные зависят от восприимчивости свиней, вирулентности штамма и комплекса мероприятий по профилактике КЧС.

Правильный диагноз может быть поставлен только лабораторными методами.

Иммунитет и специфическая профилактика.

Животные-реконвалесценты приобретают стойкий иммунитет, продолжающийся несколько лет. Пассивный иммунитет непродолжителен - до 10-12 дней.

Применение живых вакцин. Иммунитет при КЧС обусловлен ВНА. Лучшая из отечественных - вакцина ЛК-ВНИИВВиМ, получена на основе шт. К ВКЧС, который репродуцируется в гетерологичной системе - культуре клеток testiculärной ткани ягнят.

## **3. Характеристика возбудителя АЧС**

Африканская чума свиней (АЧС, болезнь Монтгомери) - Pestis africana suum - контагиозная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, геморрагическим диатезом, воспалительными и некротическими изменениями паренхиматозных органов.

Вирус АЧС относится к семейству: Asfaviridae, род: Asfivirus.

Характеристика вириона. Вирион состоит из нуклеопротеиновой коровой структуры, 70-100 нм в диаметре, окруженной внутренним липидным слоем, кубическим капсидом, 172-191 нм в диаметре, и внешней липидосодержащей оболочкой. Геном. ДНК, 170-190 kbp. 1 молекула, двусpirальная, линейная, с ковалентно закрытыми концами.

**Устойчивость.** Вирус АЧС исключительно устойчив в широком диапазоне температур и рН среды, включая высушивание, замораживание и гниение

**Антигенная структура.** Сложная. Возбудитель содержит групповые, комплементсвязывающие, преципитирующий и типовой гемадсорбирующий антигены. Вопросы о сущности инфекционного АГ, индуцирующего образование ВНА, остается до сих пор открытым.

**Антигенная вариабельность и родство.** На основании задержки гемадсорбции выделено две антигена: А- и В - группы (типы) и одна подгруппа С вириуса АЧС. В пределах А-, В -групп и С -подгруппы выявлено много серотипов этого возбудителя.

**Локализация вириуса.** Вириус обнаруживают во всех органах и тканях больных животных.

**Экспериментальная инфекция.** К экспериментальному заражению чувствительные свиньи. У экспериментально зараженных аргасовых клещей *Ornithodoros turicata* вириус выявляли методом биопробы в течение года. В кишечнике клеша установлено наиболее раннее и длительное присутствие вириуса.

**Культивирование.** Для культивирования вириуса АЧС могут быть использованы подсвинки 3-4-мес возраста, которых заражают любым способом.

**Источники и пути передачи инфекции.** Главный источник инфекции - больные и павшие свиньи. Переболевшие животные остаются длительное время носителями и выделятелями вириуса

**Спектр патогенности в естественных условиях.** В естественных условиях африканской чумой болеют домашние и дикие свиньи. У некоторых диких африканских свиней болезнь протекает субклинически.

#### **4. Клинические признаки АЧС, профилактика, диагностика**

**Клинические признаки и патологоанатомические изменения.** Они сходны с таковыми при КЧС АЧС проявлялась в виде интенсивной геморрагической септицемии - в высшей степени контагиозной, быстро протекающей болезни, вызывающей гибель всех контамированных животных. В естественных условиях инкубационный период длится 5-7 дней, в эксперименте срок его варьировал в зависимости от штамма и дозы вириуса. Различают сверхострое, острое, подострое, хроническое и латентное течение болезни

**Предположительный диагноз на АЧС** может быть поставлен на основании анализа клинико-эпизоотологических данных и патологоанатомических исследований. Основанием для подозрения АЧС может служить возникновение заболеваний с быстрым течением и высокой смертностью среди свинопоголовья, привитого против классической чумы свиней. Сходство клинических и патологоанатомических признаков классической и африканской чумы свиней затрудняет постановку диагноза

**Экспресс-метод обнаружения вириуса.** ДНК-зонда, ПЦР

**Индикация и идентификация вириуса.** При первичном возникновении АЧС лабораторная диагностика основана на выделении вириуса в культуре клеток костного мозга или лейкоцитов крови свиней, его идентификации в реакции ГАд или прямой ИФ и определения типовой принадлежности вириуса в РЗГАд

**Выделение и индикация вириуса в культурах клеток.** Наиболее достоверным и надежным лабораторным методом диагностики АЧС - выделение вириуса в клеточных культурах и идентификации его в РГАд, РДП, ИФ. Биопроба. Ставят с разрешения Департамента ветеринарии. При первичном подозрении на АЧС ее постановка обязательна. Биопробу ставят по одному из двух вариантов

**Иммунитет и специфическая профилактика.** В патогенезе и иммуногенезе АЧС аллергические или аутоаллергические реакции играют существенную роль. При действии аттенуированных штаммов вириуса на лимфоидные клетки происходит синтез неполноценных АТ, неспособных нейтрализовать вириус

## **1. 14 Лекция №14 (2 часа).**

**Тема: «Грипп птиц»**

### **1.14.1 Вопросы лекции:**

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

### **1.14.2 Краткое содержание вопросов:**

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

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

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

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

Устойчивость к физико-химическим воздействиям: при температуре 65 °С – погибает через 5-10 минут, прямой солнечный свет инактивирует вирус за 40 часов. Вирус стабилен при рН 7,0-8,0, неблагоприятна кислая среда. Вирус разрушается дезинфицирующими веществами: 0,1%І2; 1% раствором Люголя; 3% хлорная известь; 2% KOH; 5% креолин, эфиром, детергентами. Формалин инактивирует вирус, но не влияет на его гемагглютинирующие и Ag свойства.

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

Внутренний S-антител, представлен NP и M-антителом, которые являются типоспецифическим антигеном. Вирус обладает гемагглютинирующими свойствами.

### **2. Культивирование вируса. Репродукция в клетке**

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

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

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

### **3. Антигенная структура, антигенная вариабельность. Дрейф, шифт.**

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

Антигенная изменчивость:

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

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

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

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

Источниками вируса гриппа являются – больные животные и птицы.

Заражение происходит - воздушно-капельным путем

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

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

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

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

#### **5. Иммунитет. Диагностика.**

У лошадей после переболевания продолжительность иммунитета 1 год; после вакцинации с использованием живых или инактивированных вакцин 1 год. Переболевшие свиньи

приобретают иммунитет продолжительностью до 8-10 месяцев. У кур после переболевания иммунитет до 1-2 лет; после вакцинации до 1 года.

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

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

## **1. 15 Лекция №15 (2 часа).**

**Тема: «Вирусные болезни лошадей**

### **1.15.1 Вопросы лекции:**

1. Характеристика возбудителя ринопневмонии лошадей
2. Клинические признаки ринопневмонии лошадей, профилактика, диагностика
3. Характеристика возбудителя ИНАН
4. Клинические признаки ИНАН, профилактика, диагностика

### **1.15.2 Краткое содержание вопросов**

#### **1. Характеристика возбудителя ринопневмонии лошадей**

Возбудитель. Вирус относится к семейству Herpesviridae подсемейство Alphaherpesviridae род Varicellovirus. Вирионы сферической формы, сложноорганизованный, состоит из сердцевины, капсида, тегумента, суперкапсидной оболочки, размером около 100 нм, содержит ДНК – 2-нитевую, линейную, репродукция происходит в ядре клетки. Вирус ринопневмонии лошадей имеет два типа: один был выделен из абортированного плода, а другой от жеребят с респираторным синдромом.

Установлено что дефектные вирионы вируса ринопневмонии лошадей в онкогенной трансформации и персистентной инфекции.

Устойчивость. Вирус устойчив к pH от 4 до 10, при температуре минус 18-20 °C сохраняет активность до 2 лет. Вирус чувствителен к эфиру и хлороформу.

Культивирование. Вирус можно культивировать на куриных эмбрионах, хомячках и на мышатах-сосунах после предварительного адаптирования на них, а также на культуре клеток почки лошади и других видов животных. Культивируется в культуре почки лошади, где на 3-5 день проявляется ЦПД в виде округления клеток и деструкции монослоя. В клетках обнаруживаются внутриядерные ацидофильные включения.

Антigenная активность. В организме животных вирус вызывает образование комплементсвязывающих и вируснейтрализующих антител.

## **2. Клинические признаки ринопневмонии лошадей, профилактика, диагностика**

Клинические признаки. Инкубационный период составляет 3-4 недель. Чаще встречается поражение дыхательной системы 6-9 месячных жеребят. Болезнь регистрируется в основном в осенью и вначале зимы. При этом поднимается температура тела, обнаруживаются конъюнктивиты, ринит и ринофарингит, истечение из носа, увеличение подчелюстных лимфоузлов. При осложнении под действием условно-патогенных микроорганизмов развивается пневмония, которая приводит к гибели.

У жеребых кобыл болезнь проявляется как респираторными признаками, или толькоabortами. Больные животные (90%) могут абортировать. Редко болезнь проявляется параличами.

**Паталогоанатомические изменения.** Характерным признаком при вскрытии является: гепатит, в печени очаги некроза, наличие серозно-геморрагической жидкости в грудной полости, отек легких, точечные кровоизлияния на плевре, брюшине, перикарде и эпикарде, селезенке и печени, у абортировавших кобыл наблюдают рассеянный менингоэнцефалит.

**Локализация вируса.** Из организма больного животного вирус выделяется с истечениями с слизистой оболочки носа, половых органов.

**Диагноз.** Ставят на основании клинико-эпизоотологических, паталогоанатомических данных и результатов лабораторных исследований. Патологический материал: от больных жеребят берут смывы носовой полости и парные сыворотки крови, от трупов кусочки легких, печени, тимуса, в случае параличей – кусочки спинного и головного мозга.

**Схема лабораторной диагностики.** I. Экспресс-методы: РИФ, ИФА, РСК и гематологические исследования. II. Вирусологические исследования: 1) выделение активного вируса на беременных морских свинках или на хомячках, возможны на куриных эмбрионах и культуре клеток; 2) идентификация выделенного вируса в РИФ, РН, ИФА и РТГАд. III. Ретроспективная диагностика в РН и РСК.

**Иммунитет.** Переболевшие животные приобретают иммунитет до 4 месяцев, а у абортировавших животных - продолжительнее.

**Специфическая профилактика.** Применяют живые и инактивированные вакцины. Живая вакцина из штамма RAC-H, получена после адаптации вируса ринопневмонии к организму сирийского хомячка, а затем длительно пассированному в культуре клеток почки телят. Вакцину вводят 2-кратно на 3 и 6 месяце жеребости. Живая вакцина дает иммунитет до 1 года. Инактивированная вакцина используется жеребым кобылам вводится 2-3 раза и дает иммунитет продолжительностью до 6 месяцев, и защищает жеребят от заражения.

### **3. Характеристика возбудителя ИНАН**

**Возбудитель.** Вирус относится к семейству Retroviridae под Lentivirus, РНК-содержащий. Вирионы сферической формы, размером 90...140 нм; сложноорганизованный, построен по кубическому типу симметрии, в структуре вириона имеется обратная транскриптаза, РНК-однонитевая (диплоидный геном).

**Устойчивость.** Вирус достаточно устойчив к воздействию физико-химических факторов. В лиофильно-высушенном состоянии при 18 °C сохраняет вирулентность 7 месяцев; при температуре 0...2 °C выживает до 2 лет. При биотермической обработке навоза погибает через 30 суток. Вирус теряет свои вирулентные свойства при 58 °C через 1...2 ч, при кипячении через 1...2 мин; 2%-е растворы едкого натра и формальдегида убивают его за 20 мин. Чувствителен к эфиру, но устойчив к трипсину.

**Культивирование.** Возможно в переживающей ткани селезенки, надпочечников и лимфоузлов жеребят; в культурах клеток эмбриональной ткани лошадей без развития ЦПД. В культуре клеток лейкоцитов лошадей через несколько пассажей развивается характерное ЦПД на 4...9-е сутки культивирования.

**Антигенные свойства.** Антигенные типы и варианты вируса инфекционной анемии отсутствуют. Разные штаммы его, внедренные в различных местах земного шара, в антигенном отношении идентичны. В организме вирус вызывает образование вируснейтрализующих, комплементсвязывающих, преципитирующих и антигемагглютинирующих антител.

### **4. Клинические признаки ИНАН, профилактика, диагностика**

**Клинические признаки.** Инкубационный период составляет около 10...20 суток. Различают сверхострое, острое, подострое, хроническое и латентное течение болезни. Сверхострое течение характеризуется постоянной высокой температурой, угнетением,

геморрагическим диатезом, геморрагическим гатсроянитом, паралич задних конечностей, гибель через 1-2 недели. При остром течении — лихорадка постоянного или ремитирующего типа, анемичность видимых слизистых оболочек, кровоизлияния в них, отеки живота, груди и конечностей, нарушение сердечной деятельности; продолжительность от 1-3 недели, смертность до 80 %. Подострое течение характеризуется более длительными ремиссиями, продолжительность болезни до 2-3 месяцев. При хроническом течении отмечаются периодические приступы лихорадки, исхудания, анемичность слизистых оболочек, утомляемость, одышка, сердцебиение. При латентном течении наблюдается длительное бессимптомное вирусоносительство.

Патологоанатомические изменения. Обнаруживают картину сепсиса, геморрагического диатеза, набухание лимфоузлов. Селезенка, печень, почки резко увеличены и кровенаполнены, темно-красного цвета, дряблой консистенции; на поверхности разреза выражена дольчатость. Сердечная мышца перерождена и дряблая. Конъюнктива и слизистая оболочка носа, рта, а также подкожная клетчатка бледные, иногда с желтушным оттенком.

Диагноз. Диагностика комплексная. Учитывают эпизоотологические особенности, результаты клинического и лабораторного исследований, гематологические, патологоанатомические и гистологические изменения.

Патологический материал: прижизненно — сыворотка крови, кровь с добавлением антикоагулянта; от трупа — кусочки печени, селезенки, сердца, лимфоузлов.

Схема лабораторной диагностики. I. Экспресс-методы: РИФ, гематологические исследования. II. Вирусологические исследования: 1) выделение вируса в культуре лейкоцитов лошадей; 2) идентификация выделенного вируса в РДП, РСК. III. Ретроспективная диагностика не разработана.

Иммунитет. Переболевшие лошади приобретают определенную устойчивость к повторному заражению. Однако связь между гуморальными антителами и напряженностью иммунитета к вирусу недостаточна. Антитела часто выявляются на протяжении всей жизни животного, но они не защищают животное. В разные периоды рецидивов можно выделить разные штаммы вируса – антигенный дрейф.

Специфическая профилактика. В процессе длительного персистирования в организме вирус изменяет свои биологические свойства, что ставит под сомнение эффективность вакцинации против инфекционной анемии лошадей. В последнее время во Франции, Японии и США интенсивно ведутся работы по созданию вакцинных препаратов.

## 1. 16 Лекция №16 (2 часа).

**Тема: «Введение в биотехнологию»**

### 1.16.1 Вопросы лекции:

1. Предмет изучения биотехнологии. Основные этапы развития биотехнологии.
2. Технология и биотехнология.
3. Основные направления развития биотехнологии.
4. Задачи биотехнологии

### 1.16.2 Краткое содержание вопросов

#### **1. Предмет изучения биотехнологии. Основные этапы развития биотехнологии**

Термин «Биотехнология» впервые был предложен в 1917 году венгерским инженером Карлом Эреки для описания процесса крупномасштабного выращивания свиней с использованием в качестве корма сахарной свеклы. По определению Эреки биотехнология - это все виды работ при которых из сырьевых материалов с помощью живых организмов производятся те или иные продукты. Однако этот термин (вообще-то

обозначающий суть данной науки не получило широкого распространения). Долгое время термин биотехнология относился к двум разным наукам: 1) промышленной ферментации; 2) эргономике.

Сейчас в современном понимании биотехнология - это наука о технологиях создания и использования биологических объектов, способствующих интенсификации производства или получению новых видов продуктов различного назначения на основе методов клеточной и генетической инженерии.

Хорошо известен метод микробиологической ферментации - для сохранения и улучшения вкуса пищи, производства спиртных напитков. Благодаря трудам Л.Пастера в конце 19 века были созданы условия для развития прикладной (технической) микробиологии.

Труды Л.Пастера послужили основой развития в 19-20 веках бродильного производства органических растворителей и других химических веществ, где используются разные виды микроорганизмов. Следующим важным этапом в развитии биотехнологии была организация промышленного производства антибиотиков. Сегодня годовой оборот этой отрасли составляет около 3,5 млрд. долларов. Если получение химических соединений и пищевых добавок требует асептических условий и осуществляется в жестком режиме, то такая отрасль биотехнологии - как переработка отходов не требует стерильных условий, напротив чем больше разных микроорганизмов принимает участие в процессе тем лучше. Широкое распространение получило производство аминокислот в аэробный микробиологических процессах. В основном это глутамат натрия и лизин. В течение многих десятилетий, используется способность микроорганизмов превращать растительную массу с низким содержанием белка - в пищевые продукты, с высоким содержание белка.

В 1960 -х годах нефтяные и химические компании начали проводить исследования с целью получения из одноклеточных микроорганизмов белка, предназначенного в пищу людям и животным. В качестве субстрата использовали нефть, метан, метanol и крахмал. Наиболее эффективными оказались процессы на основе метанола и крахмала - основная масса полученных продуктов предназначалась в корм животным.

В настоящее время возрастает интерес к использованию ферментов в медицинской промышленности.

Использование клеток микроорганизмов упростило производство лекарственных препаратов стериодной природы.

Использование культур клеток повысило получение вакцин.

Разработка метода слияния клеток позволило получить новые клоны маслянистых пальм дающих более высокий урожай и более высокое качество продукции.

## **2. Технология и биотехнология.**

Технология - это способы и приемы, используемые для получения из исходного материала некоторого продукта. Часто для получения одного продукта требуется не один, а несколько источников сырья, не один способ, а несколько последовательных процессов.

Биотехнология - это целенаправленное получение ценных для народного хозяйства и человека продуктов за счёт биохимической деятельности микроорганизмов, изолированных клеток или их компонентов.

Следовательно биотехнология предполагает использование таких культур бактерий, клеток животных и растений, метаболизм и биологические свойства которых обеспечивают выработку специфических веществ.

Цель биотехнологических исследований - повышение эффективности производства и поиск биологических систем, с помощью которых можно получить целевой продукт.

Биотехнология позволяет воспроизводить нужные продукты в неограниченном количестве, применяя новые технологии.

В промышленном масштабе биотехнология представляет собой биоиндустрию, позволяющую развиваться: микробиологии; биохимии, генетике; химической инженерии; молекулярной биологии; клеточной биологии;

Создавать лекарственные препараты; вакцины;

Разрабатывать новые - диагностические методы;

Создавать высокопродуктивных животных и высокопродуктивные растения.

Расширение сфер применения биотехнологии существенно влияет на повышение уровня жизни человека.

Генная инженерия – позволила создать инсулин, гормон роста человека, соматотропин, создание растений устойчивых к пестицидам, гербицидам; создание трансгенных животных, растений, разработка технологии переработки нефти; создание вакцин.

Биотехнологические процессы в создании пищевых продуктов: использование белка одноклеточных, создание молочных продуктов, пекарное производство, производство пива.

Биметаллические процессы в переработке отходов: - бумажные отходы, нефтяные разливы, нефтяные отходы, обработка сточных вод, отходы горных разработок, домашний мусор, токсичные отходы, сельскохозяйственные отходы

Использование в медицине - создание антибиотиков, гормонов, моноклональных антител, вакцин.

В сельском хозяйстве - создание растений устойчивых к пестицидам и гербицидам, трансгенных растений и животных, силосование кормов, азотфиксация, клонирование растений из культуры ткани

### **3. Основные направления развития биотехнологии.**

Раньше для обозначения тесной связи технологий с биологией использовали такие названия как прикладная микробиология, прикладная биохимия, прикладная генетика, прикладная биология, технология ферментов, биоинженерия.

Повышение безопасности биотехнологического производства для человека и окружающей среды.

Требуется создание таких рабочих систем, которые будут функционировать только в строго контролируемых условиях.

Снижение доли отходов производственной деятельности человека.

Снижение энергетических затрат на производство продукта. Для этого необходимо использовать возобновляемые источники энергии. Создание многокомпонентные растительных систем.

Разработка новых препаратов для медицины. В настоящее время ведутся активные исследования в области медицины - создаются новые типы препаратов: целевые и индивидуальные.

Целевые препараты предназначены для устранения неконтролируемого деления, нарушения процессов апоптоза - направлены на любую молекулы или клеточную структуру участвующую в этих процессах. Индивидуальные препараты - будут применяться с учетом генетических особенностей пациентов, их предрасположенности к отрицательным побочным явлениям в отношении одних препаратов и чувствительность в отношении других. Такой индивидуальный терапевтический подход базирующийся на знании генома пациента называется фармакогеномика. Использование трансгенных растений привело к резкому сокращению применения инсектицидов и повышению урожайности. В настоящее время получены линии табака, которые, помимо устойчивости к ВТМ, резистентны к вирусу тыквенной мозаики. Были также получены растения картофеля и кукурузы, устойчивые к вирусам скручивания листьев, и растения ячменя, резистентные к вирусу карликовости. Также получен и выращивается сорт тыквы, обладающий устойчивостью сразу к трем вирусам.

#### **4. Задачи биотехнологии**

Задачи биотехнологии разработка и получение:

- 1) новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины;
- 2) микробиологических средств защиты растений от болезней и вредителей;
- 3) бактериальных удобрений и регуляторов роста растений, повышения плодородия почв;
- 4) новых с заданными свойствами высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным условиям сортов растений полученных методом генетической и клеточной инженерии;
- 5) кормовых добавок для повышения продуктивности животных;
- 6) новых методов биоинженерии для эффективной профилактики, диагностики и терапии болезней с-х ж-х;
- 7) новых технологий получения хозяйственно ценных для использования в пищевой, химической, микробиологической и других отраслях промышленности;
- 8) технологий глубокой и эффективной переработки с-х, промышленных и бытовых отходов, использованных сточных вод и газовоздушных выбросов для получения биогаза и высококачественных удобрений; производства дешевых и эффективных энергоносителей.

Современная биотехнология развивается очень быстро, в связи с чем нет единой классификации её компонентов. Можно лишь выделить следующие типы технологий:

Технологии низкого уровня - традиционные основанные на использовании рабочих систем, полученных методом традиционной селекции. Технологии очистки сточных вод, получение биотоплива, некоторые виды микробиологического синтеза - характеризуются низкой научностью.

Технологии низкого уровня с минимальными затратами материальных ресурсов, энергии и человеческого труда называются - экстенсивными. При этом продуктивность системы мало отличается от продуктивности природных экосистем.

#### **1. 17 Лекция №17 (2 часа).**

**Тема: «Биотехнологические производства**

##### **1.17.1 Вопросы лекции:**

1. Технологические основы выделения и концентрирования биопрепаратов и продуктов микробного синтеза.
2. Биотехнология изготовления вакцин
3. Биотехнология изготовления моноклональных антител
4. Технологические основы приготовления кормового белка, аминокислот, витаминов, гормонов

##### **1.17.2 Краткое содержание вопросов:**

##### **1. Технологические основы выделения и концентрирования биопрепаратов и продуктов микробного синтеза.**

Все живые организмы на нашей планете образуют различные соединения первичного метаболизма (углеводы, белки, липиды, витамины и другие вещества) - необходимые для роста и развития. Их содержание и состав зависят от генетических характеристик объектов, стадии онтогенеза и условий произрастания.

Помимо первичных метаболитов у некоторых осуществляется синтез и вторичных метаболитов. Многие из них имеют важное народнохозяйственное значение и поэтому являются целевыми продуктами биотехнологических производств.

Задача биотехнолога - обеспечение сверхсинтеза необходимых для практических целей продуктов метаболизма, что достигается путем изменения как регуляторных систем метаболизма, так и генетических программ.

Биотехнология - это целенаправленное получение ценных продуктов за счёт использования биохимической деятельности микроорганизмов, изолированных клеток или их компонентов.

Преимущества биотехнологических производств: возможность получения специфических и уникальных природных веществ, часть из которых не удается получать другим путем (например, химическим синтезом); проведение биотехнологических процессов при относительно невысоких температурах и давлении; высокие скорости роста и накопления биомассы; использование в качестве сырья дешевых отходов сельского хозяйства или промышленности; биотехнологические процессы, как правило экологичны, дают меньше вредных отходов; технология и аппаратура биотехнологических производств просты и недороги.

Для всех биотехнологических производств существует типовая схема.

К определяющим факторам биотехнологического процесса относят: вид используемого биотехнологического процесса; субстрат с его биохимическими и биофизическими характеристиками; аппаратуру, включая систему контроля управления; технологический режим и соответствие требованиям ГОСТа.

Промышленный биотехнологический процесс в котором для производства коммерческих продуктов используются клеточные системы или микроорганизмы, обычно включают 3 стадии: подготовительную; биотехнологическую; получение готовой продукции.

## **2. Биотехнология изготовления вакцин**

Под общим названием «вакцины» объединяют все препараты, получаемые как из самих патогенных микроорганизмов или их компонентов, так и продуктов их жизнедеятельности, которые применяются для создания активного иммунитета у животных и людей. В настоящее время появилась классификация, согласно которой все вакцины подразделяются на две группы: корпоскулярные и компонентные. К первой группе относятся как живые, так и инактивированные вакцины.

Живые гомологичные вакцины в свою очередь могут различаться способом получения и быть представленными природно аттенуированными или искусственно ослабленными штаммами, включая рекомбинантные и реассортантные.

Технология промышленного приготовления вакцин.

Полученный из ВГНКИ аттенуированный штамм того или иного микроорганизма в условиях биопредприятий адаптируют к производственным питательным средам.

Получают концентрированную бактериальную массу и соединяют в определенных соотношениях с защитной средой, разливают во флаконы или ампулы и подвергают лиофильной сушке.

После этого ампулы запаивают, а флаконы закрывают резиновыми пробками из нейтрального материала и герметизируют, обкатывая флаконы алюминиевыми колпачками.

После этикетировки приготовленные серии вакцин сдаются на контроль. Большинство живых вакцин выпускаются в сухом виде. Кроме сухих, живые вакцины выпускаются и в жидком виде. По сути это культура выросших аттенуированных штаммов, отстандартизованных путем сепарирования и суспенсирования до необходимой концентрации, ее фасуют во флаконы и сдаются на контроль.

Технология приготовления инактивированных вакцин. Инактивированные вакцины готовят из высоковирулентных штаммов соответствующего вида микробов. Поэтому полученную из него нативную культуру необходимо обезвредить. Осажденную бактериальную массу выгружают в гомогенизатор, где ее стандартизируют путем разбавления формалинизованным физиологическим раствором до необходимой

концентрации, и затем смешивают с адьювантом, который одновременно является и сорбентом микробных клеток. После соединения бактериальной массы с адьювантом вакцину фасуют во флаконы, закрывают их пробками из нейтральной резины и для герметичности обкатывают алюминиевыми колпачками. На флаконы наносят этикетки с указанием биофабрики-изготовителя названия препарата, способа его применения и дозировки. После этого препарат сдаают на контроль.

### **3. Биотехнология изготовления моноклональных антител**

Вторая половина двадцатого века характеризуется появлением в человеческой цивилизации нового, доселе отсутствующего, фактора получившего название научно - технической революции. В данное понятие входит и биологическая революция, имея в виду довольно широкий круг открытых в области молекулярной генетики, цитологии, иммунологии и т.д. Однако кардинальным событием последней четверти нашего столетия стало то, что экспериментальные работы в разных областях биологии привели к развитию качественно нового направления - гибридомной технологии.

Гибридная клетка - это клетка, образовавшаяся при слиянии двух или большего числа соматических клеток, в результате которого происходит обобществление клеточных мембран, цитоплазмы и, главное, хромосомных аппаратов - носителей генетической программы жизнедеятельности клеток. Уникальность данного феномена состоит в том, что гибридные клетки унаследуют и объединяют в себе свойства обеих родительских клеток, в том числе способность к делению и специфическим биосинтезам.

Основные принципы получения моноклональных антител.

В основу метода наработки МАт положена способность нормальных плазматических клеток иммунного организма сохранять продукцию антител после слияния с перевиваемыми опухолевыми клетками. В результате образуется популяция гибридных клеток (гибридом), которой родительские селезеночные клетки передали способность вырабатывать специфические антитела, а родительские миеломные - способность к неограниченному росту и индукции асцитных и солидных опухолей. В настоящее время предложено не сколько модификаций метода получения гибридом, но все они сводятся в целом к проведению следующих этапов.

### **4. Технологические основы приготовления кормового белка, аминокислот, витаминов, гормонов**

Белки являются обязательными компонентами клеток любого живого организма, выполняющими жизненно важные функции: катализитические, регуляторные, транспортные, биоэнергетические, защищающие от инфекции и действия стрессовых факторов, структурные, запасные и др.

Кормовые и пищевые белки, имеющие оптимальное содержание незаменимых аминокислот, называют биологически полноценными белками.

Если содержание белков в растительной массе, используемой для кормления сельскохозяйственных животных, ниже, чем требуется по нормам, то во избежание перерасхода кормов и повышения себестоимости животноводческой продукции количество белка в корме балансируют путем добавления белковых концентратов. По такому же принципу контролируют содержание в кормовом белке незаменимых аминокислот. Недостающее до нормы количество какой-либо аминокислоты балансируют добавлением в корм чистых препаратов дефицитных аминокислот или белковой массы, имеющей более высокое содержание данной аминокислоты по сравнению с принятым эталоном.

Возможны три способа промышленного получения незаменимых аминокислот: гидролиз белков растительного и микробного происхождения, микробиологический, а также химический синтез.

В промышленных масштабах аминокислоты получают либо экстракцией из белковых гидролизатов, либо очисткой продуктов метаболизма двух неспорулирующих грамположительных почвенных бактерий. Альтернативным подходом является выделение и изменение специфических генов, кодирующих ключевые ферменты определенных биохимических реакций.

Изменение синтеза аминокислот осуществимо генетическими методами, в том числе за счет использования мутантных организмов, таких, как ауксотрофные и регуляторные мутанты. Промышленные штаммы, как правило, несут несколько мутаций, затрагивающих механизмы регуляции целевой аминокислоты и ее предшественников

Производство кормовых витаминных препаратов. Важным фактором повышения питательной ценности кормов сельскохозяйственных животных является наличие в них витаминов - биологически активных веществ разного химического строения, необходимых для поддержания жизнедеятельности организма.

Гормоны играют существенную роль в постнатальном развитии организма, контролируя многие стороны углеводного, липидного и минерального обмена. Получение соматотропина с использованием генно-инженерных методов проводилось с учетом того, что просоматотропин не подвергается процессингу в бактериальной клетке.

Получение генно-инженерного соматотропина явилось решением проблемы обеспечения медицины этим препаратом. Кроме того он используется в практическом животноводстве, повышая интенсивность роста животных.

## 1. 18 Лекция №18 (2 часа).

**Тема: «Основные методы биотехнологии»**

### 1.18.1 Вопросы лекции:

1. Преимущества биотехнологических производств.
2. Подготовительная стадия биотехнологических производств.
3. Биотехнологическая стадия.
4. Стадия получения готовой продукции.

### 1.18.2 Краткое содержание вопросов

#### 1. Преимущества биотехнологических производств

Все живые организмы на нашей планете образуют различные соединения первичного метаболизма (углеводы, белки, липиды, витамины и другие вещества) – необходимые для роста и развития. Их содержание и состав зависят от генетических характеристик объектов, стадии онтогенеза и условий произрастания.

Помимо первичных метаболитов у некоторых организмов (преимущественно у растений) осуществляется синтез вторичных метаболитов (алкалиоиды, терпеноиды, стериоиды, фенольные соединения, цианогенные гликозиды и др.) Эти низкомолекулярные вещества характерны для определенных видов растений, а их синтез в значительно большей степени видоспецифичен, чем синтез первичных метаболитов.

Все это свидетельствует о разнообразии соединений выделяемых живыми организмами. Многие из них имеют важное народнохозяйственное значение и поэтому являются целевыми продуктами биотехнологических производств.

Обмен веществ подчиняется сложной системе регуляции. Задача биотехнолога – обеспечение сверхсинтеза необходимых для практических целей продуктов метаболизма, что достигается путем изменения как регуляторных систем метаболизма, так и генетических программ.

Биотехнология – это целенаправленное получение ценных продуктов за счет использования биохимической деятельности микроорганизмов, изолированных клеток или их компонентов.

#### Преимущества биотехнологических производств:

Возможность получения специфических и уникальных природных веществ, часть из которых не удается получать другим путем (например, химическим синтезом);

Проведение биотехнологических процессов при относительно невысоких температурах и давлении;

Высокие скорости роста и накопления биомассы;

Использование в качестве сырья дешевых отходов сельского хозяйства или промышленности;

Биотехнологические процессы, как правило экологичны, дают меньше вредных отходов;

технология и аппаратура биотехнологических производств просты и недороги.

Для всех биотехнологических производств существует типовая схема.

К определяющим факторам биотехнологического процесса относят:

- вид используемого биотехнологического процесса;
- субстрат с его биохимическими и биофизическими характеристиками;
- аппаратуру, включая систему контроля управления;
- технологический режим и соответствие требованиям ГОСТа.

Промышленный биотехнологический процесс в котором для производства коммерческих продуктов используются клеточные системы или микроорганизмы, обычно включают 3 стадии:

- подготовительную (обработка сырья, используемого в качестве источника питательных веществ и при необходимости приготовление питательных сред);
- биотехнологическую (рост микроорганизмов-мишеней в большом (обычно более 100л биореакторе – ферментере) с последующим образованием нужного метаболита например, антибиотик или белок);
- получение готовой продукции (очистка целевого продукта от компонентов культуральной среды или от клеточной массы).

## **2. Подготовительная стадия биотехнологических производств.**

Подготовительная стадия необходима для приготовления сырья, используемого в биотехнологическом процессе. В зависимости от целевого продукта, при этом предусматривается:

- приготовление среды, включающей необходимые компоненты питания для организма, и её стерилизация (для асептических биотехнологических процессов в которые нежелательно попадание посторонней микрофлоры);
- подготовка и стерилизации газов (обычно воздуха) путем очистки от пыли, влаги и присутствующих в воздухе микроорганизмов в том числе и спор);
- подготовка биокатализатора – либо ферментера в свободном или закрепленном на носителе виде, либо биомассы микроорганизмов, выращенных до состояния, в котором проявляется их ферментативная активность;
- предварительная обработка сырья, если оно поступило в непригодном для непосредственного использования в биотехнологическом процессе виде. Например, для получения спирта пшеницу сначала дробят, а затем подвергают ферментативному процессу «осахаривания». Другой пример – использования древесины для получения дрожжей: её сначала измельчают, а затем подвергают нагреванию до 200 °C в кислой среде. В результате кислого гидролиза происходит превращение древесины в раствор глюкозы и лигнин. Раствор глюкозы (гидролизат) как раз и используют в биотехнологическом процессе для получения кормовых дрожжей.

## **3. Подготовительная стадия биотехнологических производств.**

Биотехнологическая стадия – основная в биотехнологическом производстве. Именно на этой стадии с использованием того или иного биологического агента

(микроорганизмов, изолированных клеток, ферментов или клеточных органелл) происходит преобразование сырья в тот или иной целевой продукт.

Главной целью является получение определенного органического вещества. Однако биотехнологическая стадия включает не только синтез новых соединений, но и ряд других биотехнологических процессов таких, как:

- ферментация – процесс, осуществляемый с помощью ферментов культивируемых микроорганизмов;
- биотрансформация – процесс изменения химической структуры веществ под действием ферментативной активности клеток или готовых ферментов;
- биокатализ – химические превращения веществ с использованием биокатализаторов-ферментеров;
- бdioокисление – окисление загрязняющих веществ с помощью микроорганизмов или ассоциации микроорганизмов в аэробных условиях;
- метановое брожение – переработка органических отходов с помощью ассоциации метаногенных микроорганизмов в анаэробных условиях;
- биокомпостирование - снижение содержания вредных органических веществ в твердых отходах;
- биосорбция – сорбция вредных примесей из газов или жидкостей (обычно осуществляется закрепленными на специальных твердых носителях микроорганизмами);
- бактериальное биовыщелачивание - процесс перевода нерастворимых в воде соединений металлов в растворенное состояние под действием специальных микроорганизмов;
- биодеградация – разрушение вредных соединений, осуществляемая микроорганизмами-бидеструкторами.

Обычно биотехнологическая стадия заканчивается выходом одного жидкостного и одного газового потоков, иногда – только одного жидкостного или переработанного

#### **4. Стадия получения готовой продукции.**

Получение готовой продукции – заключительная стадия технологического процесса биотехнологического производства. Чаще всего целевой продукт находится в самой биомассе, либо в жидкости. В зависимости от свойств биомассы и жидкости, для их разделения могут быть использованы различные методы:

- отстаивание – разделение под действием гравитационных сил (обычно при очистке сточных вод);
- фильтрация - пропускание суспензии через фильтрующий материал, на котором задерживаются твердые фазы - биомассы. Такой способ применяют в производстве антибиотиков, особенно в тех случаях, когда микроорганизм продуцент имеет мицелиальный характер;
- сепарация, центрифugирование - разделение под действием центробежных сил. Наиболее часто используется для отделения бактерий и дрожжей в производстве кормовой биомассы;
- микрофильтрация, ультрафильтрация – пропускание суспензии через мембранны с малым размером пор, обеспечивающих удерживание клеток микроорганизмов на мемbrane и получение чистого раствора. При микрофильтрации удерживаются не только микроорганизмы, но и крупные молекулы растворимых веществ;
- коагуляция – добавление в суспензию реагентов, способствующих образованию и осаждению более крупных частиц и отделению их от жидкости методом отстаивания;
- флотация - захват микроорганизмов пузырьками пенной фракции.

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

Все рабочие процессы, начиная с мойки посуды и кончая 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 м<sup>2</sup> 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 лаборатория 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 с наружи протирают дезраствором, весь отработанный материал помещают в контейнер, контейнер опечатывают и переносят в моечную, дезинфекционную, автоклавную, марю, покрывающую рабочую поверхность стола помещают в дезраствор, поверхность стола протирают дезраствором.

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

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

10. Источники внутри лабораторных заражений:

1. Клинические пробы

2. Работа с инфицированными животными

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

4. Дезинфекция посуды и спецодежды

5. Несчастный случай, авария

## **2.2 Лабораторная работа №2 ( 2 часа).**

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

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

### **2.2.2 Задачи работы:**

1. Подготовить 10% вируссодержащую суспензию из патологического материала

2. Поставить бактериологический контроль вирусодержащей суспензии.

3. Ознакомиться с ведением журналов в лаборатории.

### **2.2.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

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

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

3. Таблица по теме.

### **2.2.4 Описание (ход) работы:**

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

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

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

При респираторных инфекциях для выделения вирусов из организма больного животного берут носоглоточные смывы, мазки из носа и глотки; для выделения энтеровирусов - кал; дермотропных агентов - свежие поражения кожи; при язве и оспе - стенки афт, содержимое везикул, пустул; при чуме - кровь и др.

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

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

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

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

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

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

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

Подготовка органов и тканей к исследованию.

Вирус необходимо освободить из органов и тканей и перевести в фосфатный буфер или раствор Хенкса. Для этого материал тщательно измельчают ножницами, растирают в ступке с кварцевым песком ( добавлять толченное стекло менее желательно, так как оно обладает щелочными свойствами и может инактивировать часть вирусных частиц). Из растертого материала готовят 10% суспензию на фосфатном буфере или растворе Хенкса. Полученную суспензию центрифигируют 1,5-3 тыс. об/ мин в течение 10-15 мин.

Надосадочную жидкость отбирают в стерильные флаконы и освобождают от микрофлоры:

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

2) фильтруя через бактериальные фильтры.

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

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

Учет, хранение и транспортировка вирусов.

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

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

Журнал учета зараженных животных;

Журнал учета выделенных вирусов и их уничтожения;

Журнал движения производственных штаммов;

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

Штаммы вирусов хранятся в холодильнике под замком с пломбой и печатью.

Штаммы должны храниться в условиях обеспечивающих их максимально длительную жизнеспособность.

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

Вирусодержащие материалы (ВСМ) в пробирках, флаконах и других сосудах должны быть непременно снабжены этикеткой, на которой указаны вирус, штамм, дата получения, номер пассажа, объем и другие сведения. Данные этикеток должны полностью совпадать с записями в журнале штаммов лаборатории. Штаммы хранят в холодильнике под замком с пломбой или печатью.

При транспортировке всем необходимо как можно быстрее поместить его в условия, обеспечивающие замедление процессов инактивации вируса. Такие условия обеспечивают

низкие температуры (используют охлаждающие смеси) или консервирующие вещества. Выбор метода консервирования обусловлен видом патологического материала, методом его исследования, длительностью транспортировки.

### **2.3 Лабораторная работа №3 (2 часа).**

**Тема: «Методы лабораторной диагностики вирусных инфекций»**

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

#### **2.3.2 Задачи работы:**

1. Ознакомиться с экспресс методами диагностики вирусных болезней, их значением.
2. Рассмотреть методику выделения вируса в чувствительных биосистемах и его идентификации.
3. Изучить принцип ретроспективной диагностики и её особенности.

#### **2.3.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

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

#### **2.3.4 Описание (ход) работы:**

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

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

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

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

Тельца-включения и элементарные тельца вирусов указывают на присутствие вирусов в патологическом материале. Тельца-включения – это внутриклеточные элементы, образующиеся в клетках как результат репродукции в них некоторых вирусов (около 100 вирусов).

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

Для этого из патологического материала делают 10%-ю суспензию на стерильном физиологическом растворе (рН 7,2...7,4), затем освобождают ее от крупных частиц путем

центрифугирования в течение 20...30 мин при оборотах 2000...3000 мин<sup>-1</sup>. Для подавления бактериальной микро- и микрофлоры к суспензии добавляют смесь антибиотиков (обычно пенициллин и стрептомицин по 200...1000 ЕД каждого на 1 мл жидкости и нистатин) или для очистки пропускают ее через бактериальные фильтры. Эффективность такой обработки суспензии контролируют с помощью посевов ее на специальные питательные среды (для аэробов и анаэробов). Полученной и обработанной таким образом суспензией заражают живые биологические системы и регистрируют появление у них признаков репродукции вируса, что служит показателем наличия вируса в патматериале. Однако вирус не всегда проявляет свое действие в первом пассаже и иногда требуется провести 2...3 «слепых» пассажа, чтобы вирус адаптировался к биологической системе и накопился в достаточном количестве для проявления своего действия.

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

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

В качестве биологической системы для выделения вирусов также используют лабораторных животных (белые мыши, белые крысы, хомячки, морские свинки, кролики, птицы и др.). Существует большое количество методов введения инфекционного материала. Выбор метода заражения зависит от тропизма вирусов и чувствительности животного. За зараженными животными устанавливают контроль, отмечая изменения в их поведении, сроки появления специфических признаков болезни. Признаками репродукции вирусов в организме животных являются их гибель, клинические признаки болезни и патологоанатомические изменения в бронхах и тканях. При отсутствии моделей лабораторных животных при некоторых вирусных болезнях для выделения вирусов используют естественно-восприимчивых животных.

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

Большое значение для идентификации выделенного вируса приобрела реакция связывания комплемента (РСК) с разными разведениями известных сывороток и

несколькими дозами комплемента; предпочтительно на холоде (18...20 ч при температуре 2...-4 °C).

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

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

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

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

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

## **2.4 Лабораторная работа №4 (2 часа).**

**Тема: «Методы индикации вирусов в патологическом материале путем обнаружения телец-включений»**

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

### **2.4.2 Задачи работы:**

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

### **2.4.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

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

4. Патологический материал.
5. Пастеровские пипетки.
6. Реактивы для окрашивания по Романовскому, Селлерсу.

#### **2.5.4 Описание (ход) работы:**

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

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

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

1. скоплением вирусных частиц
2. скоплением неструктурных вирусных белков в цитоплазме и ядре
3. скоплением деструктивного клеточного материала

Диагностическое значение телец-включений.

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

При других заболеваниях обнаружение телец-включений имеет вспомогательное значение.

На частоту выявления телец-включений влияют штамм вируса, возраст животного, физиологическая активность пораженного органа.

**Исследование инфицированного материала на обнаружение телец-включений**

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

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

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

Реактивы:

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

Синий Мансона, разведенный в 40 раз

Танин 5 – 10%

Элементарные тельца.

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

Серебрение по Морозову.

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

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

3. 5 г кристаллического нитрата серебра растворить в 100 мл дистиллированной воды. К полученному раствору по каплям добавлять раствор аммиака до получения опалесцирующего раствора. Для краски раствор серебра разводят дистиллированной водой 1:10.

Окраска препарата: наливают на 1 минуту первый реагент, сливают, промывают препарат водой, наливают второй реагент, подогревают на легком пламени до отхождения паров (1 мин), тщательно промывают водой, 1 - 2 минуты при подогревании обрабатывают препарат третьим реагентом до появления темно-коричневой краски мазка, тщательно промывают водой, высушивают. Рассматривают с иммерсионной системой.

Окраска по Селлерсу

Окраска по Романовскому

## 2.5 Лабораторная работа №5 (2 часа).

## **Тема: «Культивирование вируса в организме лабораторных животных и его выделение»**

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

### **2.5.2 Задачи работы:**

1. Ознакомится с использованием лабораторных животных для выделения, накопления и поддержания вируса в лабораторных условиях
2. Выполнить заражение лабораторных животных различными способами
3. Выполнить вскрытие лабораторных животных с целью получения вирусодержащего материала

### **2.5.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Лабораторные животные (белые мыши)
2. Инструменты для фиксации и заражения животных
3. Вирусодержащий материал пенициллиновые флаконы с кусочками паренхиматозных органов, залитых раствором Хенкса и замороженных
4. Посуда для подготовки материала стерильные фарфоровые ступки с пестиками, стерильный стеклянный песок, стерильные чашки Петри (по две на рабочее место), стерильные центрифужные пробирки (количество их соответствует числу рабочих мест), раствор Хенкса, пенициллин, стрептомицин, МПА, МПБ в пробирках на каждое рабочее место, стерильные пенициллиновые флаконы, стерильные резиновые пробки, пинцеты, спиртовки, центрифуга, бумажные фильтры. *таблица по теме.*

### **2.5.4 Описание (ход) работы:**

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

Лабораторных животных применяют для индикации вирусов в пат. материале, т.е. для постановки биопробы. Суспензией пат. материала заражают лабораторных животных и учитывают реакцию на заражение. Биопроба сопровождается характерной клинической картиной, специфичной для определенного заболевания. Положительная биопроба позволяет сделать вывод о присутствии вируса в патологическом материале, о его видовой принадлежности. Полученный от зараженного животного вирусодержащий материал считают выделенным вирусом.

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

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

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

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

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

Требования к лабораторным животным

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

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

3. Возраст животного

4. Стандартная чувствительность животного.

Методы заражения лабораторных животных

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

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

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

При заражении лабораторных животных признаками присутствия вируса в патологическом материале является: 1) клинические признак, 2) гибель в характерные для данного вируса сроки; 3) патологоанатомические изменения, которые выражаются изменением цвета, размера, формы и консистенции органов, а также появлением в органах образований в норме не встречающихся.

Для изучения патологоанатомических изменений и получения вируссодержащего материала экспериментально зараженных животных вскрывают. Делают это сразу же после гибели или животных убивают в момент максимального проявления симптомов болезни или при их отсутствии на 8-10 день после заражения. Убить животное можно избыточной дозой наркоза.

Для удобства вскрытия животное фиксируют крупных животных на специальных столах, а мелких в кюветах залитых воском с помощью булавок, иглок. Вскрытие проводят стерильными инструментами.

Брюшную и грудную полости вскрывают при фиксации животного в спинном положение с направленными в разную сторону конечностями. Шерсть животного по линиям разреза обрабатывают дезинфицирующим раствором.

Разрез кожи делают по белой линии от лонной кости до шеи. Чтобы не порезать брюшную стенку, пинцетом приподнимают кожу и делают сначала поперечный разрез складки кожи у симфиза, а затем вставив браншу ножниц в образовавшееся отверстие, разрезают кожу до шеи животного, после чего кожу разрезают по направлению к каждой конечности. Тупым путем кожу отпрепаровывают, открывая её лоскуты вправо и влево наподобие дверок шкафа. Лоскуты кожи фиксируют булавками за верхние и нижние углы. Заменив инструменты, вскрывают брюшную полость. Для этого разрез брюшной стенки делают под линией диафрагмы и по белой линии до лонной кости. Треугольники брюшной стенки отводят в сторону и фиксируют.

В качестве вируссодержащего материала из брюшной полости берут кусочки, (а у мелких животных целый орган) печени, селезенки, почки, брызговые лимфатические узлы, участок кишечника при наличии патологоанатомических изменений или симптомов болезни, наблюдавшихся перед смертью.

Грудную полость вскрывают с учетом того, что она имеет твердые стенки. Ребра разрезают поперек сзади вперед, удаляя их вместе с грудной костью.

Череп вскрывают. Укрепив животное в брюшном положении путем фиксации передних конечностей и головы. Кожу головы и шеи обрабатывают дезинфицирующим раствором. Разрез кожи делают перпендикулярно оси тела за ушами, продолжают слева и справа вперед к глазницам. Кожу вместе с ушами отпрепаровывают и отбрасывают вперед, оголяя черепную коробку. Одну браншу ножниц вставляют в затылочное отверстие и режут кости влево и вправо по направлению к глазницам. Затем разрезают кости черепа между глазницами и удаляют весь вырезанный участок.

## **2.6 Лабораторная работа №6 (2 часа).**

**Тема: «Культивирование вирусов в развивающемся курином эмбрионе»**

**2.6.1 Цель работы:** изучить строение куриного эмбриона, ознакомиться с методами заражения их вирусодержащим материалом и порядком вскрытия и отбора патологического материала

### **2.6.2 Задачи работы:**

1. Провести овоскопию куриных эмбрионов, дезинфекцию.
2. Провести заражение куриных эмбрионов в амниотическую и аллантоисную полость.
3. Провести вскрытие куриных эмбрионов и отбор патологического материала.

### **2.6.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Куриные эмбрионы.
2. Вирусодержащий материал (вирусвакцина),
3. Инструменты для заражения, вскрытия и отбора патологического материала (шприцы, короткие и длинные иглы, подставки для РЭК, овоскоп, пробойники и глазные пинцеты, баночки со спиртом, вата, 0,5% раствор йода, стерильный парафин в пастеровских пипетках, стерильные покровные стекла, лейкопластырь, чашки Петри, спиртовки, простые карандаши, стерильные тампоны)

### **2.6.4 Описание (ход) работы:**

Требования к куриным эмбрионам.

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

Условия, влияющие на размножение вирусов в куриных эмбрионах.

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

Подготовка куриных эмбрионов к заражению.

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

Способы заражения

Заражение в аллантоисную полость. Используют 9 – 12 дневных эмбрионов. Яйца овоскопируют, на скорлупе делают отметку над воздушным мешком, ближе к его границе. Это место протирают раствором йода. Инъецируют 0,1 - 0,2 мл вирусного материала в аллантоисную полость. Иглу вводят примерно на 10 -15 мм параллельно длиной оси яйца. Отверстие в скорлупе яйца протирают раствором йода и запечатывают парафином.

Зараженные яйца инкубируют при 35°C в течение 25 - 72 часов, в зависимости от вируса и предполагаемого использования вирусного материала.

Другой способ заражения в аллантоисную полость основан на введении вируса через отверстие, сделанное в скорлупе на стороне зародыша в 5 мм выше границы воздушной камеры. Шприц с иглой при этом направляют вертикально.

Заражение в амнион. При таком способе заражения получают небольшое количество вирусодержащего материала, поэтому вирусы, выделенные заражением в амнион, обычно пассируют заражением в полость аллантоиса для адаптации к росту в клетках аллантоисной оболочки. Используют чаще эмбрионы в возрасте 10 - 11 дней. Тупой конец яйца протирают слабым раствором йода, после чего в скорлупе острый зондом делают отверстие. Скорлупу в месте отверстия снова протирают раствором йода, яйцо помещают на овоскоп и заражают, используя туберкулиновый шприц с иглой диаметром 0,6 мм и длиной 4,5 см. иглу вводят по направлению к телу эмбриона, быстрым уколом проникают в амниотическую полость и инъецируют 0,1 – 0,2 мл вирусного материала. Иглу извлекают, место отверстия протирают раствором йода, отверстия запечатывают смесью парафина с вазелином или коллонием. Зараженные яйца инкубируют при 33 - 37°C (в зависимости от вируса) в течение 48 - 72 часов. Заражение в амнион производят также «открытым» способом. Для этого скорлупу над воздушной камерой разрезают ножницами и через образовавшееся окно размером 1 - 1,5 см осторожно отслаивают глазным пинцетом подскорлупную оболочку. Прокалывают ХАО глазным пинцетом и продвигают его к эмбриону. Затем захватывают амниотическую оболочку и осторожно вытягивают часть ее через образовавшееся отверстие. Извлеченный амнион перехватывают широким пинцетом, который держат в левой руке. Затем шприцем для туберкулизации с иглой вводят в вытянутый амниотический мешок 0,1 – 0,2 мл вирусного материала. После заражения пинцет разжимают и амнион погружается в аллантоисную полость. Окно в скорлупе закрывают стеклянным колпачком края которого запаивают расплавленным парафином..

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

Заражение в желточный мешок. Используют обычно для выделения и культивирования риккетсий и хламидий. Они хорошо размножаются клетках, выстилающих полость желточного мешка, что отчетливо видно на окрашенных микроскопических препаратах.

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

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

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

Характер локализации и интенсивность патологических изменений у зародыша зависит от вируса, его дозы, пути введения и степени адаптации к эмбриону. Последнее означает, что свежевыделенный и в первых пассажах вирус, будет вызывать у эмбрионов

не такие изменения, как тот же вирус в последующих пассажах. Выделяют следующие возможные варианты изменений у эмбрионов под действием вирусов: гибель эмбрионов; кровоизлияние под кожу, в фолликулы перьев, затылочную область; инъецирование сосудов на крыльях, ногах или всего зародыша; замедление развития зародыша; скручивание зародыша, уменьшение объема амниотической жидкости; увеличение объема аллантоисной жидкости; отек ХАО; очаги некроза или скопления лейкоцитов с центральным омертвлением; гистопатологические изменения; образование телец-включений.

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

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

Вскрытие зараженных яиц и сбор вируссодержащего материала.

Зараженные яйца вскрывают в сроки максимального накопления вируса. Для каждого вируса и даже штамма этот срок является определенным и варьирует в пределах от 2 до 7 - 8 суток. Так, для вируса ньюкаслской болезни штамма Н он составляет 2 - 3 дня, а для того же вируса В1 - 5 дней, для вируса инфекционного ларинготрахеита птиц - 5 дней и т.д. Перед вскрытием их оставляют на ночь при 40°C или на 2 - 3 часа при минус 10 - 20°C. Обрабатывают яйца спиртом, затем 2%-ным раствором йода и обжигают пламенем. Яйцо держат в руке слегка наклонно, чтобы избежать попадания скорлупы в полость яйца. Рассекают скорлупу немного выше очерченной карандашом границы воздушного пространства и при помощи ножниц и пинцета вскрывают. Аллантоисную жидкость отделяют пипеткой для отсасывания, на которую надета резиновая груша или она подсоединенна к вакууму. Амниотическую жидкость лучше всего брать при помощи шприца с подходящей иглой. В зависимости от поставленной задачи жидкости можно брать порциями или полностью.

## **2.7 Лабораторная работа №7 (2 часа).**

**Тема: «Культивирование вирусов в культуре клеток»**

**2.7.1 Цель работы** ознакомиться с общими сведениями о культурах клеток, питательными средами, используемыми для культивирования культур клеток, с техникой получения первичных культур клеток методом трипсинизации и методами индикации вируса в культуре клеток.

### **2.7.2 Задачи работы:**

1. Дать характеристику культур клеток
2. Изучить питательные среды для культивирования культур клеток
3. Составить схему получения первичной культурой клеток
4. Рассмотреть методы индикации вируса в культуре клеток

### **2.7.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Посуда для приготовления культур клеток: специально обработанная для выращивания клеток посуда, чашки Петри, колба для трипсинизации, центрифужные пробирки,

2. Растворы для приготовления культур клеток: раствор Хенкса или Эрла, 0,25% раствор трипсина, питательная среда для культур клеток, стерильная сыворотка крови крупного рогатого скота, пенициллин, стрептомицин, 7,5% раствор соды, 3% раствор уксусной кислоты

3. Оборудование и инструменты для получения культур клеток: центрифуга, магнитная мешалка, стерилизатор с инструментами (ножницы глазные прямые и

изогнутые, пинцеты анатомические), спиртовки, подставки для яиц, сливная чашка, кювета со льдом, овоскопы, или осветители ОИ-19,

4. Куриные эмбрионы 7...10 дневного возраста.

#### **2.7.4 Описание (ход) работы:**

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

В вирусологической практике применяют следующие культуры клеток:

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

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

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

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

Диплоидные культуры клеток. По сути это перевиваемые с двойным (правильным) набором хромосом. Они могут культивироваться в течение 50-60 пассажей, однако имеют более однородную морфологию, спектр чувствительности более широк.

Вирусы животных и человека культивируют на клеточных культурах, полученных из тканей человека и животных. Это в основном эмбрионы человека, кур, коровы, почки обезьян, овец и поросят, селезенка различных видов животных, амнион человека и др.

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

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

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

Преимущества перевиваемых клеток:

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

Недостатки перевиваемых клеток:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Солевые растворы. Для культивирования клеток большинство питательных сред готовят на сбалансированном солевом растворе, для которого необходимы высокоочищенные препараты, так как следы ряда примесей (свинец, ртуть и другие тяжелые металлы) токсичны для клеток. Солевые растворы готовят на бидистиллированной воде. Они обеспечивают сохранение рН, осмотического давления в

клетках, соответствующую концентрацию необходимых неорганических веществ. Лучшими из них являются растворы Хенкса и Эрла. Эти растворы - обязательный компонент любой питательной среды.

Получение первично-трипсинизированной культуры клеток из кожно-мышечной ткани куриного эмбриона. Куриные эмбрионы 9-11 дневного возраста овоскопируют. Отбирают яйца с подвижными эмбрионами и хорошо выраженными сосудами. Поверхность скорлупы дезинфицируют йодированным спиртом или путем фламбирования. Стерильными ножницами разрезают скорлупу в районе воздушной камеры на 2-3 мм выше её границы, удаляют подскорлупную оболочку. Стерильным пинцетом извлекают эмбрион в чашку Петри. У эмбриона удаляют голову, крылья, ноги, внутренние органы – образуется кожно-мышечный мешок. Кожно-мышечный мешок переносят в глубокую посуду и измельчают ножницами на кусочки размером 1-4 мм. Измельченную ткань отмывают 2-3 раза раствором Хенкса от слизи и крови и переносят в колбу для трипсинации. В колбу наливают 0,15% раствор трипсина, подогретого до температуры 37 °C. В колбу помещают магнитик и колбу ставят на магнитную мешалку. Трипсинацию проводят дробно - по 3-5 минут 3-4 раза. Отделившиеся клетки вместе с трипсином переливают в центрифужные пробирки и помещают в холод для прекращения действия трипсина

После трипсинации суспензию клеток в растворе трипсина при 1000 об/минуту в течение 10 минут, надосадочную жидкость сливают а осадок ресуспенсируют в питательной среде. Фильтруют через 3-слойный марлевый фильтр. После тщательно перемешивают клетки и определяют количество клеток в 1 мл. Затем суспензию разливают по пробиркам и матрасам. В пробирки наливают 1 мл, а в матрасы до 10% от объема. Сосуды закрывают стерильными резиновыми пробками, делают надпись – дата и вид культуры. На пробирках ставят продольную черту и укладывают их в штатив под углом 5° чертой вверх и культивируют в термостате при 37°C.

Ежедневно культуры просматривают под малым увеличением микроскопа для определения характера роста.

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

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

Формы ЦПД: фрагментация, округление, симпластообразование.

РГАд состоит в следующем при положительной реакции эритроциты прикреплены к поверхности клеток, при отрицательной реакции они удалились физ раствором или плывут. В зависимости от вида вируса и вида клеток эритроциты могут прикрепляться к виде «ожерелья», по всему монослою, или скоплениями.

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

Цветная проба. Поскольку живые клетки выделяют продукты метаболизма и меняют pH среды, а погибшие под действие вируса продуктов метаболизма не выделяют,

то это свойство может быть использовано для определения наличия в культуре клеток живых и погибших клеток. Изменение pH среды будет визуально заметно поскольку в состав питательных сред входит индикатор для определения концентрации водородных ионов. Цветную пробу для лабораторных исследований предложил Солк, Янгер, Уорд в 1954 году.

Обнаружение внутриклеточных включений. Для приготовления препаратов культур клеток с целью выявления телец-включений клетки выращивают на покровных стеклах в пробирках или пеницилловых фляконах. Заражают культуру клеток и через определенное время инкубации стекло вынимают, промывают в теплом растворе Хенкса, просушивают фильтровальной бумагой и фиксируют в раствора Буэна – 10-15 мин. Затем препараты окрашивают гематоксилином-эозином в течение 5-15 минут. При окраске гематоксилином-эозином ядра клеток окрашиваются в синий цвет, цитоплазма - в розовый, тельца-включения - в синий или розовый в зависимости от вируса.

Для обнаружения вируса в РИФ культуру клеток готовят на покровных стеклах, заражают и затем окрашивают флюоресцирующей сывороткой, выдерживают, промывают, просматривают в люминисцентный микроскоп.

## **2.8 Лабораторная работа № 8 (2 часа).**

**Тема: «Серологические реакции в вирусологии»**

**2.8.1 Цель работы:** изучить принцип постановки серологических реакций, компоненты их применение при диагностике вирусных болезней

### **2.8.2 Задачи работы:**

1. Ознакомить студентов с серологическими реакциями, используемыми при диагностике вирусных болезней, и ролью специфических антигенов, противовирусных антител и неспецифических сывороточных ингибиторов вирусов.
2. Провести подготовку сыворотки, освобождение от неспецифических ингибиторов
3. Подготовить компоненты реакции для постановки РГА и РТГА
4. Выполнить постановку РГА и РТГА

### **2.8.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Исследуемый вируссодержащий материал (экстраэмбриональная жидкость, суспензии хорион-аллантоисных оболочек и тканей куриных эмбрионов, экстракты из органов животных, культуральная жидкость инфицированных клеток).
2. Взвесь эритроцитов 0,5% - 1%.
3. Изотонический раствор N301 0,85%.

### **2.8.4 Описание (ход) работы:**

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

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

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

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

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

Серологические реакции широко используют в вирусологической практике.

1. Для диагностики вирусных болезней человека, животных и птиц по обнаружению неизвестного вирусного антигена и установлению его вида с помощью известных специфических антител, с одной стороны, и обнаружения, титрования неизвестных специфических антител с помощью известного вирусного антигена — с другой.

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

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

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

5. Для установления антигенного родства вирусов.

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

7. Для изучения патогенеза вирусных болезней.

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

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

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

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

По физическим свойствам группы ингибиторов можно разделить на две подгруппы: термолабильные и термостабильные. Термолабильные ингибиторы разрушаются при прогревании сывороток крови в течение 30 мин при 56...63 °C в зависимости от вида животного, от которого получена сыворотка. Обычно перед прогреванием сыворотки разводят физиологическим раствором не менее чем в 2 раза во избежание их свертывания.

Одни термостабильные ингибиторы выдерживают нагревание до 75 °C, другие — до 100 °C. От них сыворотки крови можно освободить путем обработки химическими реактивами или хорошо адсорбирующими веществами. Из химических реагентов наиболее широко используют диоксид углерода (CO<sub>2</sub>) периодат калия (KIO<sub>4</sub>), риванол, зимозан и другие, а из адсорбентов — каолин, бентонит, активированный уголь.

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

1. Разрушение (удаление) ингибиторов диоксидом углерода (CO<sub>2</sub>). Сыворотку крови предварительно разводят 1:10 дистиллированной водой. Диоксид углерода пропускают через сыворотку из аппарата Киппа в течение 5...7 мин до помутнения жидкости (CO<sub>2</sub>) образуется в результате реакции между бикарбонатом кальция и разбавленной соляной кислотой); образуется осадок белого цвета. Осадок удаляют центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин. Затем к 0,9 мл надосадочной жидкости добавляют 0,1 мл 8,5%-го NaCl и прогревают при 56 °C в течение 30 мин. Сыворотка готова для постановки реакции.

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

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

### **Сущность реакции гемагглютинации.**

В основе механизма реакции гемагглютинации (РГА) лежит адсорбция вируса на поверхности эритроцитов, сопровождающаяся склеиванием их. Гемагглютинация, как и

гемадсорбция широко используется для выявления микровирусов, парамикровирусов и вирусов других семейств. Некоторые вирусы можно выявить только с помощью гемагглютинации, либо гемадсорбции (парагрипп крупного рогатого скота, ньюкаслская болезнь, грипп птиц др.). Ряд вирусов обнаружили с помощью данных методов.

Компоненты: РГА

4. Исследуемый вируссодержащий материал (экстракт эмбриональная жидкость, суспензии хорион-аллантоисных оболочек и тканей куриных эмбрионов, экстракты из органов животных, культуральная жидкость инфицированных клеток).
5. Взвесь эритроцитов 0,5% - 1%.
6. Изотонический раствор N301 0,85%.

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

*Техника постановки РГА.*

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

*Второй метод* - принимают для титрования вирусов по гемагглютинирующему активности. Готовят ряд последовательных разведений (обычно двукратных) исследуемого вируса. Реакцию ставят в пробирках Флоринского или специальных плексигласовых плашках микро- и макрометодом. В ряд лунок планшета наливают по 0,2 мл изотонического раствора хлористого натрия, затем в первую лунку вносят 0,2 мл вируссодержащего материала. С помощью пипетки переносят по 0,2 мл последовательно из первой лунки во вторую и т.д. Из последней удаляют в дезраствор. Во все лунки с различными разведениями вируса добавляют по 0,2 мл 1% взвеси эритроцитов.

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

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

*Оценка реакции гемагглютинации*

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

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

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

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

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

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

#### *Реакция торможения гемагглютинации.*

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

Для постановки РТГА используют следующие компоненты:

1. Изотонический раствор хлористого натрия.
2. Специфическая сыворотка.
3. Вируссодержащий материал (рабочая доза вируса в титре 4 ГАЕ).
4. Взвесь эритроцитов 0,5 - 1%.

#### *Подготовка сыворотки.*

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

Проведение основного опыта РТГА.

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

Разведение сыворотки	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024
0,85 % Na Cl	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Сыворотка	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

BCM	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Встряхиваем, экспозиция 20 минут									
1% взвесь эритроцитов	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Встряхиваем, экспозиция 20-40 минут									
Учёт реакции									

*Оборудование и материалы:* гемагглютинин и антитела к гемагглютинину, 1% суспензия эритроцитов кур или морской свинки, пластиковые панели с лунками, аппарат Такачи, сосуд с дезинфицирующим раствором, спиртовки.

### **Задание №1**

Определить титр вируса в РГА и идентификация антител в РТГА. Результат представить в таблицах. Определить титр антител в РТГА. Записать результат в таблицу.

## **2.9 Лабораторная работа № 9 (2 часа).**

### **Тема: «Лабораторная диагностика бешенства**

**2.9.1 Цель работы:** ознакомится с лабораторными методами диагностики бешенства

#### **2.9.2 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

#### **2.9.3 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 вирусодержащей суспензии и инструменты для заражения (набор инструментов для вскрытия черепной коробки,
6. Дезинфицирующий раствор.

#### **2.9.4 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 люминесцентный микроскоп с использованием эмиссионной 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 линий преципитации различной степени интенсивности между лункой с исследуемым а.

#### *Метод выявления телец Бабеша-Негри*

*Сущность метода* заключается в выявлении в клетках нервной ткани специфических цитоплазматических включений - телец Бабеша-Негри. Для постановки этого метода из каждого отдела головного мозга готовят мазки - отпечатки, окрашивают по Селлерсу, и проводят микроскопию.

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

#### *Метод биологической пробы*

*Сущность метода* заключается в выделении вируса от больных убитых или павших животных путем инокуляции патологического материала белым мышам и последующей его идентификации. Мышей заражают супензией 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.

## **2.10 Лабораторная работа №10 (2 часа).**

**Тема: «Диагностика ящура, определение типа и варианта вируса ящура в РСК»**

**2.10.1 Цель работы:** ознакомиться с методами лабораторной диагностики ящура

### **2.10.2 Задачи работы:**

1. Изучить правила взятия и транспортировки патологического материала для лабораторной диагностики ящура
2. Разобрать методику постановки РСК с целью определения типовой и вариантной принадлежности вируса ящура
3. Отработать внутрикожное заражение морских свинок постановки биопробы и проведения ретроспективной диагностики.

### **2.10.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Лабораторные животные (морские свинки),
2. Шприцы и инструменты для заражения животных,
3. Пенициллиновые флаконы с кусочками паренхиматозных органов, залитых раствором Хенкса и замороженных, стерильные фарфоровые ступки с пестиками, стерильный стеклянный песок, стерильные чашки Петри (по две на рабочее место), стерильные центрифужные пробирки (количество их соответствует числу рабочих мест), раствор Хенкса, пенициллин, стрептомицин, МПА, МПБ в пробирках на каждое рабочее место, стерильные пенициллиновые флаконы, стерильные резиновые пробки, пинцеты, спиртовки, центрифуга, бумажные фильтры

### **2.10.4 Описание (ход) работы:**

Методы лабораторной диагностики ящура 1) ранняя диагностика - обнаружение и типовая (вариантная) идентификация вируса; 2) ретроспективная диагностика - обнаружение и идентификация специфических противоящурных антител у животных - реконвалесцентов.

Патологический материал для проведения лабораторных исследований на ящур: не менее 5 г (содержимое афт, стенки, корочки афт) взятые от 2-3 животных, при отсутствии афт кровь в период температурной реакции, от трупов лимфатические узлы головы и заглоточного кольца, поджелудочную железу и мышцу сердца.

К экспресс методам диагностики ящура относят обнаружение и идентификацию антигена в РСК, а также обнаружение вирусного генома в исследуемом материале в ПЦР.

Реакция связывания комплемента (РСК) применяют для диагностики многих вирусных болезней. В основе РСК лежит связывание комплемента специфическим комплексом антиген + антитело, об отсутствии свободного комплемента в системе судят по задержке гемолиза эритроцитов в индикаторной системе.

В РСК участвуют две системы: исследуемая (исследуемый антиген + стандартная диагностическая сыворотка) и индикаторная или гемолитическая гемолитическая сыворотка + взвесь эритроцитов барана). Связующим компонентом между системами является комплемент.

Если исследуемый антиген гомологичен антителам, то образуется комплекс антиген + антитело и комплемент связан. В результате отсутствия свободного комплемента эритроциты не могут быть лизированы и будет задержка гемолиза (эритроциты находятся во взвеси – жидкость мутная, красного цвета). Если антиген не

гомологичен антителам, комплекс не образуется и при наличии свободного комплемента наблюдается полный гемолиз эритроцитов (лизис эритроцитов – жидкость прозрачная, красного цвета). Между этими двумя крайними результатами может быть задержка гемолиза разной степени выраженности.

РСК применяют для обнаружения и идентификации антигена (вируса) в исследуемом материале, а также для выявления и титрования антител в сыворотке крови.

Для определения специфической принадлежности ящуру ставят РСК – главный опыт одновременно с главным опытом ставят контроль всех специфических ящурных антигенов и сывороток. Если испытуемый антиген гомологичен специфическим антителам, то будет задержка гемолиза и реакция положительная; если же гомологичные антитела отсутствуют, реакция отрицательная и наблюдается полный гемолиз.

При производственной необходимости после определения типовой принадлежности вируса ящура устанавливают его подтип (вариант). Для этого ставят РСК по той же методики, но используют вариантовые сыворотки и антигены установленного типа, причем вариантовые сыворотки используют в предельном титре, а антигены – в удвоенном.

Вирусологические методы заключаются в выделении вируса в культуре клеток, на 3-6 дневных мышатах-сосунах, или на взрослых морских свинках. Заражение мышат проводят подкожно в область спины, морских свинок заражают внутрикожно интерплантарно в задние конечности. За животными наблюдают 5-7 дней. У морских свинок в месте введения обнаруживаются афты. Содержимое афта исследуется для обнаружения антигена в РСК с фабричными специфическими сыворотками.

Для проведения ретроспективной диагностики используют сыворотки крови взятые от животных не ранее 7 дней с момента появления признаков везикулярного поражения. От каждой возрастной группы следует направлять 5-10 проб сыворотки крови. При получении сомнительных результатов исследования необходимо отобрать кровь повторно от тех же животных через 7-10 дней. Сыворотку крови исследуют в РРИД, и РНИФ.

#### Постановка РРИД.

Сыворотку крови в разведениях 1:5; 1:10; 1:20 и до 1: 320 смешивают в равных объемах с расплавленным агаром 2 %-ной концентрации, смесь наносят на стекло . В застывшем агаре вырезают лунки диаметром 4-7 мм, в которые вносят эталонные антигенами. Затем стекла помещают во влажную камеру, при температуре 37°C. Учет проводят через 6-7 часов и окончательный учет через 18 часов. Реакция считается положительной при образовании вокруг лунки с антигеном кольца преципитации, что свидетельствует о принадлежности антител сыворотки крови фабричному типоспециальному антигену находящемуся в данной лунке. У переболевших животных как правило титр антител в сыворотке превышает 1:160.

#### Постановка НРИФ.

Для постановки этого метода необходимо использовать культуру клеток выращенную на покровных стеклах и инфицированную вирусом определенного типа. После приготовления препарата из такой культуры клеток на него наносят исследуемую сыворотку, выдерживают для образования комплекса, промывают и наносят флюоресцирующую антивидовую сыворотку, инкубируют, промывают, просушивают и просматривают в люминесцентный микроскоп. Положительный результат – это появление специфического зеленого или изумрудного свечения цитоплазмы клеток.

### 2.11 Лабораторная работа №11 (2 часа).

**Тема: «Лабораторная диагностика пневмоэнтеритов крупного рогатого скота»**

**2.11.1 Цель работы:** изучить методы лабораторной диагностики пневмоэнтеритов крупного рогатого скота

**2.11.2 Задачи работы:**

1. Рассмотреть перечень патологического материала необходимого для проведения лабораторной диагностики пневмоэнтеритов
2. Изучить признаки присутствия вирусов ИРТ, ПГ-3, ротавирусов, коронавирусов, адено-вирусов в культуре клеток.

3. Составить схему проведения лабораторной диагностики пневмоэнтеритов.

### **2.11.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Гемагглютинин и антитела к гемагглютинину
2. 1% суспензия эритроцитов кур или морской свинки
3. Пластиковые панели с лунками,
4. Аппарат Флоринского
5. Сосуд с дезинфицирующим раствором, спиртовки; сыворотки крови;

### **2.11.4 Описание (ход) работы:**

Патматериал для диагностики пневмоэнтеритов от больных в первые 2-3 дня, или от убитых с диагностической целью в острой стадии заболевания

В качестве патологического материала в острый период болезни берут смывы с носа, глаз, половых органов, пробы фекалий, смывы с прямой кишки

Для ретроспективной диагностики пневмоэнтеритов отбирают парные сыворотки крови (первая сыворотка в первые 3 дня болезни и 2-ая через 3 недели не менее чем от 10-15 телят)

Лаковая кровь на вирусоносительство

От вынужденно убитых животных и трупов - кусочки легких, трахеи, селезенки, кишечника, региональные лимфоузлы.

Для диагностики ротовирусной инфекции в качестве патматериала берут: 1) не менее 10 проб жидких фекалий (взятых в первые 1-3 дня болезни); 2) фрагмент тонкого кишечника с содержимым (взятого не позднее 1-2 часов с момента гибели или вынужденного убоя); 3) 10-15 проб парных сывороток от больных; 4) не менее 10 проб сыворотки от коров; 5) 10 проб молозива.

Транспортируют в термосе с охлаждающей смесью

Готовят 10%-ную суспензию на растворе Хенкса, центрифугируют 1ч при 3000 мин<sup>0</sup>'

Диагностика складывается из: 1) долабораторного этапа который включает эпизоотологические, клинические и патологоанатомические данные;

2) лабораторного этапа исследования. Лабораторные методы состоят из: 1) обнаружения вирусного антигена в РИФ, ИФА, РДП;

2) выделение вируса в культуре клеток ПЭК, ТБ, ЛЭК, (ПТ-80 только для адено-вирусной инфекции 1 п/группы; КСТ – для вирус диареи). При обнаружении ЦПД (деструкция – вируса ИРТ; образование синцитий – вирусом ПГ-3 и РС) идентифицировать в РН – ИРТ, ПГ-3, ВД, РСИ, адено-вирусы идентифицируют в РИФ.

Ретроспективная диагностика ПГ-3 в РТГА с эритроцитами морской свинки;

ИРТ – РНГА или ИФА или РН;

Адено-вирусы – РНГА или ИФА;

Вирусная диарея – РНГА или РСК, РДП, ИФА;

РСИ - в РНГА, или РСК, РДП

## **2.12 Лабораторная работа №12 (2 часа).**

**Тема: «Лабораторная диагностика лейкоза»**

**2.12.1 Цель работы:** изучить методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

### **2.12.2 Задачи работы:**

1. Рассмотреть методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота

2. Отработать методику постановку РИД
3. Провести выведение лейкоформулы и по её результатам оценить состояние животного

### **2.12.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Оборудование для постановки РИД (чашки Петри или обезжиренные предметные стекла; стандартный штамп-пробойник для пресечения лунок в агаре; пастеровские пипетки; pH-метр)
2. Набор для постановки РИД
3. Стабилизированная кровь (здорового животного); реактивы для окраски препаратов по Романовскому; камера Горяева;
4. Готовые мазки для выведения лейкоформулы,

### **2.12.4 Описание (ход) работы:**

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 вируса лейкоза крупного рогатого скота, специфической преципитирующей сыворотки к вирусу 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 доверху, 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 пластиинки - 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 ключу" (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.

## **2.13 Лабораторная работа №13 (2 часа).**

**Тема: «Дифференциальная диагностика вирусов гриппа и ньюкаслской болезни»**

**2.13.1 Цель работы:** изучить методы дифференциальной диагностики гриппа птиц от ньюкаслской болезни.

### **2.13.2 Задачи работы:**

1. Выяснить отличие ньюкаслской болезни от гриппа
2. Отработать методику проведения дифференциальной диагностики гриппа птиц от ньюкаслской болезни птиц в РТГА.

### **2.13.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Компоненты для постановки РГА и РТГА (гемагглютинин и антитела к гемагглютинину, 1% суспензия эритроцитов кур или морской свинки)
2. Пластиковые панели с лунками,
3. Сосуд с дезинфицирующим раствором, спиртовки.

### **2.13.4 Описание (ход) работы:**

Ньюкаслская болезнь – широко распространенная болезнь птиц, наносящее значительный экономический ущерб. Ньюкаслская болезнь вызывается вирусом семейства Paramyxoviridae. По клиническим признакам оно сходно с гриппом птиц.

Лабораторная диагностика проводится по следующему плану: 1) выделение вируса на куриных эмбрионах; 2) дифференциация от гриппа птиц в РТГА.

При подозрении на ньюкаслскую болезнь сначала проводят реакция гемагглютинации на обнаружении вируса (капельная). Положительная реакция гемагглютинации указывает на присутствие в патматериала гемагглютинирующего вируса.

Выделение вируса. С целью обнаружения вируса биопробой и его выделения суспензию из патматериала вводят 9-11 дневным куриным эмбрионам в аллантоисную полость. При размножении в них вируса ньюкаслской болезни лиз вируса гриппа птиц - эмбрионы гибнут через 20-76 ч. в зависимости от вирулентности штамма вируса. При вскрытии павших эмбрионов отмечают множественные кровоизлияния на темени, теле и лапках зародыша.

Аллантоисную жидкость павшего эмбриона отбирают при помощи пастеровской пипетки, устанавливают капельной реакцией присутствие в ней гемагглютинирующего вируса и используют для дальнейших исследований как материал, содержащий выделенный вирус.

Если при первом заражении не удается выделить вирус, то делают до трех последовательных «слепых» пассажей. При этом используют для заражения аллантоисную жидкость эмбрионов, давших в предыдущем пассаже отрицательную реакцию.

Если выделенный вирус при дальнейших исследованиях окажется вирусом ньюкаслской болезни, необходимо выяснить, является ли он вакцинным или эпизоотическим на патогенность полевого изолята будет указывать положительная биопроба на 3-6 невакцинированных цыплятах в возрасте 30 и более дней. Цыплят заражают внутримышечно 0,2 мл аллантоисной жидкости или суспензии (1:1000 органов погибшей птицы).

Дифференциация вируса ньюкаслской болезни от вируса гриппа необходимо проводить только в серологических реакциях. Для дифференциации этих вирусов наиболее подходит РТГА – реакция торможения гемагглютинации с эритроцитами кур. Выбор этой реакции определяется тем, что оба вируса обладают способностью агглютинировать эти эритроциты, а взаимодействовать только со специфической сывороткой позволит их четко дифференцировать. Кроме того реакция легко выполняется (не требует стерильности) и дает быстрый ответ. При дифференциации вирусов ньюкаслской болезни и гриппа в РТГА используют две специфические сыворотки, одна из которых содержит антитела к вирусу ньюкаслской болезни, а другая к вирусу гриппа птиц. Дифференцию можно провести постановкой РТГА в одной из двух модификаций.

1. Выделенный вирус титруют в РГА и готовят для постановки РТГА его рабочее разведение в титре 4 ГАЕ. Затем берут две специфические фабричные сыворотки и определяют титр антител в обеих сыворотках в присутствии выделенного вируса. В случае гомологичности антител известной сыворотки выделенному вирусу это приводит к торможению его агглютинирующей способности.

2. Готовят двукратные разведения выделенного вируса и используя постоянные дозы специфических сывороток определяют гомологичность антител в сыворотке выделенному вирусу.

## **2.14 Лабораторная работа №14 (2 часа).**

**Тема: «Решение диагностических задач »**

**2.14.1 Цель работы:** определить уровень знаний студентов по методам диагностики вирусных болезней

**2.14.2 Задачи работы:**

1. Поставить предположительный диагноз по имеющимся данным.
2. Определить перечень патологического материала, необходимого для проведения лабораторных исследований.
3. Указать методы лабораторной диагностики данной болезни.

**2.14.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Диагностические задачи.

**2.14.4 Описание (ход) работы:**

**Задачи:**

1. На птицефабрике возникло заболевание среди птицы 1-5 месяцев. Заболевание протекало со следующими клиническими признаками: у цыплят 1-2 месячного возраста массовые, быстро проходящие парезы ног, крыльев, хвоста; изменен цвет радужной оболочки глаз (сероглазие). Гибель 2-3%. У цыплят 3-5 месячного возраста наблюдали вялость, угнетение, снижение аппетита, удущье, депигментацию радужной оболочки, у некоторых птиц полная или частичная слепота, параличи, истощение и гибель. Летальность до 35%. На вскрытии павших птиц установлено: опухоли во внутренних органах (чаще всего в яичниках и семенниках). В мышцах, коже печени, селезенке множественные очажки различной величины. Кишечник катарально воспален. Диффузно-очаговое утолщение нервных стволов.

2. На птицефабрике заболели куры. У больных птиц наблюдали вялость, снижение аппетита, резкое снижение яйценоскости. В дальнейшем на коже гребня, бородок, углов рта, век, затылка, живота появились бледно-желтоватые пятнышки, которые покрылись от желтого до красно-бурого цвета струпом. У некоторых конъюнктивит, светобоязнь,

слезотечение. Летальность среди кур 10-20%, а среди молодняка - 50-70%. У павших трупы истощены: характерна застойная гиперемия во внутренних органах, а также крупозное и дифтерическое воспаление слизистых оболочек рта, горлани, трахеи.

3. В хозяйстве заболели овцы, козы, и крупный рогатый скот. У больных животных в ротовой полости можно обнаружить красные пятна различной величины и эрозии; температура тела повышенна на 1-2 °C, в области губ, носового зеркальца и крыльев носа видны везикулы, пустулы, корочки, а у овцематок и на вымени. У больных ягнят пенистые истечения из ротовой полости. У взрослых овец хромота (эрозии в области межкопытной щели). На вскрытии отмечают эрозии и язвы на слизистых оболочках ротовой полости

4. В хозяйстве возникло заболевание овец, свиней, крупного рогатого скота. Клинические признаки у овец и крупного рогатого скота сильный зуд, они трутся о различные предметы и расчесывают область лба, щек, головы. Эти участки кожи плотные, изъязвлены и покрыты струпьями. Наблюдаются манежные движения, некоторые ягната падают и совершают плавательные движения конечностями. Животные пугливы, насторожены и возбудимы, зрачки расширены. Температура тела 39,5- 40°C. В дальнейшем у животных наблюдаются параличи конечностей и больные животные погибают.

5. В промышленном комплексе откормочного типа среди телят 5-6 месячного возраста возникло заболевание, которое протекало со следующими клиническими признаками: лихорадка (39,5-42°C), учащенное и затрудненное дыхание, потеря аппетита, угнетение, гиперемия и отечность конъюнктивы и слизистой оболочки носовой и ротовой полостей, обильное слезотечение, слюноотделение и истечения из носовой полости слизистого или слизисто-гнойного характера, у некоторых кашель. На 4-8-й день у больных животных появляется диарея. Испражнения водянистые, со слизью и сгустками крови. На губах и деснах, языке эрозии и язвы. У телят катаральный конъюнктивит, а у некоторых помутнение роговицы. При вскрытии павших животных установлено: эрозии и язвы на слизистой оболочке губ, щек, десен, горлани, пищевода и съчуга. Слизистая оболочка тонкого кишечника гиперимирована, с кровоизлияниями.

6. В хозяйстве откормочного типа крупного рогатого скота через 15-20 дней после формирования сборного стада заболели телята. Заболевание протекало со следующими клиническими признаками: повышение температуры тела до 41,5 °C, слезотечение, у некоторых животных диарея, затрудненное дыхание, кашель. Летальность 3%. На вскрытии павших и вынужденно убитых животных установлено: увеличение и гиперемия заглоточных, бронхиальных и средостенных лимфатических узлов. Слизистая оболочка трахеи и бронхов гиперимирована, покрыта слизисто-гноинмым экссудатом, гиперемия легких с участками уплотнения. Слизистая оболочка кишечника катарально воспалена. У некоторых телят эрозия в ротовой полости.

7. На юге в одном приграничном хозяйстве заболели лошади со следующими клиническими признаками: рецидивирующая лихорадка с признаками анемии, колики, у некоторых понос с кровью, носовое кровотечение. Животные худеют, слизистые оболочки глаз, носовой и ротовой полостей отечны, желтушным оттенком и точечными кровоизлияниями. У отдельных - застойные отеки в области живота, конечностей. Летальность-25%. На вскрытии павших животных установлено: дистрофические изменения паренхиматозных органов, многочисленные кровоизлияния в различных органах, серозная инфильтрация в рыхлой соединительной ткани; слизистые и серозные оболочки бледные с желтушным оттенком, печень, селезенка, лимфатические узлы

увеличены. Сердце расширено за счет правого желудочка, кровь водянистая, светло-красного цвета.

## **2.15 Лабораторная работа №15 (2 часа).**

**Тема: «Контроль качества антибактериальных вакцин»**

**2.15.1 Цель работы:** дать характеристику вакцинам и рассмотреть критерии контроля качества вакцин

**2.15.2 Задачи работы:**

1. Рассмотреть классификацию вакцин и изучить требования к вакцинным штаммам .

2. Дать характеристику живым, инактивированным, аттенуированным вакцинам

3. Оценить стерильность инактивированных вакцин.

**2.15.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Вакцины

2. Чашки Петри с питательной средой, шпатели.

3. Термостат

**2.15.4 Описание (ход) работы:**

Вакцина - биопрепарат, приготовленный из возбудителей инфекции, лишенных патогенных свойств, но сохранивших иммуногенные свойства. Введение вакцины в организм ведет к активации факторов иммунитета, в том числе и к образованию антител против того возбудителя, из которого приготовлена вакцина. Вакцина – биопрепарат, предназначенный для создания активного иммунитета.

Основоположником вакцинации считают английского врача Э. Дженнера – 1796 г. Работы Л. Пастера - 1885 г.

В настоящее время благодаря достижениям в области микробиологии. Вирусология, генетике, биохимии, молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии постоянно совершенствуются и создаются новые биологические препараты для профилактики инфекционных болезней.

Все вакцины в зависимости от биологической системы используемой для культивирования вакцинного штамма различают:

1) тканевые в своей основе содержат ткань животных, в которой размножался и накапливался вакцинnyй штамм:

- лапинизированные - полученные в организме кролика;
- капринизированные – козы;
- авинизированные – куриных эмбрионах;
- культуральные – из зараженных культур клеток.

2) В зависимости от видовой принадлежности вакцинного штамма:

- гомологические – готовят из того вида возбудителя против которого необходимо создать иммунитет. Большинство вакцин гомологические.

- гетерогенные – готовят из возбудителей другого вида но имеющих в своем составе сходные антигены и обладающих перекрестной иммуногенностью. (например, вакцину против оспы кур готовят из вируса оспы голубей; вирус герпеса индеек используют для защиты кур от болезни Марека).

3) в зависимости от количества типов и видов возбудителей, включенных в состав вакцины, различают моновалентные, поливалентные, ассоциированные, смешанные вакцины.

Моновалентные – содержат антигены одного типа (вида) возбудителя.

Поливалентные (бивалентные, тривалентные и т.п.) – готовят из нескольких типов возбудителей. Например, тривалентная вакцина против вируса ящура содержит 3 типа вируса ящура- А.О.С.

Ассоциированные – содержит антигены возбудителей разных видов. Например, вакцина «Бивак» - против ИРТ и ПГ-3 КРС., «Тетравак» - чумы, аденовироза, инфекционного гепатита и парвовирусного энтерита.

Смешанные – представляют собой смесь вирусных и бактериальных антигенов. Например, вакцина против чумы плотоядных, ботулизма и вирусного энтерита.

4) В зависимости от жизнеспособности возбудителя, входящего в состав вакцины, их подразделяют на живые, инактивированные.

- Живые вакцины содержат селекционированные ослабленные (аттенуированные) штаммы вируса.

- Инактивированные – содержат инактивированные (убитые) штаммы возбудителя. Инактивацию осуществляют физическими и химическими методами.

Все вирусные вакцины делят на цельновирионные и компонентные. К цельновирионным относятся как живые так и инактивированные вакцины. К компонентным можно отнести все вакцины которые не входят в рубрику цельновирионных т.е. сплит-вакцины, субъединичные, синтетические, генно-инженерные.

Основное требование к живым вакцинам это чтобы производство вакцин было экономически выгодным, а применение достаточно эффективным.

Любой вакцинныи штамм должен быть хорошо изучен, клонирован, паспортизирован и комиссионно сдан во Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов, где он хранится поддерживается и контролируется.

Так как свойства вакцин определяются вакцинным штаммом, то к ним предъявляются следующие требования:

1) Генетическая стабильность – способность сохранять свои свойства в различных условиях пассирования на восприимчивых животных, в системе культивирования, хранения и т.д., т.е. штамм не должен подвергаться реверсии.

2) Безвредность – вакцинныи штамм не должен вызывать клиническую картину болезни, вместе с тем должен «приживаться» размножаться в организме естественно-восприимчивых животных. Высокоиммуногенные штаммы приживаются в организме на 2-4 недель. При идеальном исходе аттенуации вирус должен практически утрачивать способность поражать клетки-мишени, но сохранять способность размножаться в других клетках, обеспечивая создание выраженного и напряженного иммунитета .

3) Допустимая степень реактогенности определяется по наличию местной и общей температурной реакции, общему состоянию.

4) Чистота живых и стерильность инактивированных вакцин определяется путем посева на питательных средах.

5) Антигенная активность определяют по наличию титра антител в сыворотке крови.

6) Иммуногенные свойства определяют при помощи теста активной защиты высокочувствительных животных.

7) Эпизоотическая и эпидемическая безопасность.

Т.о. технология изготовления живых вакцин сводится к

- культивированию вакцинного штамма в какой-либо биологической системе (животные, эмбрионы, к.кл.);
- определению концентрации возбудителя (титра);
- контролю на стерильность;
- фасовке и лиофилизации (для сохранения биологической активности вируса перед лиофилизацией добавляют стабилизирующие вещества.)
- вакцина проходит контроль.

Если она соответствует всем критериям её этикетируют и впускают для применения. Живую противовирусную вакцину называют вирусвакциной.

## **2.16 Лабораторная работа №16 (2 часа).**

**Тема:** «Приготовление питательных сред для культивирования культур клеток»

**2.16.1 Цель работы:** приготовить питательные среды для культивирования клеток

### **2.16.2 Задачи работы:**

1. Изучить состав ростовых и поддерживающих питательных сред
2. Приготовить ростовую питательную среду для культивирования клеток.
3. Приготовить солевые растворы Хенкса и Эрла

### **2.16.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Лабораторная посуда
2. Среда 199
3. Сыворотка крови

### **2.16.4 Описание (ход) работы:**

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

*Раствор Хенкса:* На 1 л бидистиллированной воды берут

NaCl — 8,0 г, KCl — 4,0 г, MgSO<sub>4</sub> • 7H<sub>2</sub>O — 2,0 г, CaCl<sub>2</sub> — 1,4 г, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,6 г, глюкозы — 10 г, 0,2%-го фенолрота — 4,0 мл, Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub> — 0,6 г.

*Раствор Эрла:* на 1 л бидистиллированной воды добавляют — NaCl — 6,8 г, KCl — 0,4 г, CaCl<sub>2</sub> — 0,2 г, MgSO<sub>4</sub> — 0,1 г, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> — 0,125 г, NaHCO<sub>3</sub> — 2,2 г, глюкозы — 1,0 г.

Для определения в солевых растворах и питательных средах концентрации водородных ионов (pH) применяют индикатор феноловый красный (0,002%). Он не оказывает токсического воздействия на клетки и вирусы. При сдвигах pH в щелочную сторону растворы принимают красно-малиновую окраску, в кислую — желтую. При нейтральном значении pH (7,2...7,4) цвет среды оранжево-красный. Для регулирования pH солевых растворов и питательных сред используют 7,5%-ный раствор бикарбоната натрия NaHCO<sub>3</sub> и 3% -ный раствор уксусной кислоты CH<sub>3</sub>COOH. Эти растворы готовят на бидистиллированной воде, стерилизуют кипячением и хранят в холодильнике при 4...6 °C не более месяца.

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

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

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

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

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

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

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

## **2.17 Лабораторная работа №17 (2 часа).**

**Тема: «Определение общей и биологической концентрации микроорганизмов, сред для культивирования культур клеток»**

**2.17.1 Цель работы:** определить концентрацию микроорганизмов разными методами.

### **2.17.2 Задачи работы:**

1. Определить количество бактерий методом прямого счета
2. Определить количество бактерий путем подсчета колоний

### **2.17.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Взвесь клеток
2. Камера Горяева
3. Чашки Петри с питательной средой и колониями микроорганизмов

### **2.17.4 Описание (ход) работы:**

Определение количества бактерий. При характеристике развития микробной популяции, санитарной оценке кормов, продуктов питания, при вычислении показателя вирулентности микроорганизма необходимо устанавливать количество микробных клеток в единице объема того или иного материала.

Определение общего количества микроорганизмов. Можно применять метод прямого счета и метод измерения светорассеяния.

Метод прямого счета: бактерии подсчитывают в камерах Горяева, Тома или в окрашенных мазках. В последнем случае 0,01 мл бактериальной суспензии микропипеткой наносят на предметное стекло и равномерно распределяют на 1 см<sup>2</sup>. Мазок фиксируют, окрашивают и подсчитывают клетки в 10... 15 полях зрения по диагонали квадрата. Определяют среднее число клеток в одном поле зрения. Делят 1 см<sup>2</sup> на площадь поля зрения, которую измеряют методом микрометрии (см. тему 1), затем частное умножают на среднее число микробных клеток в поле зрения, получают их количество в 0,01 мл взвеси бактерий.

Метод измерения светорассеяния считают более точным. Количество света, рассеиваемого суспензией бактерий, пропорционально их концентрации. Этот показатель достаточно точно можно измерить при помощи фотоэлектроколориметра. Зависимость между оптической плотностью и концентрацией клеток различна для бактерий разных

видов. Поэтому при работе с таким прибором для каждого вида бактерий необходимо строить свою калибровочную кривую зависимости.

На практике широко используют простой субъективный метод, основанный на визуальном сравнении мутности исследуемой бактериальной суспензии с так называемым «стандартом мутности», выпускаемым Государственным научно-исследовательским институтом стандартизации и контроля биологических препаратов им. Л. А. Тарасевича. Стандарт представляет собой взвешенные в воде частицы стекла «Пирекс» и состоит из трех запаянных пробирок-эталонов (5, 10 и 20 международных единиц). Мутность стандарта на 10 ед. соответствует следующим концентрациям: для бактерий кишечной группы —  $0,93 \cdot 10^9$  кл/мл; коклюшной группы —  $11 \cdot 10^9$  кл/мл; для бруцеллезных бактерий —  $1,7 \cdot 10^9$  кл/мл; туляремийных микробов —  $5 \cdot 10^9$  кл/мл.

Мерной пипеткой вносят 0,1...0,5 мл исследуемой бактериальной суспензии в пустую пробирку, соответствующую по диаметру и толщине стенок пробирке «стандарта мутности». К суспензии добавляют физиологический раствор до оптической плотности стандарта на 10 ед. Физиологический раствор вносят небольшими мерными порциями, записывая его количество и сравнивая мутность опытной и стандартной пробирок невооруженным глазом на фоне специальной шрифтовой таблицы. Зная, во сколько раз развели исследуемую бактериальную суспензию, чтобы уравнять ее оптическую плотность со стандартом, можно рассчитать содержание микробных клеток в 1 мл исходной суспензии.

Например, в пробирку поместили 0,1 мл суспензии бактерий, содержащей неизвестное количество клеток. Для уравнивания оптической плотности исследуемой суспензии со стандартом мутности 10 ед. в пробирку добавили 0,9 мл физиологического раствора, т. е. исходную суспензию развели в 10 раз. Известно, что суспензия данного вида бактерий при оптической плотности 10 ед. содержит  $1,3 \cdot 10^9$  кл/мл. Следовательно, концентрация исследуемой суспензии составляет  $1,3 \cdot 10^{10}$  кл/мл.

При работе с бактериями, для которых нет данных о содержании микробных клеток в 1 мл относительно «стандarta мутности», необходимо предварительно методом прямого счета определить их количество в суспензии, например, оптической плотностью 10 ед.

Определение количества живых микроорганизмов. Метод основан на выводе, что бактериальная колония — это результат деления единичной клетки на плотной питательной среде (исключение составляют бактерии, образующие цепочки из клеток).

Мерной пипеткой объемом 1 мл добавляют 1 мл культуры E. coli в бактериологическую пробирку с 9 мл стерильного физиологического раствора, подогретого до 37...38 °C (разведение 10-1). Далее аналогичным способом готовят разведения культуры от 10-2 до 10-8. Для каждого разведения используют новую пипетку того же объема и класса. Из пяти последних пробирок суспензию бактерий по 0,1 мл наносят на поверхность подсушенного МПА в две чашки Петри. Внесенный материал стерильным шпателем распределяют по поверхности питательной среды. Посевы инкубируют при 37...38 °C 24 ч.

Учет результатов: в чашках Петри, где выросло более 150...300 и менее 10 колоний, результаты не учитывают. Выбирают чашки Петри с параллельными посевами (из одного разведения), содержащими 10... 150 колоний. Подсчитывают колонии на чашках из одного разведения, суммируют, определяют среднее число колоний и с учетом степени разведения рассчитывают содержание жизнеспособных клеток (колониеобразующих единиц) в 1 мл исходной суспензии бактерий.

## 2.18. Лабораторная работа №18 (2 часа).

**Тема: «Стандартизация, принципы контроля и сертификации биопрепаратов сред для культивирования культур клеток»**

**2.18.1 Цель работы:** дать характеристику биопрепаратам и ознакомиться с принципами контроля, сертификации биопрепарата.

**2.18.2 Задачи работы:**

1. Рассмотреть порядок проведения стандартизации и сертификации биопрепаратов
2. Ознакомиться с критериями контроля биопрепаратов.

**2.18.3 Перечень приборов, материалов, используемых в лабораторной работе:**

1. Биопрепараты.

**2.18.4 Описание (ход) работы:**

Производство биопрепаратов требует специальных условий, связанных с необходимостью обеспечения безопасности работы с возбудителями инфекционных болезней. В силу особенностей производства вакцин и других биологических препаратов ВОЗ разработала специальные правила (УМР), которым необходимо следовать при производстве вакциновых препаратов.

На основе международных правил во многих странах разрабатываются свои правила по производству биопрепаратов.

В документах отражены требования к персоналу производства вакцин, требования к производственным и складским помещениям, оборудованию, документации, сырью, материалам, реактивам, процессу производства, контролю качества продукции на разных этапах производства, требования к упаковке и маркировке продукции, к отделу биологического и технологического контроля. Здесь же содержатся правила отбора образцов продукции на контроль, условия транспортирования и хранения препаратов.

Персонал, занятый производством вакцин, должен иметь определенный уровень образования, специальной подготовки и соблюдать санитарно-гигиенические правила.

Персонал должен проходить диспансеризацию не реже 1 раза в год. Сотрудники, подвергающие риску заражения, должны быть привиты соответствующими вакцинами и регулярно обследованы на туберкулез (на предприятии должна иметься инструкция).

Территория, где расположено производство вакцин, должна пройти экологическую экспертизу. Интерьер помещений должен быть доступным и удобным для уборки и дезобработки. Помещения должны иметь надежную систему вентиляции. Должны соблюдаться условия, гарантирующие защиту от выброса инфекционного материала в окружающую среду. На случай аварии должно быть предусмотрено аварийное электро-, тепло- и водоснабжение.

Процесс изготовления препарата должен быть изложен в инструкциях, подробно описывающих каждую стадию технологической цепочки. На каждую серию препарата составляется специальный протокол, в котором указываются все данные об изготовлении и контроле препарата. Документ включает паспорт, свидетельствующий, что данная серия препарата соответствует требованиям нормативной документации (НД).

Контроль качества вакцин на предприятиях-изготовителях предусматривает обязательный поэтапный контроль материала на разных стадиях технологического процесса:

- 1) входной контроль исходного сырья;
- 2) контроль полуфабриката;
- 3) контроль готовой продукции.

Обязателен двойной контроль продукции на основных этапах производственного цикла в производственных помещениях и ОБТК. При ОБТК находится музей юридических образцов серий препаратов, отправленных предприятием потребителю (для повторного контроля препаратов в случае рекламации)

Предприятию может быть выдано три вида сертификата.

Особыми формами постлицензионного надзора за качеством вакцин являются исследования эффективности вакцин при широком их применении в практике, мониторинг побочного действия вакцин и расследование случаев поствакцинальных осложнений

*Сертификат производства* выдается на отдельный вид препарата. Он является гарантией того, что на предприятии есть все условия для выпуска вакцины, соответствующей требованиям НТД.

*Сертификат качества* – документ, в котором приведены параметры качества вакцины в соответствии с требованиями фармакопейной статьи.

*Сертификат соответствия* дается предприятию на серии препарата, которые прошли контроль в ГИСК им. Л.А. Тарасевича для медицинских и во ВГНКИ ветпрепаратов для ветеринарных препаратов.

Для проведения биологического контроля биопрепаратов организуется их контроль по следующим параметрам:

- стерильность;
- авирулентность;
- безвредность;
- реактогенность;
- иммуногенная активность.

Важнейшим элементом биологического контроля является контроль на безвредность, который проводится в виде комиссионной проверки вакцины на тех животных, для которых планируется её практическое применение.

Стандартизацию инактивированной взвеси культуры микроорганизмов проводят в результате сравнения с эталонами различной мутности, фотометрически подогнанными к мутности взвеси бактерий определенной концентрации. Приготовленную взвесь культуры подвергают проверке на стерильность, безвредность, активность.

Все инактивированные препараты должны быть стерильными. Контроль на стерильность проводится с использованием различных питательных сред, которые обеспечивают надежное выявление аэробных и анаэробных бактерий, а также грибов и дрожжей. При выявлении бактерий препараты уничтожаются.