Министерство образования и науки республики Казахстан

Костанайский государственный университет им. А.Байтурсынова

Кафедра ветеринарной санитарии

Р. Туякова

М. Орынтаева

Диагностика вирусных инфекций

Методическое указание для выполнения практических работ

Часть ῙῙ

Костанай, 2012

ББК 48.4

Т 92

Авторы:

Туякова Рауза Какеновна, кандидат ветеринарных наук, доцент

Орынтаева Макпал Джанкельдиновна, преподаватель

Рецензенты:

Туякова Р.К., Орынтаева М.Д.

Т 92 Диагностика вирусных инфекций- Костанай: КГУ им. А.Байтурсынова, 2013. – 70 с.

Методические указания для выполнения практических работ по диагностике вирусных инфекций изложены формы и методы практических занятий по общей и частной вирусологии. Рассмотрены вопросы, имеющие значения при диагностике болезней животных, методы индикации и идентификации вирусов. Отражена специфика диагностики наиболее значимых вирусных болезней животных.

Предназначено для студентов очной и заочной формы обучения по ветеринарным специальностям.

ББК 48.4

Утверждено Научно- методическим советом Костанайского государственно университета им. А.Байтурсынова, протокол от \_\_\_\_\_\_20\_\_\_№ \_\_\_\_

© Костанайский государственный

университет им. А.Байтурсынова, 2013

Содержание

|  |  |
| --- | --- |
| Введение…………………………………………………………………. | 3 |
| Правила работы с вируссодержащим материалам…………………. | 4 |
| Получение и транспортировка патологического материала………… | 6 |
| Схема лабораторной диагностики вирусных заболеваний………….. | 8 |
| Индикация вирусов в патологическом материале путем обнаружения вирионов и телец-включений…………………………………………… | 10 |
| Использование в вирусологии культур клеток………………………… | 15 |
| Лабораторные животные и их использование в вирусологии………… | 17 |
| Куриные эмбрионы для роста вирусов…………………………………. | 20 |
| Реакции гемагглютинации……………………………………………... | 24 |
| Реакция торможения (задержки) гемагглютинации (РТГА,РЗГА)……………………………………………………………… | 26 |
| Реакция связывания комплемента………………………………………. | 28 |
| Реакция диффузионной преципитации в геле и ее использование в вирусологии……………………………………………………………….. | 31 |
| Реакция иммунофлюоресценции…………………………………………. | 34 |
| Иммуноферментный анализ. …………………………………………….. | 36 |
| Полимеразная цепная реакция. …………………………………………... | 42 |
| Лабораторная диагностика оспы животных……………………………... | 47 |
| Лабораторная диагностика бешенства……………………………………. | 50 |
| Лабораторная диагностика лейкоза крупного рогатого скота…………. | 55 |
| Лабораторная диагностика ящура……………………………………….. | 58 |
| Определение и термины ………………………………………………….. | 63 |
| Список использованный источников……………………………………. | 74 |

**Введение**

Все возрастает интерес к вирусам — мельчайшим микроорга­низмам, стоящим на самой границе между живым и неживым и не способным к проявлению каких-либо признаков живого вне кле­ток Вирусы в прошлом и настоящем остаются одними из глав­ных возбудителей многих инфекционных заболеваний. Доста­точно отметить, что черная оспа, известная человечеству тысяче­летия и уносившая миллионы жизней и побежденная в наши дни, является вирусным заболеванием. Вирусную природу имеют мно­гие массовые заболевания (грипп, СПИД и др.), которые до сих пор несмотря на огромные усилия исследователей многих стран мира, нельзя считать побежденными. Общепризнано, что суще­ствуют вирусы, непосредственно вовлеченные в образование опу­холей у человека и животных.

Установлена вирусная этиология многих болезней растении, из-за которых происходят потери миллионов тонн сельскохозяй­ственной продукции и заметно снижаются продовольственные ре­сурсы человечества. Несколько поколений биологов изучают ви­русы, поражающие растения, которые имеют большое хозяй­ственное значение.

Вирусы представляют огромный практический интерес для ветеринарии, здравоохранения и растениеводства. Как показали исследования последних 3...4 десятилетий, вирусы служат неза­менимыми, самой природой созданными объектами и моделями, помогающими решать общебиологические, генетические, биохи­мические, молекулярно-биологические, эволюционные и другие проблемы. Так, для выяснения фундаментальных принципов репликации, транскрипции, трансляции и способов регуляции ген­ной активности, а также для расшифровки генетического кода структур белков и нуклеиновых кислот широко используют как целые вирусные частицы, так и их отдельные компоненты.

Можно без преувеличения сказать, что любой современный ветеринарный специалист должен знать основы вирусологии. Поэтому овладение те­оретическими знаниями и практическими навыками по профилактике и диагностике вирусных болезней животных составляет обязательный и важнейший элемент подготовки ветеринарного врача широкого профиля.

**Тема: Правила работы с вируссодержащими материалами**

**Цель занятия:** ознакомиться с планировкой и оборудованием вирусологической лаборатории, её документацией, правилами и техникой безопасности при работе с вируссодержащим материалом.

Вирусологическая лаборатория предназначена для выполнения научно – исследовательской, производственной или учебной работы. Лаборатория имеет пять, шесть комнат: приемная, комнаты - для вирусологических исследований, где имеются боксы; автоклавная комната; моечная комната; виварий.

Помещение вирусологической лаборатории должно быть изолировано (отдельное здание или отсек с отдельным входом и выходом). Внутреннее расположение помещений должно максимально обеспечивать безопасность персонала (разделение на "заразную" и "чистую" часть, душ по типу санитарного пропускника и т.п.). Оборудуется строго автономная система вентиляции. По ходу вытяжной вентиляции устанавливают специальные фильтры, стерилизующие воздух. Окна боксов должны быть закрыты наглухо.

Весь персонал лаборатории проходит инструктаж и обучение безопасным методам труда, обеспечивается спецодеждой, спецобувью, средствами санитарной защиты и защитными приспособлениями в соответствии с действующими нормами.

При работе вируссодержащим материалом необходимо выполнять следующие требования:

* Не допускать рассеивания вирусов во внешней среде;
* Обеспечить личную безопасность
* Предотвратить контаминацию вируссодержащего материала посторонней микрофлорой.

Вся работа с вируссодержащим материалом – заражением культуры ткани, куриных эмбрионов и лабораторных животных, серологические исследования с живыми вирусами, приготовлением различных линий культур тканей - первичных и перевиваемых - производится в боксах.

В лаборатории оборудуют самостоятельную автоклавную. Вынос инфекционного материала для обеззараживания за пределы лабораторий запрещается.

Время непрерывной работы с заразным или подозрительным на зараженность материалом ограничивается 3-4 часами, после чего устанавливается часовой перерыв в работе с патогенными материалами. При необходимости проведения экстренных исследований этот перерыв сокращается до 30 минут.

Для работающих с материалом, подозрительным на зараженность возбудителями второй группы, в конце рабочего дня проводят ежедневное термометрирование. Температура каждого сотрудника регистрируется в специальном журнале под контролем и за подписью ответственного по лаборатории лица.

Все сотрудники до и после работы проходят санитарную обработку в пропускнике, который оборудуется для этого индивидуальными шкафами для личных вещей, одежды и обуви.

При заражении и вскрытии животных и эмбрионов птиц, а также при работе с инфекционным материалом на культурах ткани, сотрудники должны надевать защитные очки, маски-респираторы, резиновые перчатки, нарукавники и фартуки из клеенки. При работе за защитным стеклом Фурко или в настольном боксе надевать защитные очки не обязательно.

Место на столе, где производят работу, застилают трехслойной марлей, обильно смоченной дезинфицирующим раствором. На столе устанавливают сосуд с чистым дезинфицирующим раствором, куда опускают руки в резиновых перчатках после каждой манипуляции с заразным материалом. Около стола устанавливают баки для сбора вскрытых трупов животных и эмбрионов птиц, посуды, пробок и пр.

После окончания работы инструментарий немедленно кипятят.

Столы и лабораторные предметы (штативы, кюветы и т.п.) обеззараживают дезинфицирующим раствором или обжигают с помощью смоченного в спирте тампона. Халаты, респираторы и спецодежду складывают в биксы или специальные мешки автоклавируют. Очки погружают в 70% спирт на 2 часа.

Матрацы, флаконы, пробирки и т.п. с зараженными культурами ткани переносят в другие помещения только в закрытых металлических контейнерах с ватно-марлевыми прокладками, пропитанными дезинфицирующим раствором.

При заражении и вскрытии животных дополнительно должны соблюдаться следующие правила:

* заражение и вскрытие мелких животных (мышей и др.) производится в защитных стеклянных настольных боксах при соблюдении правил асептики и предупреждения возможного разбрызгивания инфекционного материала;
* интраназальное заражение животных проводят в настольно боксе или же в специальном аэрозольном аппарате. Интраназальное заражение производят только наркотизированным животным;
* мелких животных, предназначенных для вскрытия, умерщвляют хлороформом или эфиром в тех же банках, в которых они находились, после чего по счету передают для вскрытия;
* животных вскрывают на специальных досках и лотках соответствующих размеров;
* в тех случаях, когда применение наркоза невозможно или недопустимо, необходимо пользоваться специальными операционными столиками или приспособлениями для фиксации мелких животных, предупреждающими возможность укуса персонала.

Работа с куриными эмбрионами и культурами ткани производится в боксе. Пробки матрацев, флаконов и пробирок извлекают только над пламенем горелки. Заразный материал в сосуд вводят так, чтобы не инфицировать горловину посуды, края отверстия посуды прожигают над пламенем горелки и закрывают пробкой.

Работу по измельчению органов, инфицированных вирусами, производят в настольных боксах, защищающих персонал от образующихся при этом капель. Растирание и суспензирование органов производят в ступке или банке с бусами притертой пробкой, помещенными в глухой четырехслойный марлевый чехол.

Центрифугу для работы с вируссодержащим материалом устанавливают в предбокснике или операционной. Жидкость разливают в стаканчики или центрифужные пробирки из тугоплавкого стекла, плексигласа или металла и обязательно закрывают пробкой или завинчивающейся крышкой.

**Контрольные вопросы**

1 Что вы знаете о технике безопасности и правилах работы в вирусологической лаборатории?

2 Какие правила должны соблюдаться при заражении и вскрытии животных?

3 Какие способы уничтожения вирусов существуют в лабораторной практике?

**Тема: Получение и транспортировка патологического материала**

**Цель занятия:** научиться брать патологический материал от больных животных и трупов.

Отбор, консервирование, транспортировка патологического материала - работа очень ответственная. Нарушение правил ее проведения может привести к распространению болезни и срыву постановки диагноза. Патологический материал берут сразу после смерти животного и доставляют в лабораторию в этот же день. В этом случае консервирование не требуется. Если на доставку уходит больше времени, то для исследования патологический материал консервируют 30% водным раствором химически чистого глицерина, можно консервировать вазелиновым маслом, 10% раствором поваренной соли. Небольшие трупы посылают целыми в непроницаемой таре. Трубчатые кости посылают очищенными и завернутыми в смоченную 5% раствором карболовой кислоты марлю.

Кровь, гнои, слизь, экссудат, мочу, желчь, жидкий патологический материал для вирусологических исследований посылают в запаянных пастеровских пипетках, стерильных пробирках или флаконах, закрытых притертыми или стерильными резиновыми пробками. Пробы слизи берут стерильными марлевыми тампонами. Кровь у животных берут из яремной вены, ушной раковины или края верхушки уха. У птиц с поверхности гребня или подмышечной вены.

Кишечник перед посылкой в лабораторию освобождают от фекалии и перевязывают концы. Помещают в банку с 30% водным раствором глицерина.

Во всех случаях патологический материал берут стерильным инструментом и помещают в стерильную посуду. Она всегда должна быть подготовлена для взятия патологического материала. И храниться в соответствующих условиях. Кровь перед отправкой в лабораторию отстаивают, в течение часа при 30-37 °С, сгустки от стенки отделяют стальной стерильной спицей, выдерживают сутки при 5-10 °С. А затем сливают в стерильные пробирки и посылают в лабораторию. При хранении до 8 °С не консервированную сыворотку можно использовать в течении шести дней.

При необходимости консервируют:

* одной каплей 0,05% фенола на мл сыворотки при постоянном помешивании;
* 2-4% сухой борной кислоты к объему сыворотки;
* путем однократного замораживания или высушивания.

Пробы грубых кормов берут с разных мест с помощью ножниц и пинцета. Одну пробу сухого корма берут с площади 4 кв. м. весом не менее 40 г., а зеленой массы - 100 г. Каждую отобранную пробу помещают в сухую стерильную стеклянную банку.

Патологический материал должен быть упакован в плотной деревянной или металлической таре. Стеклянная посуда с патологическим материалом должна быть завернута в целофан, пергаментную бумагу и окутана тканью или мешковиной, смочено фенольным креолином или известковым молоком (табл. 1).

Таблица 1 - Отбор патологического материала для диагностики вирусных болезней



На всякий материал составляют сопроводительный документ:

В\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ветеринарную лабораторию

Адрес:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

При этом направляем для\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ патологический материал (перечислить какой, от каких животных, в каком виде)\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Принадлежащий(назвать хозяйство)\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Дата заболевания\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Дата падежа\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Клиническая картина болезни\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Предварительный диагноз\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Дата отправки патматериала\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

ФИО и подпись ветврача\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

**Контрольные вопросы**

1. Каковы общие правила взятия материала от больных животных и трупов?
2. Как консервируют и транспортируют патологический материал?
3. Что вы знаете о подготовке патологического материала к исследованию?

**Тема: Схема лабораторной диагностики вирусных заболеваний**

**Цель занятия**: ознакомление со схемой лабораторной диагностики вирусных заболеваний.

**Вирусологические исследования** — исследования, предназначенные для выделения вирусов и изучения их свойств, а также установления этиологической связи вирусов с определенными заболеваниями.

Вирусологические методы исследования основаны также на иммунологических процессах (взаимодействие антигена с антителами), биологических свойствах вируса (способность к гемагглютинации, гемолизу, ферментативная активность), особенностях взаимодействия вируса с клеткой-хозяином (характер цитопатического эффекта, образование внутриклеточных включений и т.д.).

Перед использованием материал для выделения вирусов обрабатывается антибиотиками (пенициллин и стрептомицин) для подавления посторонней микрофлоры и подвергается центрифугированию для удаления крупных частиц.

В настоящее время для диагностики вирусных инфекций используют 3 основных вида исследования.

* Микроскопическое исследование заразного материала с целью выявления вирусного антигена или патологических изменений в тканях. В диагностических целях прямое микроскопическое исследование инфекционного материала от больных используется при ограниченном числе вирусных инфекций (бешенстве, ветряной оспе, желтой лихорадке, герпесе и др.). Более широкое применение получил метод, основанный на обнаружении вирусного антигена с помощью флуоресцирующих антител. Метод иммунофлуоресценции может быть достоверным лишь при четком выполнении всех технических требований.
* Вирусологические методы.
* Серологические исследования для определения прироста титра антител в динамике болезни. Серологические методы исследования более доступны в лабораторных условиях. Для этих исследований необходимо взятие сыворотки крови в острый период болезни и в период реконвалесценции (парные сыворотки). Пробы крови для серологических исследований берутся стерильно без антикоагулянтов и консервантов.

Основными этапами вирусологических исследований являются выделение вирусов, их идентификация, характеристика основных биологических свойств. Для выделения различных групп вирусов в настоящее время не существует единой методики.

Выделение вирусов осуществляется путем заражения вируссодержащим материалом лабораторных животных, куриных эмбрионов, культуры тканей. Выбор способа выделения зависит от предполагаемого возбудителя заболевания. Так, культуры тканей используют при работе с вирусами, не патогенными для лабораторных животных, или когда вирусы в культуре тканей выявляются раньше, чем при инфицировании животных. Куриные эмбрионы заражают для выделения возбудителей гриппа, инфекционного паротита (в амниотическую и аллантоисную полости), орнитоза (в желточный мешок), оспы (на хорионаллантоисную оболочку).

Из лабораторных животных для выделения вирусов наиболее часто используют белых мышей, затем кроликов, крыс, морских свинок, обезьян. Для арбовирусов наиболее эффективно введение вируссодержащего материала в головной или спинной мозг, для пневмотропных вирусов — на слизистую оболочку дыхательных путей, для вирусов оспы, герпеса — на скарифицированную роговицу.



Рисунок 1 - Схема лабораторной диагностики вирусных болезней животных

**Контрольные вопросы**

1. На чем основаны вирусологические методы исследования?
2. Расскажите сущность серодиагностики?

**Тема: Индикация вирусов в патологическом материале путем обнаружения вирионов и телец-включений**

**Цель занятия:** ознакомление, приготовление препаратов, схематическая зарисовка вирионов разных семейств, вирусов по электронным микрофотографиям.

Обычно вирусы находятся в живых клетках одно- и многокле­точных организмов. В клетках вирусы представлены чаще всего в виде скоплений не связанных между собой молекул РНК или ДНК, в которых закодирована генетическая информация о вирус­ных белках. В результате реализации этой информации в тех же клетках синтезируются и накапливаются молекулы вирусных бел­ков. Внутри клеток все вирусные молекулы (ДНК, РНК, белки) защищены от разрушительного действия внеклеточных факторов (ферментов, кислот, температуры, излучений и др.). Если же ви­русы оказываются вне клеток, то быстро разрушаются.

Многие вирусные белки, которые называются структурными, обладают свойством самопроизвольно под действием межмоле­кулярных сил собираться в комочки, агрегаты (процесс само­сборки). В каждый такой агрегат включается обычно по одной молекуле вирусных ДНК или РНК. Иногда в них могут включаться еще и липиды клеточного происхождения. Образующиеся таким путем частицы называютсявирионами. В вирионах молеку­лы белков так взаимно ориентированы, что на них не могут дей­ствовать протеолитические ферменты, а молекулы вирусных ДНК или РНК оказываются недоступными для нуклеаз и защи­щенными от действия физических факторов среды. Формирова­ние вирионов каждого отдельного вируса возможно только в клетках определенного типа.

Вирионы можно рассматривать как покоящуюся неактивную форму существования вирусов. Поэтому в форме вирионов вирусы могут определенное время находиться и вне клеток без потери био­логической активности. Именно в этой форме вирусы мигрируют из клетки в клетку и из одного организма в другой. Такая форма существования вирусов изучена значительно лучше, чем внутри­клеточная, что связано с техническими трудностями изучения.

Вирионам каждого вируса присущи свои особенности формы, размеров, структуры и свойств. Но есть и общие черты, свойствен­ные вирионам всех (или почти всех) вирусов. Каждый вирион со­держит одну полную или неполную молекулу ДНК или РНК, плотно одетую капсомерами — морфологическими единицами различной формы, состоящими из одной или нескольких белко­вых молекул. Совокупность всех капсомеров, уложенных в опре­деленном порядке, составляет капсид, а вместе с нуклеиновой кислотой — нуклеокапсид (с химической точки зрения — нуклеопротеид). Вирионы некоторых вирусов (в основном вирусов жи­вотных) кроме нуклеокапсида имеют еще внешнюю, или супер-капсидную, оболочку, возникающую путем захвата части оболоч­ки клетки при выходе из нее вирионов. Встречаются вирусы, в вирионах которых образуется еще одна, промежуточная, оболочка (М-оболочка), состоящая в основном из липидов и белков (виру­сы гриппа).

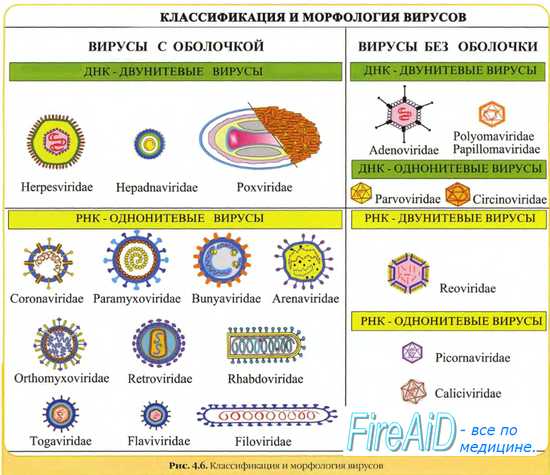


Рисунок 2 - Классификация и морфология вирусов

Различают два способа укладки капсомеров вокруг молекулы нуклеиновой кислоты: по спиральному и ку­бическому типам симмет­рии.

В первом случае капсомеры уложены вокруг нукле­иновой кислоты по спирали и образуют с ней единый нуклеопротеидный тяж. Такие вирионы имеют палочковид­ную, пулевидную (и даже ни­тевидную) формы. Но встречаются вирусы, напри­мер ортомиксовирусы живот­ных, в вирионах которых спиральный нуклеопротеидный тяж свернут в клубок, одетый оболочками, форма вирионов у них округлая или овальная.

Большинство же вирусов животных имеет вирионы, в которых капсомеры уложены по кубическому типу симмет­рии и образуют фигуру мно­гогранника, чаще всего ико­саэдра. Каждая грань многогранника образо­вана определенным для каж­дого вируса количеством кап­сомеров. У некото­рых вирусов вирионы не имеют четко выраженной симметрии. Размеры их колеблются от 10 до 350 нм, что меньше половины длины волны видимого света, и поэтому вирионы ви­русов не видны в световом микроскопе, предельная раз­решающая способность кото­рого около 300— 400 нм.

Обычно удастся рассмот­реть вирионы вирусов и уста­новить их структуру с помощью электронной микроскопии, по­зволяющей различать объекты размерами до 0,2—0,4 нм. Об­наружение с помощью элект­ронной микроскопии в матери­але от больных животных вири­онов может служить доказа­тельством наличия вирусов в этом материале и в некоторых случаях используется для диагностики вирусных болезней животных. Однако этот метод, будучи технически сложным и дорогостоящим, не позволяет точно идентифицировать обнаруженный вирус (от этого недо­статка свободен метод иммуно-электронной микроскопии), по­этому он пока не нашел широ­кого практического применения в диагностике вирусных болез­ней животных. Только вирионы оспенных вирусов удается увидеть в све­товой микроскоп (хотя и на пределе видимости), поскольку они являются гигантами среди вирионов других вирусов, дос­тигая в размере 300—390 нм. Метод обнаружения вирионов оспенных вирусов с помощью световой микроскопии называ­ется вирусоскопией.

При репродукции многих ви­русов в клетках образуются внут­риклеточные вирусные тельца-включения. Они могут быть цитоплазматическими и внутриядерными. По природе это или скопление многих тысяч вирионов, оставшихся в клетке, или клеточный материал, изменившийся под действием репродукции вирио­нов, или избыток вирусных белков, не вошедших в состав вирионов, или комбинация этих элементов (чаще всего). Размер телец-включений ко­леблется от едва заметных до размеров клеточного ядра, а количество — от одиночных до 10—12 на одну клетку. Тельца-включения, образуемые в клетках некоторыми вируса­ми, получили специальные названия. Так, тельца-включе­ния, образуемые вирусом бе­шенства в цитоплазме не­рвных клеток, называются тельцами Бабеша—Негри, образуемые в цитоплазме эпителиальных клеток вирусами оспы птиц — тельцами Боллингера, а оспы млекопитающих — тель­цами Гварниери, вирусом чумы плотоядных — тельцами Лентца, вирусом инфекционного ларинготрахеита кур — тельцами Зейфреда.

Рисунок 3 - Тельца Гварниери, тельца Бабеша—Негри

Как правило, РНК-содержащие вирусы образуют цитоплазмические, а ДНК-содержащие — внутриядерные тельца-включения. Небольшая группа вирусов вызывает образование телец-включе­ний обоих типов.

Способность к окраске теми или иными красителями, размеры, форма, структура и местоположение в клетке телец-включений, образованных разными вирусами, неодинаковые и специфичные для каждого вируса. Поэтому обнаружение в материале от боль­ных животных внутриклеточных телец-включений с определен­ными характеристиками позволяет судить о том, каким вирусом они образованы, а значит, и о присутствии этого вируса в исследу­емом материале.

Для некоторых вирусных болезней (бешенство) обнаружение телец-включений настолько специфично, что позволяет судить о виде инфекции. В большинстве же случаев об­наружение вирусных телец-включений — лишь вспомогательный метод диагностики.

Для обнаружения телец-включений готовят мазки или отпечат­ки (посмертно или прижизненно), которые подвергают специаль­ным методам окраски с последующей микроскопией. Для телец-включений, образуемых разными вирусами, методы окраски раз­личны. Разработано много рецептов окраски. Среди них есть и универсальные, к которым относится окраска гематоксилин-эозином.

**Контрольные вопросы**

1. Как называются тельца-включения болезни бешенства?
2. Какие способы укладки капсомеров различают?

**Тема: Использование в вирусологии культур клеток.**

**Цель занятия:** ознакомиться с культурами клеток и методика их получения.

Культура клеток — это клетки многоклеточно­го организма, живущие и размножающиеся в искусственных усло­виях вне организма (invitro).

В вирусологической практике применяют следующие культуры клеток.

**Первично-трипсинизированные культуры кле­ток** — клетки, полученные непосредственно из органов или тка­ней организма, растущие invitro в один слой. Культуру клеток можно получить практически из любого органа или ткани челове­ка или животного (взрослого или эмбриона). Чаще всего для этих целей используют почки, легкие, кожу, тимус, тестикулы эм­брионов или молодых животных.

Для получения первичных клеток от здорового животного не позднее два , три часа после убоя берут соответствующие органы или тка­ни, измельчают их на кусочки (1—4 мм) и обрабатывают фермен­тами: трипсином, панкреатином, коллагеназой и другими (чаще трипсином). Ферменты разрушают межклеточные вещества, полу­ченные при этом отдельные клетки суспендируют в питательной среде и культивируют на внутренней поверхности пробирок или матрасов в термостате при 37 °С.

Клетки прикрепляются к стеклу и начинают делиться. В раз­витии культур клеток различают несколько фаз: адаптации, ло­гарифмического роста, стационарную и старения (гибель кле­ток). Размножаясь, клетки размещаются на поверхности стекла и при полном покрытии его в один слой контактируют друг с другом и прекращают делиться (контактная ингибиция). На стекле формируется слой толщиной в одну клетку (поэтому эти культуры клеток называют однослойными или монослойными).

Обычно монослой формируется через три, пять дней.

Питательную среду меняют по мере загрязнения ее продуктами жизнедеятельности клеток. Монослой сохраняет жизнеспособ­ность в течение семи, двадцати одного дня.

**Субкультуры.** В вирусологической практике часто используют субкультуры, которые получают из первичных клеток, выращен­ных в матрасах, путем снятия их со стекла раствором версена или трипсина, ресуспендирования в новой питательной среде и пере­сева на новые матрасы или пробирки. Через двух, тех суток формируется монослой.

**Перевиваемые культуры клеток** — это клетки, спо­собные к размножению вне организма неопределенно длительное время. В лабораториях их поддерживают путем пересевов из одно­го сосуда в другой (при условии замены питательной среды). Получают перевиваемые клетки из первичных культур клеток с повышенной активностью роста путем длительных пересевов в определенном режиме культивирования. Обычно работа по полу­чению новых клеточных линий продолжается несколько месяцев.

**Культивирование вирусов в культуре клеток**

Методика его сво­дится к следующему: подбору культуры клеток; получению вирус­содержащего материала; подготовке для заражения; заражению клеток вируссодержащим материалом; культивированию вируса в клетках; индикации вируса в культуре клеток; сбору культуральной жидкости и идентификации в ней вируса.

Подбор культур клеток. Не всякая клетка чувствитель­на к любому вирусу. Вирус к первичной культуре обычно успешно адаптируется при условии, если культура получена из органов жи­вотного, естественно восприимчивого к данному вирусу. Для культи­вирования вируса используют обычно молодые клетки, т. е. в пер­вый день формирования монослоя, а в некоторых случаях (для парвовирусов свиней) клетки заражают при их посеве, так как ви­рус интенсивно размножается при наличии делящихся клеток (когда они находятся в стадии логарифмического роста).

Заражение клеток. Для этого отбирают пробирки (или матрасы) со сплошным клеточным монослоем, просматривая их под малым увеличением микроскопа. Ростовую питательную сре­ду сливают, клетки два раза промывают раствором Хенкса, чтобы удалить сывороточные антитела и ингибиторы. В каждую пробир­ку вносят по 0,1—0,2 мл вируссодержащего материала и покачива­нием распределяют его равномерно по слою клеток. В таком виде пробирки (матрасы) оставляют от одного до двух часов при 22 или 37 °С для ад­сорбции вируса на поверхности клеток. Затем вируссодержащий материал удаляют из пробирок (матрасов) и наливают поддержи­вающую среду (в пробирку 1—2 мл, в матрасы около 10 % его объема).

Культивирование вируса. Пробирки (матрасы) закры­вают герметически резиновыми пробками и ставят на инкубацию в термостат при 37 °С. Наиболее широко применяют стационар­ное инкубирование.

Для каждой пробы материала обычно используют не менее четырех, десяти пробирок с культурой клеток. Для контроля оставляют четыре, шесть пробирок с незараженной культурой клеток, в которых за­меняют ростовую среду на поддерживающую.

В культурах клеток, зараженных вирусом, питательную среду можно не менять в течение семи дней, а рН среды (6,9—7,4) поддер­живать с помощью 7,5 процентного раствора бикарбоната натрия. При более длительном культивировании инфицированных клеток (аденовирусы и др.) среду меняют.

Все пробирки (матрасы) после заражения клеток ежедневно ис­следуют под малым увеличением микроскопа, сравнивая культуры клеток, зараженные вирусом, с контрольными.

В термостате адсорбировавшиеся на клетках вирусные частицы проникают внутрь их и начинается их репродукция. Новые вирус­ные частицы покидают клетки, в кото­рых они образовались, проникают в непораженные клетки, репродуцируются в них, переходят в новые клетки и поражают их. Так продолжается до тех пор, пока есть живые неповрежденные клет­ки. В результате этого процесса практически все клетки в матрасе или пробирке поражаются вирусом.

Индикация (обнаружение) вируса в культу­ре клеток. Существуют следующие основные методы индика­ции вируса в культуре клеток: по цитопатическому эффекту, или цитопатическому действию; по положительной реак­ции гемадсорбции; по образованию бляшек; по обнаруже­нию внутриклеточных включений; по выявлению вирусов в реак­ции иммунофлуоресценции; по обнаружению интерфе­ренции вирусов; по подавлению метаболизма клеток (цветная проба); электронной микроскопией и др.

**Контрольные вопросы**

1. Виды культур клеток?
2. Культивирование вирусов в культуре клеток?
3. Как происходит заражение культуры клеток?

**Тема: Лабораторные животные и их использование в вирусологии**

**Цель занятия:** изучить правила работы с лабораторными животными.

В свя­зи с тем, что вирусы могут размножаться только в живых клетках, на самых ранних этапах развития вирусологии широко применяли культивирование вирусов в организме лабораторных животных, специально выращиваемых для проведения на них исследований.

Лабораторные животные используются в вирусологии для:

* изучения патогенных и вирулентных свойств возбудителей заболеваний;
* обнаружения патогенных микроорганизмов в патологическом материале;
* первичного выделения их из патологического материала;
* накопления вирусной биомассы;
* поддержания патогенов в лаборатории в активном состоянии;
* выявления инфицирующих доз возбудителя (ИД50);
* получения гипериммунных диагностических и лечебных сывороток;
* в качестве тест-объекта в реакции нейтрализации.

Основной задачей вивариев является разведение лабораторных животных преимущественно отряда грызунов: из семейства мышевидных — белых мышей и крыс, из семейства хомяковых — обыкновенных хомяков, но лучше сирийских или золотистых; из семейства свинковых — морских свинок; из семейства зайцев — кроликов. Лабораторных животных используют для биопробы с целью подтверждения ряда заболеваний вирусной, бактериальной, грибковой, паразитарной природы. Наиболее часто в микробиологических лабораториях используют белых мышей, крыс, морских свинок, кроликов (таблица 1).

Кроликов используют для острых (смертельных) опытов реже чем других лабораторных животных. Чаще их используют как доноров для получения диагностических иммунных сывороток (гемолизин, агглютинирующие сыворотки с целью идентификации вирусов).

Таблица 2 - Использование лабораторных животных для биопробы при некоторых вирусных и бактериальных болезнях

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вид животного | Заболевание | Метод заражения |
| Белые мыши | Бешенство | Интрацеребрально, подкожно |
| Ящур (новорожденные) | Интрацеребрально |
| Болезнь Ауески | Подкожно, интрацеребрально |
| Белые крысы | Грипп свиней | Интраназально |
| Болезнь Ауески | Подкожно, интраназально |
| Морские свинки | Ящур (новорожденные) | Внутрикожно |
| Везикулярный стоматит | Внутрикожно |
| Чума плотоядных | Подкожно, перорально |
| Бешенство | Интрацеребрально |
| Кролики | Бешенство | Интрацеребрально, внутримышечно |
| Ящур (новорожденные) | Подкожно |
| Болезнь Ауески | Внутримышечно, подкожно |
| Контагиозная эктима овец | Скарификация кожи, слизистых оболочек |

При работе с лабораторными животными необходимо учитывать следующие требования:

* животные должны быть чувствительными к данному микроорганизму;
* возраст лабораторных животных имеет большое значение, чаще всего заражают молодых и даже новорожденных животных. Например, для биопробы на бешенство используют мышей — сосунов, на ларинготрахеит птиц — цыплят. При подозрении на болезнь Ауески используют взрослых кроликов, у которых при заражении развиваются характерные признаки этой болезни (нервные явления, расчесы и другие);
* мышам и крысам нужны полумрак и температура воздуха около 20°С, морским свинкам, кроликам и курам нужен дневной свет и температура в пределах 16-23°С;
* зараженных животных содержат изолированно;
* больные инфекционными заболеваниями люди не допускаются для работы по уходу за лабораторными животными;
* при работе в лаборатории с вирусами бешенства, клещевого энцефалита, инфекционного гепатита и некоторыми другими возбудителями инфекции сотрудников прививают вакцинами, а при необходимости — специфическими иммуноглобулинами. Одновременно осуществляют весь комплекс противоэпидемических мероприятий при конкретных заболеваниях.

При заражении лабораторных животных вирусами учитывают его тропизм, то есть излюбленность к определенным клеткам организма. По тропизму вирусы подразделяют на нейротропных (заражают интрацеребрально), пневмотропных (заражают интраназально), дермотропных (заражают накожно, внутрикожно), политропных (заражают обычно подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно).

Признаками размножения вируса в организме лабораторных животных являются характерные для данной болезни симптомы или их гибель. О размножении микроорганизмов в организме свидетельствуют и характерные для данного заболевания патологоанатомические изменения в органах и тканях животных.

При выделении из органов павших лабораторных животных вирусов их идентифицируют с помощью серологических реакций со специфическими сыворотками. Если зараженное животное не погибло, его уничтожают в момент максимального проявления симптомов болезни или при их отсутствии на восьмые, десятые сутки после заражения. От павших или убитых животных берут пораженные органы и ткани и выделяют из них соответствующего возбудителя болезни вирусологическими методами. Только после этого ставят окончательный диагноз.

В заключение следует отметить, что в ряде случаев для подтверждения диагноза на инфекционные заболевания используют как лабораторных моделей, кроме указанных выше животных, и других. Например, при диагностике гриппа, болезни Ньюкасла кур используют здоровых особей этого вида птиц. Для подтверждения диагноза на инфекционную анемию лошадей используют для заражения молодых жеребят, для подтверждения диагноза на рожу свиней нередко используют голубей. В качестве лабораторных моделей в диагностических вирусологических лабораториях довольно часто используют 7-9-суточных эмбрионов кур и других видов птиц (уток, перепелов).

Контрольные вопросы

1. Какие виды лабораторных животных и в каких целях используют в вирусо­логии?
2. Какие наиболее употребляемые методы экспериментального заражения лабо­раторных животных вы знаете?
3. Каковы признаки размножения вируса в организме лабораторного живот­ного?
4. В чем диагностическое значение положительных результатов биопробы?

**Тема: Использование в вирусологии куриных эмбрионов**

**Цель занятия:** освоить методику заражение куриных эмбрионов.

До пятидесятых годов, когда в практику вошли методы культивирования клеток, оказавшие существенное влияние на развитие вирусологии, для культивирования многих вирусов обычно использовались оплодотворенные куриные яйца (развивающиеся куриные эмбрионы). Метод был предложен Гудпасчером и др. (1932 г.) и в последующие годы значительно усовершенствован Бевериджем и Барнетом (1946.г). Почти все открытые к тому времени вирусы способны размножаться в клетках одной из зародышевых оболочек — амниона, аллантоиса, хориона или в желточном мешке.

Используют куриные эмбрионы в вирусологии для:

* обнаружения в патологическом материале активного вируса биопробой;
* поддержания вирусов в лаборатории;
* титрования вирусов;
* накопления вируса для лабораторных исследований и получе­ния вакцин;
* как тест-объект в реакции нейтрализации.

При отборе куриных эмбрионов для заражения вируссодержащим материалом к ним предъявляют следующие требования: эмбрионы должны быть получены из хозяйств, благополучных по инфекционным болезням, скорлупа яиц должна быть непигментированной, чистой (мыть нельзя). Возраст эмбриона должен соответствовать избранному методу заражения.

**Методы экспериментального заражения куриных эмбрионов**

Су­ществует шесть методов заражения эмбрионов. Наиболее часто используют заражение в аллантоисную полость и на хорионаллантоисную оболочку, реже — в амниотическую полость и в жел­точный мешочек и совсем редко — в тело зародыша и в крове­носные сосуды ХАО. Выбор метода определяется тропизмом ви­руса, а также целью заражения. При любом методе заражения вводят 0,1—0,2 мл инфекционного материала.

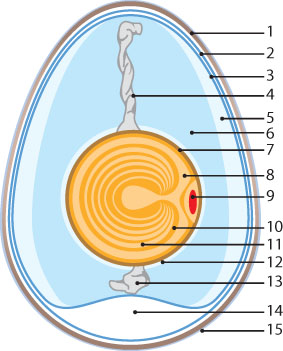


Рисунок 4 - Схематический разрез куриного эмбриона

Заражение в аллантоисную полость. При зараже­нии этим методом хорошо размножаются вирусы гриппа, ньюкаслской болезни, ринопневмонии лошадей, везикулярного стоматита и др.

Заражение на хорионаллантоинсную оболочку. Этот метод заражения куриных эмбрионов чаще используют для культивирования эпителиотропных и пантропных вирусов оспы, инфекционного ларинготрахеита птиц, чумы плотоядных, болезни Ауески, катаральной лихорадки овец и др. Такое заражение может быть выполнено через естественную или искусственную воздушную камеру.

Заражение в желточный мешок. Большей частью им пользуются для размножения вирусов болезни Марека, ринопневмонии лошадей, катаральной лихорадки овец и др. Заражают эмбрионы пяти дневного, а иногда и двух дневного возраста.

Заражение в амниотическую полость. Для этой цели используют эмбрионы 6-10 -дневного возраста. Метод используется­ при культивировании вирусов гриппа, ньюкаслской болезни, ринопневмонии лошадей и др.

Заражение в тело зародыша. Для заражения исполь­зуют эмбрионы семи, двенадцати дневного возраста.

Заражение в кровеносные сосу­ды ХАО. При овоскопировании эмбрионов отмечают крупный кровенос­ный сосуд. По его ходу удаляют участок скор­лупы, наносят одну, две капли спирта, что делает на некоторое время подскорлупную оболочку прозрачной. Под контролем глаза на овоскопе иглу вводят в сосуд, что подтверждается его подвижностью при небольших боковых движениях иглы.

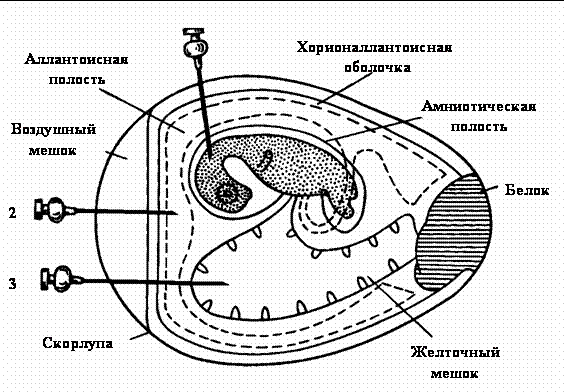


Рисунок 5 - Заражение куриного эмбриона

**Признаки размножения вируса в курином эмбрионе**

Показателем заражения эмбриона вирусом может служить его гибель в харак­терные для данного вируса сроки. Другой признак размножения вируса — патологоанатомические изменения, появляющиеся в различных структурах эмбриона. Так, ХАО может быть отечной, иметь кровоизлияния, узелки, или, как их называют, оспины. Та­кого рода поражения наблюдаются при заражении куриных эмб­рионов вирусами оспы птиц, инфекционного ларинготрахеита птиц, болезни Ауески и некоторыми другими. При этом размер и морфология оспин заметно различаются при размножении разных вирусов. Сам зародыш может отставать в росте и раз­витии от незараженных, т. е. проявлять феномен карликовости. Тело его может быть в разной степени обезвожено или мумифи­цировано, шея характерно перекручена. Внутренние органы также могут иметь признаки размножения вируса. Напри­мер, набухшая желто-зеленого или темно-зеленого цвета пе­чень куриного эмбриона — признак размножения в нем вируса гепатита утят.

**Вскрытие куриного эмбриона и получение вируссодержащего материала**

Перед вскрытием скорлупу эмбриона обрабатывают йодиро­ванным спиртом (иногда еще фламбируют). Вскрытие производят в боксе, пользуясь стерильными инструментами и посудой. Скор­лупу срезают над той воздушной камерой (естественной или ис­кусственной), через которую заражали. При этом яйцо держат под некоторым углом, чтобы скорлупа не упала внутрь. Ножницы не должны касаться и повреждать лежащую под воздушной камерой оболочку, для этого срез должен проходить несколько выше гра­ницы воздушной камеры.

Обнажившуюся ХАО осматривают, приподнимая ее пинцетом с целью установления в ней патологоанатомических изменений. Часть ХАО, на которую был нанесен вируссодержащий матери­ал, имеет обычно наиболее выраженные изменения. Для осмотра и взятия всей ХАО удаляют зародыш, желточ­ный мешок и белок, а хорионаллантоисную оболочку отслаивают от внутренней поверхности скорлупы, извлекают и переносят в стерильную чашку Петри с физиологическим раствором.

Аллантоисную жидкость в количестве до 10 мл отсасывают пипеткой, которой прокалывают подскорлупную оболочку и ХАО над телом зародыша

Амниотической жидкости удается отсосать до 1 мл. Для этого после удаления аллантоис­ной жидкости пипетку вводят в амнион меж­ду головой и телом зародыша под его шеей.

Для получения стенки желточного мешка как вируссодержащего материала желток из­влекают на чашку Петри, стенку его разреза­ют ножницами и отполаскивают от содержи­мого в физиологическом растворе. Тело за­родыша извлекают, удерживая его за шею.

При вскрытии куриных эмбрионов ста­вят бактериологический контроль вируссо­держащего материала посевом на МПБ,МПА,МППБ и среду Сабуро. Вируссодержащий материал хранят при температуре при минус 25оС и ниже.

Контрольные вопросы

1. Для чего используют куриные эмбрионы в вирусологии?
2. Каково строение развивающегося куриного эмбриона?
3. Какие методы можно использовать для заражения куриных эмбрионов вирусами?
4. Что вы знаете о методах индикации вирусов в куриных эмбрионах?
5. Какие способы получения вируссодержащего материала от куриных эмбри­онов вы знаете?

**Тема:** **Реакции гемагглютинации**

**Цель занятия:** изучить сущность реакции гемагглютинации и освоить технику постановки РГА.

В основе реакции гемагглютинации - лежит адсорбция вируса на поверхности эритроцитов и сопровождается склеиванием их.

РГА - является не специфической реакцией, специфичность устанавливается с помощью специфических сывороток в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), где специфическая сыворотка подавляет агглютинацию эритроцитов.

Гемагглютинирующими свойствами обладают многие вирусы. Эти свойства связаны с вирусными гемагглютининами. Гемагглютинины это сложные белковые тела, расположены на поверхности вириона и связаны у простых вирусов с капсидом, а у сложных вирусов с наружной липопротеидной Оболочкой. Гемагглютинины обладают антигенными свойствами. В результате физико-химических процессов между эритроцитами и вирусами происходит вклеивание эритроцитов, и выпадение их в осадок.

При постановке РГА требуются следующие компоненты:

* Исследуемый вируссодержащий материал (носоглоточные смывы,  
  аллантоисная и амниотические жидкости, оболочки куриного эмбриона жидкости и клеточные фракции культуры клеток и т.д.).
* 1 % взвесь эритроцитов.
* 0, 85 %физиологический раствор.

РГА ставится в панелях из плексигласа. Готовят ряд двукратных разведений вируса (начиняя от 20 и до 1:40960) в объеме 0,25 мл. С этой целью физиологический раствор в объеме 0,25 мл разливают во все двенадцать лунок одного ряда панели, вируссодержащий материал (предварительно разведенный 1:10) наливают только в первую лунку и смешивают с физ.раствором. Затем из 1-й лунки отсасывают пипеткой 0,25 мл и переносят его во вторую лунку, смешивают и из второй 0,25 мл переносят в третью и так до последней лунки. Затем в каждую лунку добавляют 1 % взвесь эритроцитов по 0,25 мл встряхивают и оставляют при комнатной температуре на 30 - 40 минут. При постановке реакции обязательно ставят контроль реакции — к физиологическому раствору добавляют взвесь эритроцитов. Схема постановки РГА представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Схема постановки РГА

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| компоненты реакции | номера лунок | | | | | | | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 1:20 | 1:40 | 1:80 | 1:160 | 1:320 | 1:640 | 1:1280 | 1:5120 | 1:5120 |
| Физ. раствор | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |
| Вируссодержащий материал (1:10) | 0,25 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Эритроциты (1% взвесь) | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 | 0,25 |

Положительная РГА проявляется образованием осадка в виде зонтика из эритроцитов на дне лунки и оценивается бплюсах.

++++ - образуется осадок из склеившихся эритроцитов в виде зонтика, надо садочная жидкость прозрачная;

+++ - осадок в виде зонтика меньше и в нем отмечаются просветы;

++ - осадок в виде комочков, не сплошной, надосадочная жидкость слегка опалесцирует;

+ - осадок в виде пуговки с размытыми краями.

‒ - осадок в виде пуговки с четко очерченными краями.

Гемагглютинирующий титр вируса это наименьше количество его, при котором наблюдается агглютинация эритроцитов не меньше, чем на два креста. Это количество будет соответствовать одной гемагглютинирующей единице (1 ГАЕ).

Гемагглютинирующая активность зависит от вида, титра, пассажа вируса, от видовой принадлежности эритроцитов, от возраста, пода донора, от температуры, рН среды и т.д.

В РГА не определяется вид вируса, а выявляется его наличие и его титр.

После РГА вирус можно отделить от эритроцитов путем центрифугирования и получить его чистую суспензию.

**Контрольные вопросы**

1. Вирусные гемагглютинины.
2. Механизм гемагглютинации.
3. Факторы, влияющие на гемагглютинирующую активность вируса.
4. Компоненты РГА.

**Тема:** **Реакция торможения (задержки) гемагглютинации (РТГА, РЗГА)**

**Цель занятия:** Изучить сущность реакции торможения гемагглютинации и освоить технику постановки РТГА.

Одной из простейших серологичес­ких реакций является реакция торможения (задержки) гемагглютинации (РТГА, РТЗА). Она основана на том, что антитела при встрече с гомологичным вирусом (антигеном) нейтрализуют не только его инфекционную, но и гемагглютинирующую актив­ность, так как блокируют рецепторы вирионов, ответственные за гемагглютинацию, образуя с ними комплекс - антиген + антитело.

Принцип РТГА состоит в том, что в пробирке смешивают равные объемы сыворотки крови и суспензии вируса и после экспози­ции определяют, сохранился ли в смеси вирус, путем добавления суспензии эритроцитов. Агглютинация эритроцитов указывает на наличие, а отсутствие гемагглютинации - на отсутствие виру­са в смеси. Исчезновение вируса из смеси вирус + сыворотка расценивается как признак взаимодействия антител сыворотки и вируса.

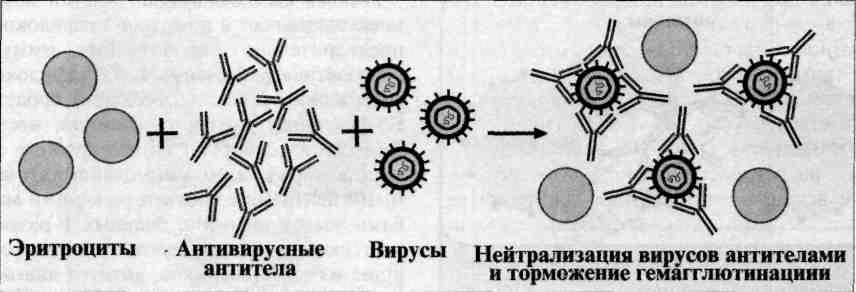


Рисунок 6 – Схема реакции торможения гемагглютинации

**Методика постановки реакции торможения гемагглютинации**

* Подготовка антигена.

Вакцину в ампулах (флаконах) ресупендируют в физиологическом растворе до исходного объема вируса.

* Приготовление взвеси эритроцитов петуха.

Кровь берут из подкрыловой вены во флаконы с 2-З процентным раствором лимонно-кислого натрия на физиологическом растворе (pH 7,2-7,4) в соотношении 1:2, трижды отмывают физиологическим раствором путем центрифугирования при 1500 об/мин 10 мин. Из осадка эритроцитов на физиологическом растворе (рН 7,2-7,4) готовят 0,7-или 1 процентную суспензию. Хранить суспензию можно в условиях холодильника (+4 °С) до появления признаков гемолиза эритроцитов. Кроме нативных в работе могут быть использованы стабилизированные эритроциты петуха.

* Получение сыворотки крови.

Кровь берут из подкрыловой вены или путем скарификации гребня, собирают в стерильные пробирки, предварительно увлажненные стерильным физиологическим раствором. Образовавшийся сгусток отделяют от стенок тонким металлическим стержнем или пастеровской пипеткой и выдерживают при комнатной температуре (18-20 °С) в течение 12-18 ч или при температуре 37 °С (термостат) в течение 60 мин, а затем 8-10 ч при +4 °С (холодильник). Отстоявшуюся сыворотку сливают в чистые пробирки и исследуют в РТГА. Для удаления термолабильных ингибиторов сыворотку крови прогревают в водяной бане при 56 °С в течение 30 мин.

Реакцию торможения гемагглютинации проводят в два этапа:

* определение гемагглютинирующего титра вируса в реакции гемагглютинации (РГА) для расчета рабочей дозы;
* определение титра антител в пробах сыворотки крови.

Для постановки реакции во все лунки полистероловой микро- или макропанели вносят физиологический раствор в объеме 0,05 (О,025) или 0,2 см3. Затем в первую лунку добавляют равный объем испытуемой сыворотки, трижды пипетируют и готовят ряд последовательных двукратных разделений (с 1:2 до 1:4096). После этого, во все лунки вносят рабочее разведение вируса в объеме 0,05 (0,025) или 0,2 см3, осторожно встряхивают и после 25-30 минут контакта сыворотки с вирусом в каждую лунку добавляют двойной объем (по отношению к объему физиологического раствора) суспензии эритроцитов.

Учет реакции. Реакцию учитывают через 25-40 мин. РТГА оценивают положительно при оседании эритроцитов в виде хорошо выраженного "зонтика", отрицательно - в виде "пуговки".

Достоинства РТГА: простота техники, быстрота, не требуется стерильной работы, специфичность, дешевизна. Недостаток: РТГА возможна только с гемагглютинирующими вирусами.

**Контрольные вопросы**

1 Что такое антигены и антитела?

2 Что такое серологические реакции и для чего они используются?

3 В чем принцип и использование РТГА?

4 Какие ингредиенты входят в РТГА и как осуществляется подготовка их к реакции.

**Тема: Реакция связывания комплемента**

**Цель занятия:** освоить технику постановки реакции связывания комплемента

Реакция связывания комплемента заключается в том, что при соответствии друг другу антигены и антитела образуют иммунный комплекс, к которому через фрагмент антител присоединяется комплемент, т. е. происходит связывание комплемента комплексом антиген—антитело. Если же комплекс антиген—антитело не образуется, то комплемент остается свободным. Специфическое взаимодействие Антигена и Aнтитело сопровождается адсорбцией (связыванием) комплемента. Поскольку процесс связывания комплемента не проявляется визуально, Ж. Борде и О. Жангу предложили использовать в качестве индикатора гемолитическую систему (эритроциты барана + гемолитическая сыворотка), которая показывает, фиксирован ли комплемент комплексом Антиген - Антитело. Если антиген и антитело соответствуют друг другу, т. е. образовался иммунный комплекс, то комплемент связывается этим комплексом и гемолиза не происходит. Если антитело не соответствует антигену, то комплекс не образуется и комплемент, оставаясь свободным, соединяется со второй системой и вызывает гемолиз.

Компоненты. Реакция связывания комплемента (РСК) относится к сложным серологическим реакциям. Для проведения реакции необходимы 5 ингредиентов, а именно: Антиген, антитело и комплемент (первая система), эритроциты барана и гемолитическая сыворотка (вторая система).

Антигеном для РСК могут быть вирусы и вирусосодержащие материалы. В качестве комплемента используют свежую или сухую сыворотку морской свинки. Эритроциты барана являются антигеном в гемолитической системе (для гемолизина). Получают эритроциты в лаборатории от барана или овцы. Для этого берут кровь у барана из яремной вены во флакон со стеклянными или фарфоровыми бусами и тщательно дефибринируют встряхиванием, затем для освобождения от сгустков фибрина, фильтруют через марлю в центрифужные пробирки и центрифугируют 10-15 минут при 2-3 тысячах оборотов в минуту. Надосадочную жидкость удаляют, а к осадку эритроцитов добавляют физиологический раствор, перемешивают и вновь центрифугируют. Надосадочную жидкость опять удаляют, вносят новую порцию физиологического раствора и так отмывают эритроциты физиологическим раствором до тех пор, пока надосадочная жидкость будет оставаться бесцветной (3-5 раз). После отмывания надосадочную жидкость отсасывают пипеткой, а из осадка эритроцитов готовят 2% взвесь, которую и используют для постановки РСК и для титровании.

Реакция протекает в две фазы. Первая фаза - взаимодействие антигена и антител при обязательном участии комплемента. Вторая - выявление результатов реакции при помощи индикаторной гемолитической системы (эритроциты барана и гемолитическая сыворотка). Разрушение эритроцитов гемолитической сывороткой происходит только в случае присоединения комплемента к гемолитической системе. Если же комплемент адсорбировался ранее на комплексе антиген-антитело, то гемолиз эритроцитов не наступает.

Результат опыта оценивают, отмечая наличие или отсутствие гемолиза во всех пробирках. Реакцию считают положительной при полной задержке гемолиза, когда жидкость в пробирке бесцветна и эритроциты оседают на дно, отрицательной - при полном лизисе эритроцитов, когда жидкость интенсивно окрашена («лаковая» кровь). Степень задержки гемолиза оценивают в зависимости от интенсивности окраски жидкости и величины осадка эритроцитов на дне (++++, +++, ++, +).

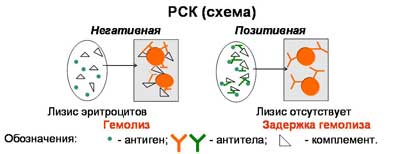
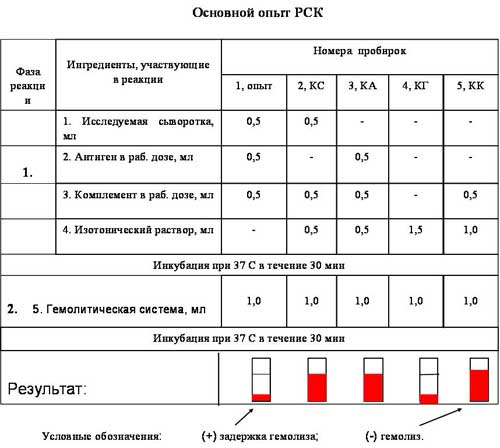


Рисунок 7 - Схема реакции связывания комплемента

Таблица 4 – Постановка и результат РСК



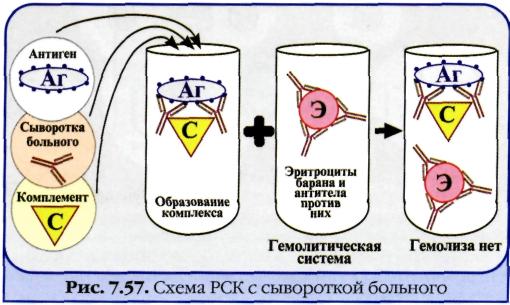


Рисунок 8 - Схема РСК с сывороткой больного животного

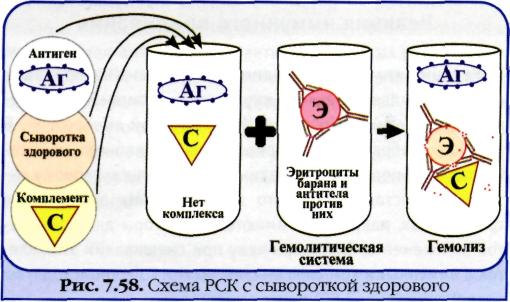


Рисунок 9 - Схема РСК с сывороткой здорового животного

**Контрольные вопросы**

1Принцип РСК?

2Компоненты РСК?

3 Учет реакции?

**Тема: Реакция диффузионной преципитации**

**Цель занятия:** изучитьпринцип реакции диффузной преципитации

Реакция диффузионной преципитации (РДП) в геле (синони­мы: реакция гель - преципитации, реакция двойной диффузии в геле) основана на способности к диффузии в гелях антител и ра­створимых антигенов и отсутствии такой способности у комплек­са антиген + антитело. Комплекс антиген + антитело образуется при контакте диффундирующих навстречу друг другу гомологич­ных антигена и антитела. Он осаждается на месте образования в толще геля в виде полосы преципитации.

Диффузией называется проникновение молекул одного веще­ства между молекулами другого, обусловленное тепловыми движе­ниями молекул. Диффузия возможна в газах, жидкостях, твердых телах и гелях. Гелями называются такие дисперсные системы, в которых жидкая фаза распределена равномерно среди твердой. Обычно гели образуются высокомолекулярными соединениями, которые дают коллоидные растворы (золи), а при охлаждении превращаются в гели, имеющие некоторые свойства твердых тел. К таким соединениям относятся крахмал, желатин, агар-агар и др. В лабораторной практике очень часто используют агаровый гель.

Антитела сыворотки представляют собой молекулы иммуно­глобулинов, которые, несмотря на довольно крупные размеры, способны диффундировать в агаровом геле. Антигены вирусов — это вирусные белки. Они могут находиться в составе вирионов, представляя так называемые корпускулярные антигены, крупные размеры которых не позволяют им диффундировать в агаровом геле. Но белки вирусов могут быть и в виде свободных молекул, образующихся в результате деструкции вирионов и (или) разруше­ния клеток, в которых они образовались. Это так называемые ра­створимые антигены. Они способны к диффузии в агаровом геле.

Методика постановки РДП в геле состоит в том, что в слое ага­рового геля делают несколько углублений (лунок) и в них наливают антигены и сыворотки так, чтобы антиген и сыворотка были в со­седних лунках. Из лунок антигены и сыворотки начинают диффун­дировать в слой геля. Диффузия направлена во все стороны от каж­дой лунки. В пространстве между лунками, содержащими антиген и сыворотку, последние диффундируют навстречу друг другу (двой­ная диффузия в геле). Если они окажутся гомологичными, то обра­зуется комплекс антиген + антитело, который к диффузии не спо­собен вследствие более крупных размеров. Он оседает (преципитирует) на месте обра­зования в виде беловатой полосы преципи­тации, которая хорошо заметна на фоне прозрачного геля. Если же диф­фундирующие друг другу навстречу антиген и сыворотка будут негомологичны, полосы преципитации не образуется. Этот принцип позволяет решать ряд практических задач, из которых важнейшие следующие: обнаружение в сыворотке крови антител, гомологичных данному антигену (например, вирусу), производится при по­мощи схемы РДП, показанной на рисун­ке 10. Если в сыворотке содержатся анти­тела к антигену, между лунками и образуется полоса преципитации.

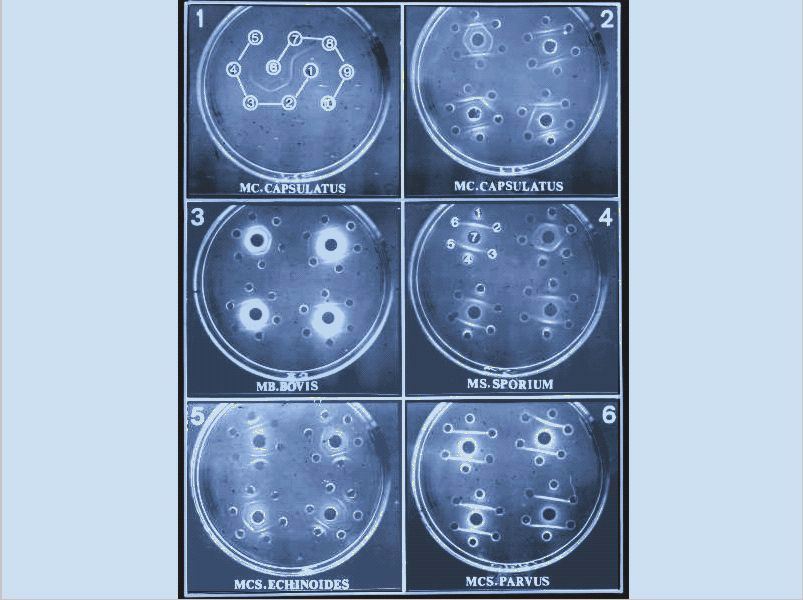


Рисунок 10 – Учет реакции иммунодиффузии

В ветеринарной практике РДП часто используют для диагностики лейкоза крупного рогатого скота (под названием реакции иммунодиффузии — РИД) и ин­фекционной анемии лошадей. В обоих случаях задача сводится к обнаружению в сыворотках крови антител к соответству­ющим вирусам.

**Контрольные вопросы**

1. В чем принцип РДП?
2. Какие задачи позволяет решать РДП?
3. В чем достоинства и недостатки РДП?

**Тема: Реакция иммунофлюоресценции**

**Цель занятия:** изучить и освоить реакцию иммунофлюоресценции.

Иммунофлюоресцентный метод (РИФ, реакция иммунофлюоресценции, реакция Кунса) - метод выявления специфических Антигена с помощью Антителом, конъюгированных с флюорохромом. Обладает высокой чувствительностью и специфичностью.

Применяется для экспресс-диагностики инфекционных заболеваний (идентификация возбудителя в исследуемом материале), а также для определения Ат и поверхностных рецепторов и маркеров лейкоцитов (иммунофенотипирование) и др. клеток.

Обнаружение вирусных антигенов в инфекционных материалах, тканях животных и культурах клеток при помощи флюоресцирующих антител (сывороток) получило широкое применение в диагностической практике. Приготовление флюоресцирующих сывороток основано на способности некоторых флюорохромов (например, изотиоцианатафлюоресцеина) вступать в химическую связь с сывороточными белками, не нарушая их иммунологической специфичности.

Различают три разновидности метода: прямой, непрямой, с комплементом.

Прямой метод РИФ основан на том, что антигены тканей или микробы, обработанные иммунными сыворотками с антителами, меченными флюорохромами, способны светиться в УФ-лучах люминесцентного микроскопа. Бактерии в мазке, обработанные такой люминесцирующей сывороткой, светятся по периферии клетки в виде каймы зеленого цвета.



Рисунок 11 - Люминесцентный микроскоп

Непрямой метод РИФ заключается в выявлении комплекса антиген - антитело с помощью антиглобулиновой (против антитела) сыворотки, меченной флюорохромом. Для этого мазки из взвеси микробов обрабатывают антителами антимикробной кроличьей диагностической сыворотки. Затем антитела, не связавшиеся антигенами микробов, отмывают, а оставшиеся на микробах антитела выявляют, обрабатывая мазок антиглобулиновой (антикроличьей) сывороткой, меченной флюорохромами. В результате образуется комплекс микроб + антимикробные кроличьи антитела + антикроличьи антитела, меченные флюорохромом. Этот комплекс наблюдают в люминесцентном микроскопе, как и при прямом методе.

Механизм. На предметном стекле готовят мазок из исследуемого материала, фиксируют на пламени и обрабатывают иммунной кроличьей сывороткой, содержащей антитела против антигенов возбудителя. Для образования комплекса антиген — антитело препарат помещают во влажную камеру и инкубируют при 37 °С в течение 15 мин, после чего тщательно промывают изотоническим раствором хлорида натрия для удаления не связавшихся с антигеном антител. Затем на препарат наносят флюоресцирующую антиглобулиновую сыворотку против глобулинов кролика, выдерживают в течение 15 мин при 37 °С, а затем препарат тщательно промывают изотоническим раствором хлорида натрия. В результате связывания флюоресцирующей антиглобулиновой сыворотки с фиксированными на антигене специфическими анти телами образуются светящиеся комплексы антиген — антитело, которые обнаруживаются при люминесцентной микроскопии.

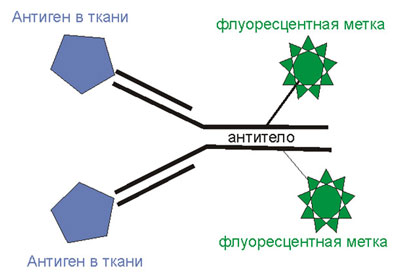


Рисунок 12 - Схема Реакция иммунофлюоресценции

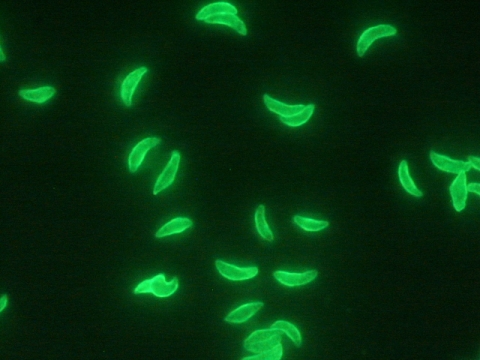


Рисунок 13 - Положительная реакция под люминесцентным микроскопе

**Контрольные вопросы**

1 Принцип реакции иммунофлюоресценции?

2 Какой микроскоп используют при реакции иммунофлюоресценции?  
3 Постановка реакции?

4 как происходит учет реакции?

**Тема: Иммуноферментный анализ**

**Цель занятия:** изучить принцип ИФА и освоить технику постановки

В последнее время в диагностике вирусных болезней человека и животных стали применять методы, основанные на использова­нии в качестве метки антигенов и антител ферментов. Эта группа методов носит название иммуноферментного анализа (ИФА).

Накопилось много примеров, свидетельствующих о широких возможностях использования ИФА в различных областях медици­ны, сельского хозяйства, промышленности и контроля окружаю­щей среды. Однако основные направления применения ИФА: ранняя диагностика инфекционных, онкологических и других бо­лезней, проведение массовых эпидемиологических и эпизоотологических исследований, контроль качества продукции и соблюдение санитарных норм на предприятиях медицинской, микробиологической и пищевой промышленности.

ИФА используется для выявления и идентификации вируса и антител к нему (у животных - реконвалесцентов) или исследования уровня поствакцинальных антител.

Для идентификации вирусспецифического антигена иммуно-ферментный тест применяют в двух вариантах: гистохимическом и твердофазном.

Гистохимический вариант ИФА, или иммунопероксидазная реак­ция. Иммунопероксидазная реакция аналогична методу иммуно-флуоресценции, но отличается тем, что для постановки реакции используют антитела, меченные не флуорохромом, а ферментом, и учет результатов реакции проводят не под люминесцентным микроскопом, а под обычным световым. В этом варианте ИФА используют антитела, меченные пероксидазой, так как ее молеку­лярная масса (40 ООО) меньше, чем молекулярная масса щелочной фосфатазы (100 000) и галактозидазы (150 000), что способствует лучшему проникновению пероксидазногоконъюгата сквозь кле­точную мембрану. Кроме того, пероксидазаустойчива при гисто­логической обработке.

Материалом для выявления вирусспецифических антигенов или вирусов с помощью иммунопероксидазной реакции могут служить: мазки-отпечатки различных органов, парафиновые сре­зы, культура клеток, мазки крови. Использование для иммунопе­роксидазной реакции носоглоточных смывов несколько ограниче­но в связи с наличием в воспаленных клетках большого количе­ства эндогенной пероксидазы, обусловливающей высокое фоно­вое окрашивание. Для инактивации эндогенной пероксидазы применяют азид натрия в сочетании с перекисью водорода и фенилгидразин. Обработку указанными реактивами проводят перед нанесением иммуноферментногоконъюгата на препарат.

Иммунопероксидазную реакцию ставят в прямом и непрямом вариантах.

**Прямой пероксидазный тест**. При выявлении антигена с помо­щью прямого иммунопероксидазного метода используют проти­вовирусные конъюгаты, т. е. конъюгаты, полученные из антител, выделенные из специфической сыворотки, и фермент. Конъюгаты готовят в специализированных учреждениях биологической про­мышленности. Для выявления вирусспецифического антигена прямым иммунопероксидазным методом проводят этапы работы, представленные на рисунке 63. Для этого культуру клеток, выра­щенную на покровных стеклах и инфицированную вирусом, или мазки-отпечатки в течение 10 мин фиксируют охлажденным до минус 10 - минус 20 °С ацетоном. Препараты высушивают на воз­духе и наносят на них 0,2—0,3 мл иммунопероксидазного конъю­гата в рабочем разведении, которое указано на ампуле. Инкубиру­ют 1—2 ч при 37 ° С во влажной камере. (Срок инкубации при не­обходимости может быть увеличен до 6 ч.) Препарат в течение 15 мин тщательно промывают физиологическим раствором, спо­ласкивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Наносят на него несколько капель раствора субстрата — диаминобензидинтетрахлорида (3,3-ДАБ—4НС1), инкубируют 5—10 мин и промывают 10—15 мин в физиологическом растворе, споласкива­ют дистиллированной водой.

В положительных случаях, т. е. при наличии антигена в иссле­дуемом препарате, после нанесения иммунопероксидазного конъ­югата образуется комплекс антиген — антитело, меченный фер­ментом. После нанесения на препарат раствора субстрата после­дний под действием фермента разлагается, образуя цветной про­дукт ферментативной реакции, хорошо видный в световом микроскопе.

Результаты учитывают с помощью светового микроскопа. Диаминобензидинтетрахлорид под действием пероксидазы разлагается, образуя продукт реакции голубого цвета, который быстро переходит в коричневый цвет. В препарате видны или диффузное желто-коричневое окрашивание, или гранулы коричнево-черно­го цвета. В контрольных препаратах окрашивания не обнаруживают.

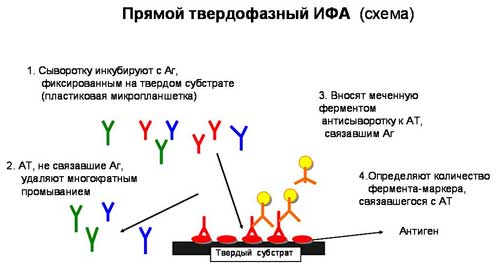


Рисунок 14 – Схема прямого твердофазного ИФА

**Непрямой иммунопероксидазный тест** применяют для выявле­ния вирусспецифического антигена. При этом исполь­зуют антивидовые иммунопероксидазные конъюгаты, приготов­ленные в специализированных учреждениях. Преимуществом непрямого метода является универсальность меченых антивидовых глобулинов, а также большая чувствительность его по сравне­нию с прямым.

Для выявления вирусспецифического антигена культуру кле­ток, выращенную на покровных стеклах и инфицированную виру­сом, или мазки-отпечатки фиксируют в течение 10 мин охлажден­ным (минус 10 — минус 20 °С) ацетоном. Препараты высушивают на воздухе и наносят на них 0,2—0,3 мл специфической к искомо­му антигену сыворотки. Инкубируют при 37 °С 1—2 ч во влажной камере. Промывают физиологическим раствором 5 минут и высушивают на воздухе. Наносят 0,2—0,3 мл антивидового иммунопероксидазного конъюгата в рабочем разведении, указанном на ам­пуле, и инкубируют при 37 °С 1—6 ч. Далее следуют процедуры, которые были описаны для прямого метода.

При наличии в исследуемом материале вирусспецифического антигена после внесения специфической сыворотки образуется комплекс антиген — антитело, для выявления которого используют антивидовые или вторичные антитела, меченные ферментом; обра­зуется более сложный, чем в первом случае, комплекс: антиген — антитело — вторичное антитело — фермент. Полученный комп­лекс выявляют добавлением субстрата, который под действием фермента разлагается, образуя цветной продукт ферментативной реакции. Учет результатов проводят, как и в первом случае, в све­товом микроскопе.

Иммунопероксидазная реакция в прямом и непрямом вариан­тах используется для выявления вирусов бешенства, ящура, герпесвирусов, энтеровирусов и др.

**Методы твердофазного иммуноферментного анализа.** Методы твердофазного ИФА основаны на применении антител (антиге­нов), фиксированных на нерастворимых носителях. В качестве носителей используют стеклянные или нейлоновые шарики, по­листироловые или керамические пробирки и микропанели. В по­следнее время широкое использование в ИФА получили полисти­роловые микропанели. Применение их и автоматизация процесса постановки и учета реакции позволяют за короткое время иссле­довать большое число образцов сывороток на наличие антител и другого материала на наличие вирусспецифического антигена.

Твердофазный ИФА был предложен в 1971 г. Е. Engvall с соавт. и A. Schurrs с соавт. Он успешно используется как для обнаруже­ния вирусспецифического антигена, так и специфических антител у животных-реконвалесцентов или иммунизированных противо­вирусными вакцинами.

В твердофазном ИФА используют как пероксидазные, так и щелочно-фосфатазные конъюгаты.

Для исследования большого числа образцов с помощью твердо­фазного ИФА необходимо иметь: полистироловые микропанели с плоским дном, автоматические пипетки с переменным или посто­янным объемом от 50 до 200 мкл, промывочное устройство — ав­томатическое или полуавтоматическое и считывающее устрой­ство.

Необходимо отметить, что анализ может быть выполнен на микропанелях и без перечисленных выше приборов. В этом случае учет результатов реакции может быть проведен визуально, без ис­пользования специальной регистрирующей аппаратуры, но в этом случае резко снижается производительность метода.

Для выявления вирусспецифического антигена с помощью данного метода в различных биологических жидкостях наиболее часто используют метод двойных антител, или «сандвич». Для этого лунки полистироловых микропанелей сенсибилизируют гамма-глобулином, выделенным из специфической к исследуемо­му антигену сыворотки. Концентрацию гамма-глобулина подбирают путем титрования, используя заведомо позитивный и негативный антигены. Опти­мальной концентрацией считается такая, при которой уровень оптической плотности позитивных образцов в 5—10 раз превышает уровень оптической плотности негативных образцов. Чаще всего используют концент­рацию 10—30 мкг/мл.

Твердофазный иммуноферментный тест для обнаружения вирусспецифического ан­тигена ставят по следующей схеме:

* в лунки микропанелей вносят по 0,1 мл гамма-глобу­лина в нужной концентрации в натрий-кар­бонатном буфере с рН 9,6;
* микропанели инкубируют в течение часа при 37 °С и далее оставляют на ночь при 4 ° С;
* на утро из лу­нок удаляют раствор глобулинов, микропане­ли промывают 3 раза по 5 мин калийфосфатным буфером с рН 7,4, содержащим 0,05 % твина-20;
* в лунки вносят по 0,1 мл раство­ра, содержащего исследуемый антиген, и инкубируют при 37 °С 2 ч. В контрольные лунки вносят заведомо известные положи­тельный и отрицательный антигены;
* микропанели промывают;
* далее в лунки вносят по 0,1 мл им­муноферментного конъюгата и панели инкубируют 1 —2 ч при 37 °С;
* микропанели промывают, как в п. 3 и 5;
* далее в лунки вносят по 0,1 мл раствора субстрата: ортофенилендиамина (ОФД) или 5-аминосалициловой кислоты (для пероксидазы) и р-нитро-фенилфосфата (для щелочной фосфатазы), инкубируют в темноте при комнатной температуре 5—30 мин;
* реакцию останавливают добавлением 0,05 мл 2 н. серной кислоты (H2SO4) (для пероксида­зы) и 3 М NaOH (для щелочной фосфатазы);
* реакцию учиты­вают визуально по разности в окраске опытных и контрольных об­разцов или колориметрически при длине волны 490 нм (для пе­роксидазы) или 405 нм (для щелочной фосфатазы).

При использовании субстрата ОФД положительные образцы имеют оранжево-коричневую окраску, а при применении 5-ами­носалициловой кислоты опытные образцы окрашиваются в ин­тенсивно-коричневый цвет, в то время как отрицательный контроль либо совсем не окрашен, либо окрашен в слабо-желтый цвет. При использовании щелочной фосфатазы опытные образцы ок­рашены в желтый цвет.

За положительный результат принимают превышение оптической плотности опытных образцов над контрольными в 2—3 раза.

Определение антител непрямым методом твердофазного ИФА см. рисунок 15.

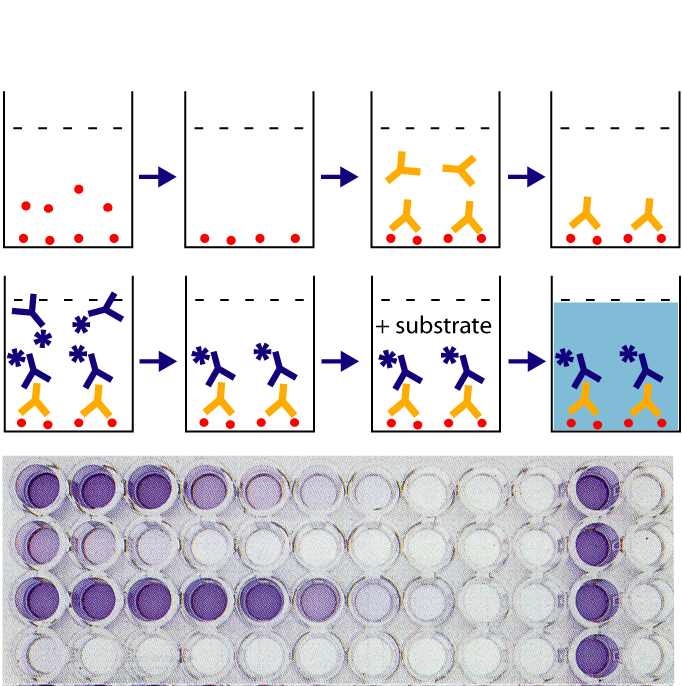


Рисунок 15 - Схема определения антител непрямым методом

твердофазного ИФА

Автоматизация иммуноферментного теста. Результаты, получаемые с помощью иммуно­ферментного теста, оценивают с помощью спектрофотометрии, регистрируя процессы изменения концентрации субстрата или про­дуктов ферментативной реакции. Измеряе­мым параметром в этих случаях была или начальная скорость ферментативной реакции, или конечная оптическая плотность продук­та, образовавшегося за определенный проме­жуток времени.

Для учета результатов реакции можно использовать анализаторы скоростей реак­ции и автоматические спектрофотометры, которые позволяют измерять ферментатив­ную активность в 120 и 2000 образцах в течение часа. Процесс измерения управляется компьютером, пересчитывающим вели­чину ферментативной активности в концентрацию определяе­мого соединения.

**Контрольные вопросы**

1. В чем принцип ИФА и его использование в диагностике вирусных болезней?
2. Чем отличается гистохимический вариант ИФА от твердофазного?
3. Каковы достоинства и недостатки ИФА?

**Тема: Полимеразная цепная реакция**

**Цель занятия:** изучить принцип ПЦР и освоить технику постановки реакции.

Полимеразная цепная реакция позволяет обнаружить вирус в исследуемом материале (воде, продуктах, материале от больного) по наличию в нем ДНК микроба без выделения последнего в чистую культуру.

Сутью метода является амплификация, т. е. увеличение числа копий строго определенных фрагментов молекулы ДНК invitro. Амплифицируемый участок именуют амплификоном. Его границы определяются двумя (как правило) олигонуклеотиднымипраймерами\* (затравками), комп­лементарными определенным последовательностям в составе про­тивонаправленных нитей двухцепочной ДНК.

ПЦР основана на амплификации ДНК с помощью ДНК-поли­меразы, осуществляющей синтез взаимно комплементарных це­пей ДНК, начиная с двух праймеров. Праймеры комплементарны противоположным цепям ДНК в участках, ограничивающих вы­бранную область ДНК, и ориентированы З'-концами навстречу друг другу и в сторону той последовательности, которую необхо­димо амплифицировать. При синтезе ДНК праймеры физически встраиваются в цепь новосинтезирующихся молекул ДНК. Из рисунка 16 видно, что каждая из вновь синтезированных с помощью одного из праймеров молекул ДНК может служить матрицей для синтеза комплементарной ДНК с помощью другого праймера. Для этого надо лишь денатурировать (цепи ДНК расхо­дятся) образовавшиеся в результате первой стадии реакции двухцепочной молекулы ДНК, дать возмож­ность праймерам комплементарно присоединиться к ДНК и осу­ществить с помощью ДНК-полимеразы элонгацию (синтез ДНК-достройки праймера). Эти три стадии:

1) денатурация ДНК (плавление);

2) комплементарное связывание праймера с ДНК-матрицей (отжиг);

3) синтез ДНК с помощью ДНК-полимеразы (достройка праймера) и составляют суть каждого цикла ПЦР. Да­лее этот стандартный цикл ПЦР— денатурация, отжиг, элонгация - воспроизводится многократно, и в идеале количество ам-плификонов растет в геометрической прогрессии. Продолжитель­ность реакции определяется числом циклов, необходимых для синтеза ДНК амплификонов в количестве, достаточном для даль­нейшего исследования или индикации. Индикация может быть произведена известными способами: электрофорезом с окраши­ванием бромистым этидием, гибридизацией с изотопно или не­изотопно меченными генными зондами, непосредственным ко­лориметрическим, флуорометрическим, радиоизотопным опре­делением при использовании в системе ПЦР меченых предше­ственников синтеза нуклеиновых кислот.



Рисунок 16 – Принцип ПЦР

Основными компонентами ПЦР являются:

* фермент Taq-ДНК-полимераза;
* пара олигонуклеотидныхпраймеров;
* четыре типа дезоксинуклеозидтрифосфатов;
* копируемая ДНК;
* ионы Mg+2.

Вспомогательными компонентами являются буферный раствор и минеральное масло.

Постановка полимеразной цепной реакции включает несколько этапов.

**Получение ДНК-образца** (лизатов, исследуемого материала). Для этого исследуемый материал суспендируют в буфере или ди­стиллированной воде, добавляют 1 М раствор NaOH и выдержи­вают при 37 °С 6...7 минут. Смесь нейтрализуют добавлением трис (оксиметил) аминометана (рН 8,0). Лизат центрифугируют при 5000 мин -1 в течение десяти минут для осаждения крупных частиц. Надосадочную жидкость, содержащую ДНК и РНК, используют для постановки ПЦР.

**Проведение полимеразной цепной реакции** — амплификация заданного фрагмента ДНК (гена). Для этого используют буферный раствор (буфер для ПЦР (10х) — 500 mM KC1, 100 тМ трис — НС1, 14, 15 mM MgCl, 0,1 % желатина или бычьего сывороточного альбу­мина, рН8), фермент ДНК-полимеразу, праймер-олигонуклеотид — затравку, трифосфаты — предшественники син­теза ДНК, исследуемый обра­зец ДНК или биологическую жидкость (кровь, моча, слю­на, мокрота и др.).

В пробирку емкостью 1,5 мл (эппендорф) собирают следующую смесь: 125 мкл бидистиллированной стериль­ной воды, 15 мкл буфера для ПЦР, 5 мкл раствора трифосфатов, 3 мкл раствора праймера, 3 мкл раствора ДНК-полимеразы термостойкой.

Смесь разливают в пять пробирок (вместимостью 0,5 мл) по 30 мкл. В каждую из них вносят по 0,5...1,0 мкл надосадочной жидкости из лизата, перемешивают; сверху наслаивают по 25 мкл стерильного вазелинового масла. Включают амплификатор и уста­навливают режим работы. Например, плавление: температура 92 °С в течение 60 секунд; отжиг ДНК: 55 °С в течение 60 секунд; синтез ДНК: 70 °С в течение 75 секунд.

****

Рисунок 17 – Амплификатор

В стадии «плавления» пробирки устанавливают в амплификатор; проводят тридцать циклов амплификации, что занимает 3 ч, и за этот срок из одной молекулы ДНК образуется до 1 млн молекул-копий. Реак­цию останавливают на стадии «синтеза» и выдерживают 3...5 минут для окончательного досинтезирования фрагментов ДНК.

**Индикация амплификата**. С этой целью пробу подвергают электрофорезу в агарозном геле для разделения молекул ДНК. На пластинку наносят пробы, подлежащие анализу, и соответствую­щие свидетели. После разделения ДНК на электрофореограмме резко выделяется амплифицированная молекула. Для электрофо­реза готовят 1,7 процентный раствор агарозы с этидиум бромидом (краска); раствор заливают в аппарат для электрофореза, устанавливают шаблон для образования лунок. Через 25...30 минут агароза полимеризуется, шаблон осторожно вынимают, при этом в агарозе обра­зуются лунки. В аппарат заливают буфер для электрофореза и ус­танавливают электроды. Из полученного при полимеразной цепной реакции амплифи­ката отбирают 10 мкл смеси и смешивают с 5 мкл красителя — бромфенолового синего. Смесь вносят в лунки и проводят элект­рофорез в режиме 5 В/см. Через 40...45 мин аппарат отключают, агарозную пластинку вынимают и 10 мин окрашивают в растворе этидиум бромида.

Затем агарозу помещают на трасиллюминатор и полученные картины полос фотографируют. Полосы, выявляемые при ультрафиолетовом освещении, — это фраг­менты ДНК, синтезированные в про­цессе амплификации со специфичес­ким для каждого возбудителя инфек­ций праймером.

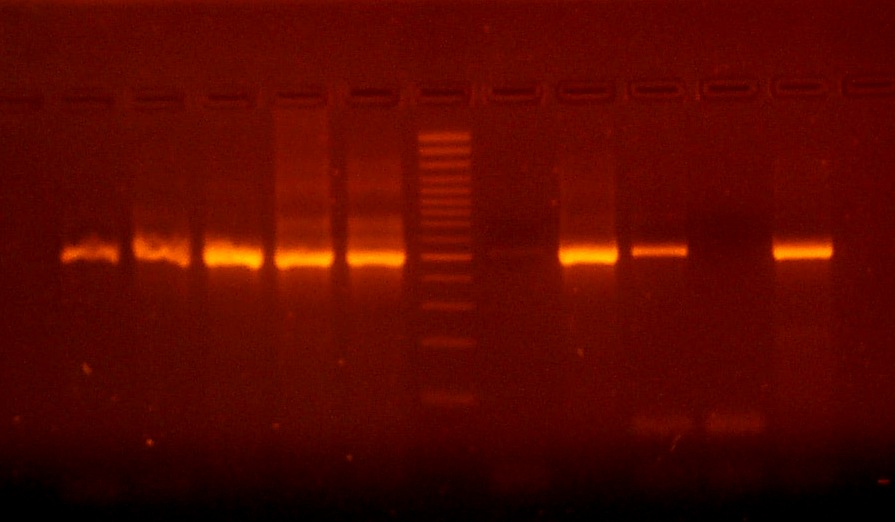


Рисунок 18 – Электрофореограмма.

Достоинства ПЦР:

* быстрота анализа. Все процедуры ПЦР занимают 1—2 ра­бочих дня при параллельной обработке 10—12 образцов;
* надежность анализа. Под этим подразумевается защищен­ность от ложноположительных и ложноотрипательных резуль­татов. При аккуратной работе с образцами и реактивами, при ис­пользовании всех контролей, надежного оборудования и жестко стандартизированных реактивов методы диагностик вирусных инфекций, основанные на ПЦР, являются высоконадежными;
* чувствительность анализа. Этот параметр характеризуется наименьшей концентрацией клеток или вирусных частиц в пробе, дающей положительный результат анализа, и определяется сочетанием следующих трех факторов: эффективного выделения нук­леиновой кислоты возбудителя, чувствительности собственно ПЦР и чувствительности выбранного метода индикации. ПЦР позволяет достичь предельно возможной чувствительности: от нескольких копий до одного возбудителя в пробе;
* специфичность анализа. Под этим подразумевается выяв­ление возбудителей конкретного вида (группы видов, рода) на фоне других вирусов и клеток организма-хозяина.
* для ПЦР-анализа пригоден любой материал, в том числе и гистологические препараты;
* количество исследуемого материала, как правило, составляет несколько десятков микролитров;
* метод позволяет определить число копий возбудителя в про­бе и тем самым контролировать виремию или бактериемию в про­цессе лечения;
* исследуемый материал может быть дезинфицирован хими­ческой или термической обработкой в момент его забора, и, следовательно, исключается возможность инфицирования персонала в процессе проведения ПЦР;
* простота исполнения и возможность полной автоматизации.

**Контрольные вопросы**

1 В чем состоит принцип ПЦР?

2 Как используется ПЦР в диагностике вирусных инфекций и ее возможности в области фундаментальных исследований?

3 Каковы достоинства и недостатки ПЦР?

**Частная микробиология**

**Тема: Лабораторная диагностика оспы животных**

**Цель занятия:** Изучить семейства поксвирусов и болезни, которые они вызывают.

Вирусы оспы поражают человека, домашних и диких животных и птиц. Семейство поксвирусов имеет два подсемейства: Chordopoxvirinae (вирусы оспы позвоночных) и Entomopoxvirinae (вирусы оспы насекомых). Подсемейство Chordopoxvirinae объединяет 6 родов и насчитывает около 25 видов вирусов:

* Orthopoxvims - этот род включает вирус оспы человека, обезьян, лошадей, верблюдов, осповакцины. коров, буйволов, мышей;
* Purapoxvirus - вирус контагиозной эктимы (контагиозного пуетуллезного  
  дерматита) овец и коз.вирус гшравакцины (узелков доильщиц) и пр.
* Avipoxvints - вирусы оспы кур, оспы голубей, оспы перепелок, оспы скворцов.
* Capripoxvirus - вирусы оспы овец, оспы коз, модулярного дерматита крупного рогатого скота.
* Leporipoxvirus - вирус миксомы кроликов, фибромы белок, зайцев и др.
* Suipaxvirus - вирус оспы свиней,

Вирусы семейства поксвирусов - очень крупные, размер достигает 250-400 нм.и обнаруживаются под световым микроскопом в виде коккоподобных телец.

Геном поксвирусов представлен двунитчатой ДНК. Вирионы имеют форму кирпичика, сложную симметрию. По химическому составу вирусы оспы сложные, наружная оболочка имеет липопротеидную природу. Состоит из трех слоев, на поверхности вириона имеются ворсинки. Вирусы содержат до 17 структурных белков, имеются еще неструктурные белки (ферменты). По антигенной структуре вирусы оспы сложные. Вирусы, входящие в один род имеют одинаковую антигенную структуру и иммунологически близки.

Вирусы репродуцируются в цитоплазме клеток. Репродукция вируса оспы в клетке начинается с синтеза ДНК-полимеразы. Затем в результате репликации, транскрипции, трансляции накапливается известное количество компонентов вируса, сборка вирионов вируса оспы осуществляется примерно через три часа после начала инфекции и начинают формироваться тельца - включения.

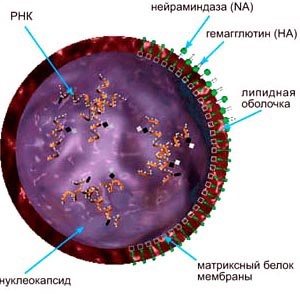


Рисунок 19 - Строение вириона вируса оспы

Вирус оспы животных и птиц чувствителен к высокой температуре (при t-55 за 30 минут.), чувствителен к свету. В сухих оспенных эпителиомах может сохраняться долго, в шерсти переболевших овец и па пастбище - 2 месяца, в овчарнях - 6 месяцев. На вирус губительно действует 0.5-1 процентный раствор формалина. 2,5 процентный раствор -соляной и серной кислоты, 2 процентный раствор щелочи. Для дезинфекции помещений и предметов ухода за животными используется раствор едкой щелочи.

Животные и птица заражаются при контакте с больными животными и птицей, которые рассеивают подсохшие оспенные корки во внешнюю среду, Животные и птицы заражаются алиментарным путем через слизистую оболочку рта, пищевода, преджелудочков. через поврежденную кожу патогенез. Вирус попав в организм через 3-4 дня появляется в крови и в паренхиматозных органах, а затем находят в эпителии кожи, слизистых оболочках. При оспе возникают следующие патологические стадии:

* стадия высыпания - появляются красные пятна - розеолы, длится 1-2  
  дня;
* стадия превращения пятен в узелки - папулы, которые окружены  
  красным узелком, длится эта стадия 1-3 дня;
* везикулярная стадия превращение папул в пузырьки, наполненные  
  серозной жидкостью;
* стадия нагноения - превращение везикул в пустулы, содержимое  
  везикул становится гнойным, длится 3 дня.
* крустозная стадия - образование бурого струпа - корочки на месте  
  высохших пустул, струп отпадает через 5 дней.

У птиц оспа протекает в двух формах: оспенная и дифтеритическая. При дифтеритической форме отмечается конъюнктивит, слезотечение, гиперемия, отечность век. Поражаются слизистые оболочки рта и глотки. При оспенной форме поражаются кожа гребня, век, углов рта, бородки, затылки, живот. Появляются желтоватые пятна, которые затем покрываются красно-бурым кровянистым струпом.

Культивирование. Вирусы оспы птиц и млекопитающих можно культивировать на хорионалантоисной оболочке (ХАО) куриных эмбрионов, в первичной культуре клеток почки и семенников овец, фибробластах куриных эмбрионов и в организме естественно-восприимчивых животных.

**Лабораторные методы диагностики**. Основаны на индикации вируса из патологического материала на куриных эмбрионах, культуре клеток, идентификации вируса путем вирусоскопии - обнаружении оспенных частиц в препаратах, в РДП, РИФ и путем биопробы. Для исследования в лабораторию посылают трупы павших птиц, больную птицу, от больных животных берут оспенные поражения - содержимое везикул или пустул, папулы соскабливают скальпелем, корки собирают пинцетом.

Вирусоскопия - обнаружение вирусных оспенных частиц методом световой микроскопии. Готовят мазки-отпечатки из пораженных участков. Под микроскопом видны элементарные тельца вируса оспы.

**Реакция диффузной преципитации (РДП)** - метод основан на образовании зон преципитации в агаровом геле при взаимодействии оспенного антигена со специфической сывороткой.

**Метод флуоресцирующих антител (МФА)**. Антивирусный гамма-глобулин (при прямом методе) конъюгирутот флуоресцирующими красками (изотиоционатомфлуросцеина). На предметном стекле готовят мазок из оспенных поражений, наносят флуоресцирующую сыворотку. Под люминесцентным микроскопом в цитоплазме пораженных клеток видны светящиеся очаги.

**Биопроба** - использование естественно - восприимчивых животных. Вирусом оспы птиц заражаются птицы в бородку, сережки; вирусом оспы овец заражаются здоровые овцы в область подхвостовой складки, вирусом контагиозной зктимы овец заражаются здоровые ягнята путем скарификации в кожу, слизистую десен, губ. Наблюдение ведут в течение десяти дней. В положительных случаях развивается оспенный процесс - розеолы, папулы, везикулы, пустулы. Диагноз подтверждается вирусоскопией препаратов из срезанного эпителия розеолы на обнаружение элементарных телец.

**Контрольные вопросы**

1. Какие роды и виды вирусов оспы входят в семейство поксвирусов?
2. Общая характеристика поксвирусов (морфология, химический состав).
3. Биологические свойства возбудителя оспы птиц.
4. Характеристика возбудителя оспы овец.
5. Характеристика вируса контагиозной эктимы овец.
6. Патогенез и клинические признаки оспы животных.
7. Устойчивость возбудителя оспы но внешней среде.
8. Чувствительность к химическим средствам.

**Темя: Лабораторная диагностика бешенства**

**Цель занятия:** изучить методы диагностики бешенства.

Бешенство- остро протекающая инфекционная болезнь, характеризующаяся тяжёлым поражением центральной нервной системы, как правило, с летальным исходом. Восприимчивы все млекопитающие животные и человек. Вирус бешенства - Rabiesviruses из семейства Rhabdoviridae род Lyssavirus. Инфекционную природу бешенства установили в начале 19 века. В 1804 г. немецкий ученый Цинке, французский ученый Галтье в 1979 г. экспериментально воспроизвел бешенство у кроликов. Большой вклад в специфическую профилактику бешенства внес французский ученый Л.Пастер. Он доказал, что при длительном пассировании вирус бешенства утрачивает вирулентность. Л.Пастер, пропассировав уличный вирус 133 раза через мозг кролика, получил вирус fixe фиксированный вирус, т.е. вирус с зафиксированными биологическими свойствами.

Биологические свойства: вирус - fixe — при заражении кролика в мозг инкубационный период 5-6 дней, подкожное заражение не вызывает заболевания, вирус не выделяется со слюной; как правило не вызывает образование телец Бабеша-Негри; вызывает паралитическую форму течения болезни.

Уличный вирус - Инкубационный период 14-18 дней, подкожное заражение вызывает бешенство, выделяется со слюной, вызывает образование телец Бабеша-Негри, обычно вызывает буйную форму, редко паралитическую.

**Морфология** и **химический состав.** Вирионы имеют форму стержня с обрубленным концом. Диаметр вириона 75-80 нм., длина 180 им. Вирион вируса РНК - содержащий со спиральным типом симметрии, имеет липопротеидную оболочку, на которой находятся поверхностные отростки.

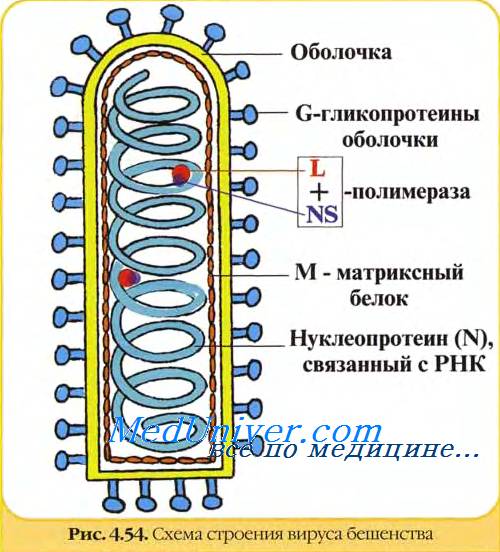


Рисунок 20 – Схема строения вируса бешенства

Вирус бешенства содержит гликопротеидный (наружный) и нуклеокапсидный (внутренний) антигены. Гликопротеидный антиген индуцирует образование вируснейтрализирующих антител, а нуклеокапсидныйантиген образование комплемент связывающих и преципитирующих антител. Эпизоотические штаммы вируса бешенства родственны в иммунобиологическом отношении, различаются по вирулентности. Вирус бешенства гемагтлютинирует эритроциты гусей.

Устойчивость к физико-химическим воздействиям.Низкие температуры консервируют вирус. Температура 60 ° С убивает через 5-10 минут, солнечный свет - за 5-7 дней. Растворы формалина, фенола, соляной кислоты (5 процентные) инактивируют вирус за 5-10 минут.

**Культивирование.** Вирус бешенства культивируется на белых мышах, кроликах, морских свинках и др. животных. Также культивируется в первичных культурах клеток (почки сипийского хомячка, эмбрион овец, телят и др.) и перевиваемых клетках. Вирус индуцирует образование цитоплазм этических телец-включений - тельца Бабеша-Негри (Бабеш - румынский учёный) впервые в 1887 году обнаруживший тельца. Через 6 лет тельца обнаружил итальянский учёный Негри.

Бешенство распространено повсеместно. Источником инфекции являются больные животные - собаки, кошки, дикие грызуны, лисицы, волки, корсаки и др. дикие животные, а также кровососущие летучие мыши. Животные передают вирус во время укуса. Плотоядные животные могут заражаться при поедании головного и спинного мозга погибших от бешенства животных.

Бешенство может протекать в классической форме и атипичной (нет стадии возбуждения). Инкубационный период 7 - 14-20 дней, может длиться до года и более. Продолжительность инкубационного периода зависит от места и силы укуса, количества и вирулентности попавшего в рану вируса, резистентности покусанного животного. С места укуса, вирус бешенства по нервным стволам попадает в центральную нервную систему размножается там и затем распространяется в организме по периферическим нервам и попадает в разные органы и слюнные железы, вызывая их паралич и выделяется из организма со слюной.

Бешенство протекает остро. Клинические признаки в основном сходны у всех животных и человека. Наиболее типичные они у собак. Собаки становятся вялыми, наблюдается потеря аппетита поедание несъедобных предметов (тряпки), зуд, стремятся убежать из дома, не узнают хозяина. Затем появляется агрессивность, начинается слюнотечение, паралич глотки (собака как будто подавилась), паралич конечностей и гибель.

У собак может наблюдаться и буйное и тихое (паралитическое) течение болезни, У крупного рогатого скота может выпасть .стадия возбуждения. У людей отмечается водобоязнь.

Трупы животных подозрительных на бешенство в полевых условиях вскрывать запрещается.

Диагностика болезни. Диагноз на бешенство ставят на основании эпизоотологических, клинических данных и результатов лабораторных исследований. Для лабораторных исследований патологический материал в лабораторию направляют с нарочным; (свежий труп мелких животных, от крупных и средних животных голову с двумя первыми шейными позвонками, от крупных животных можно отправлять головной мозг (свежий или консервированный в 30-50 процентном растворе глицерина). Для серологических исследований пригоден не консервированный мозг.

При работе с больными животными, вскрытие трупа, извлечение мозга и другие работы необходимо проводить в стерильных условиях при строгом соблюдении мер личной безопасности: прочная фиксация головы животного; халаты с нарукавниками, резиновый или полиэтиленовый фартук, резиновые сапоги, защита рук двумя ларами перчаток - хирургическими и анатомическими, для защиты глаз надевают очки, на нос и рот марлевую повязку.

Лабораторная диагностика бешенства заключается в микроскопическом исследовании головного мозга (с целью обнаружения телец Бабеша-Негри), серологическом (обнаружение специфического рабического антигена) и в постановке биологической пробы.

Для микроскопического исследования делают мазки или отпечатки из разных участков головного мозга (аммонов рог, кора полушарий, мозжечок, продолговатый мозг) и окрашивают по одному из методов: Селлерсу, Муромцеву, Манну, Ленцу и т.д.). Положительным результатом считают наличие телец Бабеша-Негри.

Приготовление препаратов из мозга и окраска по Селлерсу. Препараты готовят из свежей ткали мозга, взятой из области аммонова рога, коры мозга и мозжечка,

1. Кусочек мозга помещают на фильтровальную бумагу в чашке Петри поверхностью среза кверху.

На поверхность среза накладывают обезжиренное предметное стекло и  
слегка надавливая, получают на нем отпечаток ткани.

На влажный отпечаток наливают краситель Селлерса (одна часть I %  
раствора основного фуксина, смешанная с двумя частями I % метиловогосинего) оставляют на 10-30 секунд.

Быстро промывают водопроводной водой или фосфатным буфером (рН  
7,0-7,5), высушивают в вертикальном положении при комнатной температуре.

Просматривают под иммерсионным объективом.

Результат - фон препарата синий, тельца Бабеша-Негри красные с темными включениями.

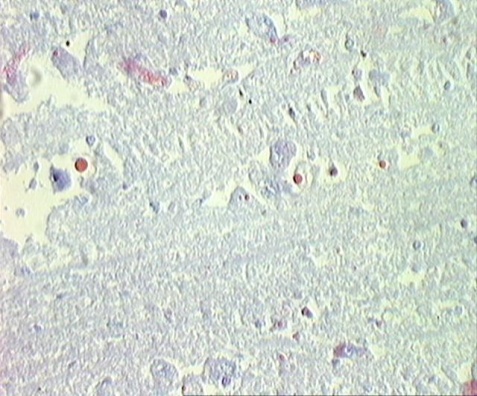


Рисунок 21- обнаружение телец Бабеша- Негри

**Серологические исследования**

* РДП в агаровом геле применяется для обнаружения специфического рабического антигена в неко«сервированном головном мозге животных, павших от уличного бешенства, а также у животных, использованных для биопробы.
* РИФ основана на выявлении вирусного антигена, вступившего в реакцию со специфической антирабической сывороткой, меченной флуоресцирующим красителем при люминесцентной микроскопии. При положительном результате в препарате наблюдается разной величины и формы флуоресцирующие желто - зеленым цветом гранулы. Отрицательным результатом считают отсутствие специфической флуоресценции.

**Биологическая проба.** Для биопробы отбирают белых мышей массой 16—20 грамм, не­рвную ткань из всех отделов головного мозга растирают в ступке со стерильным песком, добавляют физиологический раствор до получения 10%-ной суспензии, отстаивают 30—40 минут и исполь­зуют надосадочную жидкость для заражения мышат. При подозре­нии на бактериальное загрязнение добавляют на 1 мл суспензии 500 ЕД пенициллина и стрептомицина и выдерживают 30—40 минут при комнатной температуре. На одну биопробу заражают 10—12 мышат: половину интраце-ребрально по 0,03 мл, половину подкожно в область носика или в верхнюю губу по 0,1—0,2 мл.

Зараженных мышат помещают в стеклянные банки (лучше ак­вариумы) и наблюдают за ними в течение 30 дней, ведя ежеднев­ную регистрацию. Гибель мышей в течение 48 ч считают неспеци­фической и не учитывают в оценке результатов. При наличии ви­руса бешенства в патологическом материале с 7—10-го дня после заражения у мышей наблюдают следующие симптомы: взъерошенность шер­сти, своеобразную горбатость спины, нарушение координации движений, паралич задних, затем передних конечностей и гибель. У павших мышей головной мозг исследуют в РИФ, с помощью световой микроскопии проводят обнаружение телец Бабеша—Негри и ставят РДП.

Биопробу на бешенство считают положительной, если в пре­паратах из мозга зараженных мышат обнаруживают тельца Ба­беша—Негри или выявляют антиген методами РИФ или РДП. От­рицательный диагноз — отсутствие гибели мышат в течение 30 дней.

Рекомендуют для ранней диагностики методом биопробы (осо­бенно это важно, когда исследуемое животное покусало человека) использовать для заражения не 10—12 мышат, а 20—30, и начиная с третьего дня после заражения ежедневно забивать по 1—2 мы­шонка для исследования их головного мозга в РИФ. Это по­зволяет (в положительных случаях) сократить срок исследования на несколько дней.

Для специфической профилактики применяют живые и инактивированные вакцины.

* Готовят для собак и кошек (иммунитет б месяцев) сухую  
  фенол вакцину из мозга овец, зараженных фиксированным штаммом Пастера.
* Имеется живая культуральнаяаитирабическая вакцина из штамма ЗАД,  
  предложенная институтом полиомиелита.
* Для КРС *-* жидкая, адьювантно-депонированная живая антирабическая  
  вакцина АЗВИ.
* Генноинженерная вакцина на основе рекомбинантного вирусаосповакцины. В состав его генома встроен ген. кодирующий белок вируса бешенства, способного вызывать образование антител (вводят методом скарификации).

**Контрольные вопросы**

1. Какими морфологическими свойствами обладает вирус бешенства?
2. Таксономия вируса бешенства.
3. Клиническая картина болезни.
4. Какой патологический материал необходимо взять для лабораторных  
   исследований?
5. Назовите лабораторные методы диагностики бешенства.
6. Правила работы с патологическим материалом, полученным от  
   животных, подозреваемых в заболевании бешенством,
7. Как обнаружить вирусный антиген в РИФ?
8. Как обнаружить вирусный антиген в РДП?
9. Тельца Бабеша-Негри и их обнаружение в патологическом материале

**Тема: Лабораторная диагностика лейкоза крупного рогатого скота**

**Цель занятия:** изучить морфологические, биологические свойства ретровирусов и освоить лабораторные методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

Ретровирусы - это уникальное семейство РНК - содержащих вирусов. Раньше они назывались - онкорнавирусы (от греч.слова oncos - опухоль )

Особенности ретровирусов заключаются в том, что они в своем, составе имеют особый фермент - обратная транскриптаза (от англ. слова reversetranscripfase) или РНК - зависимая ДНК полимераза или ревертаза. С помощью ревертазы у ретровирусов поток информации идет наоборот, обратно (от лат.слова retro) от РНК к ДНК. Впервые ретровирусы были открыты в начале XX века. Датские ученые Элерман и Еанг в 1907 г. доказали вирусную природу эритробластоза кур, а американский ученый Раус выделил в 1911 году вирус саркомы птиц.

Семейство ретровирусов подразделяется на подсемейства, роды, виды.

* Подсемейство онковирусов - опухолевые вирусы. Сюда относятся возбудители, рака и лейкоза у животных, птиц, рыб, пресмыкающихся и человека. Онковирусы обнаружены у мышей, морских свинок, обезьян, мангустов.
* Подсемейство спумавирусов - так называемых пенящих вирусов,  
  которые вызывают у животных бессимптомную инфекцию. В клетках наблюдается своеобразный цитопатический эффект, клетки сливаются и выглядят как бы вспененные.
* Подсемейство лентивирусов - медленных вирусов, они вызывают у  
  животных медленно протекающие, но прогрессирующие болезни - это болезнь маэди овец, вирус висна, вызывающая также тяжелую патологию у овец и завершающаяся гибелью,

Все ретровирусы построены по единому плану. Это крупные сферические частицы разменом 80-100 нм и с хорошо выраженной липидосодержащей оболочкой. На наружной оболочке имеются отростки на ножке и шишечкой на конце, напоминающие шляпку гвоздя.

По химическому составу ретровирусы примерно одинаковы: РНК 2%,белка 60-70%, липиды 30-40%, углеводы 1-2%. При этом клетки хозяина, где размножаются вирусы, влияют на их химический состав.

Вирусов вызывать образование неоплазм у их хозяев. Вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) имеет общие свойства, как и у всех ретровирусов; по структуре, по наличию связанной с вирионом, обратной транскрилтазы, по наличию у каждого вируса специфического для данного рода вирусов. Знание антигенной структуры ВЛКРС - необходимо для их индикации и идентификации в серологических реакциях.

Культивирование. ВЛКРС культивируется на культуре клеток (первичных и перевиваемых). Вирус размножается в краткосрочных культурах лейкоцитов. Репродуцируется вирус в перевиваемых клетках FZK – BZV (полученная в 1974 г. Маатен при сокультивировзнни эмбриональных клеток почки овцы с лимфоцитами лейкозной коровы). ВЛКРС репродуцируется в перевиваемых культурах от различных животных.

Вирус лейкоза крупного рогатого скота описан в 1969 г. Миллером и др. В настоящее время лейкозы крупного рогатого скота регистрируются ео всех странах мира. Раскрытию этиологии способствовали эп из о отологические исследования, распространение лейкоза из зон энзоотии в зоны свободных от лейкоза, также внедрение клинике-гематологических методов .диагностики, патом о рфо логического контроля при убое животных.

Лейкоз крупного рогатого скота - хроническая инфекционная болезнь опухолевой природы. Болезнь протекает бессимптомно или проявляется лимфоцитозом и зло качеств ениьгми образованиями в кроветворных и других органах и тканях.

Различают следующие формы болезни: энзоотический и спорадический лейкоз. Спорадический лейкоз встречается редко и поражает молодых животных (до трех лет). Энзоотический лейкоз - контагиозное заболевание с длительным латентным периодом, во время которого в крови выявляют .вирус лейкоза крупного рогатого скота и антитела к нему. Эта форма болезни встречается у взрослых животных.

Энзоотический лейкоз протекает в виде:

1) опухолевого лейкоза - встречается среди молочных коров в возрасте от  
3 до 8 лет. Эти животные являются вирусо- или антителоносителями;

2) персистентного лимфоцитоза - доброкачественная  
лимфопролиферативная форма встречается среди клинически здорового скота, в хозяйствах, инфицированных вирусом лейкоза;

3) инфекции вызываемой вирусом лейкоза, протекают без каких либо  
гематологических и клинических изменений.

Источником инфекции являются заражённые животные. При этом рассматривают вертикальный путь заражения (от матери плоду трансплацентарно) и горизонтальный (от животного к животному). Для заражения коровы достаточно ввести внутрикожно 2500 лимфоцитов крови (это количество крови содержится в 0,0005 мл крови), что учитывают при массовых взятиях крови и при других ветеринарных процедурах, со шприцами, иглами, хирургическими инструментами).

Лабораторные методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота

1. Гематологические методыисследования. - заключается в том, что в  
периферической крови обнаруживается повышенное количество лейкоцитов в  
основном лимфоидного и слабодифференцированных клеток:

а) подсчет количества лейкоцитов с помощью электронного счетчика (в  
аппарате Пикаскель или в камере Горяева)

В норме у крупного рогатого скота;

эритроцитов - 5,0 - 6,5 млн (в ср. 6:5);

лейкоцитов - 4,5 - 12,0 тыс. (в ср. - 10,0)

Для этого берут кровь из яремной вены и исследуют не позднее, чем через 36 час.после взятия;

б) выведение лейкоцитарной формулы - на предметных стеклах готовят  
мазки крови. Мазки красят по - Романовскому-Гимза, по Паппенгейму и др.  
Мазки смотрят под микроскопом с иммерсионной системой. Подсчитывают 10Q  
или 200 клеток белой крови и количество отдельных элементов крови выводят в  
процентах.

2. Серологические методы.Антитела при лейкозе образуются против  
всех структурных белков вируса, но наибольший титр антител обнаруживается  
кбелку др.

В результате персистенции ВЛКРС, антитела обнаруживаются в ранней стадии инфекции и серологические обследования поголовья является более подходящим методом для раннего выявления инфицированных животных. Длясерологической диагностики применяется РИД-реакция иммунодиффузии.

В РИД используют диагностический антиген, специфическая положительная сыворотка к вирусу лейкоза, отрицательная сыворотка крови крупного рогатого скота и входит также агар.

Реакция считается положительной, если между лунками с сывороткой и антигене образуется полоса преципитации, которая образует изгиб вблизи лунки с положительной сывороткой, отрицательная - если полоса преципитации упирается в лунку с испытуемой сывороткой.

Кроме того, для диагностики лейкоза крупного рогатого скота были предложены РСК, РИФ, ИФА (иммуноферментный анализ). При массовых диагностических исследованиях эти методы не применяются.

Гистологический метод — исследование гистосрезов (из кусочков селезенки, лимфатических узлов, грудной кости, печени, почки, легких, сердца).

**Контрольные вопросы**

1. Классификация ретровирусов.
2. Какая физическая структура ретровирусов?
3. Особенности репродукции вирусов.
4. Обратная траискриптаза. Ее роль в репликации.
5. Персистенция вируса лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС).
6. Культивирование ВЛКРС.
7. Методы индикации и идентификации ВЛКРС.
8. Патогенез и клиника лейкоза крупного рогатого скота.

9 Серологические методы диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

**Тема: Лабораторная диагностика Ящура**

**Цель занятия:** изучить систематику, морфологию и физические свойства вируса и освоить методику, идентификации вируса в РСК.

Яшур- Aphiaeepizooticae - острая контагиозная вирусная болезнь парнокопытных животных, проявляющаяся везикулярными (афтозными) поражениями слизистой оболочки ротовой полости, губ, носового зеркальца, сосков вымени, венчика, межкопытцевой щели.

Ящур регистрируется на всех континентах, кроме Австралии, имеет тенденцию к глобальному распространению.

Возбудитель - РНК - содержащий вирус относится к семейству Picornaviridae, роду Aphtovirus

Вирионы вируса ящура не имеют наружной липопротеидной оболочки, имеют сферическую форму, геном, заключен в икосаэдрический капсид. Размер составляет 22-25 нм. В составе вируса имеется 6 видов структурных полипептидов VP1, VP2. VP3. VP4, VP6, VP8.

РНК вируса - однонитевая, нефрагментированная. Имеет 8450 нуклеотидов.

При размножении вируса ящура в организме животного и в культуре клеток образуются четыре вида вирус специфических антигенов.

Наиболее выраженными иммунизирующими свойствами обладают полные вирусные частицы. Вирус ящура имеет 7 иммунологических типов, и каждый тип имеет подтипы (варианты). Различают типы А.О.С., САТ-1, САТ-2, САТ-3, Азия-1. Тип А -изолирован в Германии, тип О - во Франции, тип С - в Италии, типы 'САТ-1, САТ-2, САТ-3 выделены в 1948 году в Африке; тип Азия-1 в азиатских странах, странах Ближнего «Среднего Востока в 1954 году.

Таким образом, к 1986 г. было установлено 7 типов и более SO подтипов вируса ящера. Такое большое наличие антигенных вариантов связано с высокой естественной изменчивостью вируса ящура, особенно у вирусов типа А.

**Устойчивость.** Физические и химические факторы по разному влияют на вирус ящура, одни - консервируют. Так, высушивание, низкая температура, глицерин сохраняют вирус. Другие факторы вирус ящура инактивируют. Так, например УФ - лучи, высокая температура (при 55° С - вирус теряет вирулетность в течение 15-40 минут), низкая рН - разрушают вирус. Гамма — лучи также инактивируют вирус ящура. К обычным дезинфицирующим средствам вирус ящура устойчив. Так, креолин, фенол, лизол, крезол малоэффективны.

Вирус ящура длительное время сохраняется во внешней среде. Длительное время инфицированные пастбища могут быть источником инфекции. В зимнее время вирус ящура сохраняется в почве - 37 дней, в сене -6-7 месяцев, на волосяном покрове крупного рогатого скота зимой вирус сохраняется 41 суток, весной - 5 суток.

Вирус ящура длительное время сохраняется в продуктах: в замороженном мясе в течение трех месяцев, в свежем молоке 12 часов, в сухом молоке 2 года, в сливочном масле - 25 - 45 дней

**Культивирование.** Для культивирования вируса широко использовали кроликов. Новорожденных крольчат заражают внутримышечно 10%-ной суспензией вируса ящура. Животных после появления клинических признаков забивают, тушки, замораживают и в дальнейшем используют как сырьё для приготовления вакцины. Вирус ящура культивируется в переживающих тканях. При этом используются эксплантаты эпителия языка крупного рогатого скота. Перевиваемые линии клеток также используются, где после 5-10-кратного пассирования хорошо накапливается вирус.

**Патогенез и клиника**. При ящурной инфекции вирус проникнет в организм животного через слизистые оболочки респираторного и желудочно-кишечного тракта и кожу, распространяется е организме лимфогематогеным путем и локализуется избирательно в чувствительной ткани. Инкубационный период 1-7 дней.

Типичная форма проявления специфических признаков ящура - это появление лихорадки, температура тела повышается до 41,5°, слюнотечение, потеря аппетита, хромота, появление афт на слизистой оболочке ротовой полости, особенно языка, затем на коже венчика, мякишей копыт, межкопытце вой щели, вымени. Рис

Афты вначале имеют размер с булавочную головку, затем ореха, часто могут сливаться. Через 1-2 дня афты лопаются, образуются ярко-красные эрозии, которые заживают на 10-13 сутки, хромота затем исчезает и общее состояние животных улучшается.

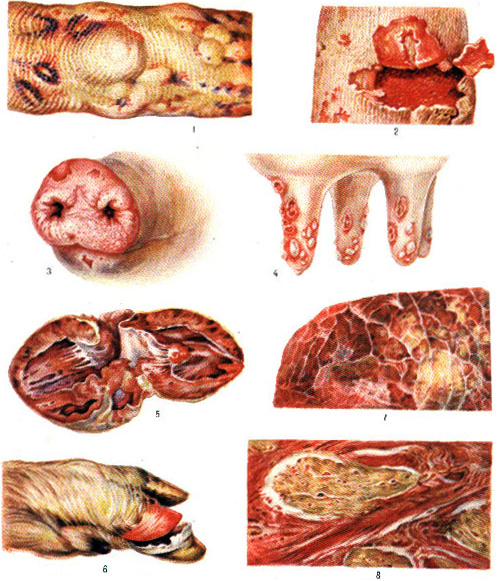


Рисунок 22 - Ящур у сельскохозяйственных животных

1– язык коровы с невскрывшимися афтами;

2– язык коровы с вскрывшимися афтами;

3– афты и эрозии на пятачке и нижней челюсти свиньи;

4– афты на сосках вымени коровы;

5– миокардит у свиньи;

6– спадание копыта у свиньи;

7– поражение скелетных мышц у коровы при злокачественной форме ящура;

8– разрастание соединительной ткани в сердце после ящурногомиокардита.

При злокачественной форме ящура, которая обычно бывает у молодняка наблюдается смерть через 7-14 дней. Болезнь у телят при этом протекает остро и сверхостро и часто при отсутствии афт. Летальность может достигать более 60%. При вскрытии трупов отмечается острое катаральное воспаление слизистой оболочки носовой полости, афты и эрозии в пищеводе и бронхах, поражение сердца и мышц.

**Диагноз** ставят на основании эпизоотических данных, клинических признаков и патомрфологических изменений. Диагноз подтверждается лабораторными исследованиями, которые ставят две цели: выделение и идентификация вируса и ретроспективная диагностика - основанная на выявлении специфических антител.

Патологическим материалом для выделения вируса являются стенки и содержимое афт, для ретроспективной диагностики у животных исследуют парные сыворотки и пищеводно-глоточную слизь.

Идентификация вирусных антигенов проводится с помощью РСК. Кроме того ставят РН на культуре клеток или 4-6 дневных мышатах, непрямую реакцию иммунофлуоросцении.

Таблица 5 – Схема титрования комплемента

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **№ п.п.** | **Компоненты (мл)** | **содержание цельного комплемента %** | | | | | | | |  |
| 0,5 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 2,5 | 3,0 | 3,5 | 4,0 | 4,5 |
| 1 | Комплемент  (в разведении  1 :20) | 0,05 | 0,1 | 0,15 | 0,2 | 0,25 | 0,3 | 0,35 | 0,4 | 0,45 |
| 2 | Физ.растров  ( до 0,5 мл.) | 0,45 | 0,4 | 0,35 | 0,3 | 0,25 | 0,2 | 0,15 | 0,1 | 0,05 |
| 3 | ГС | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |
| 4 | Физ.раствор | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 1,0 |

Таблица 6 – Схема постановки РСК

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| % п/п | компоненты | | сыворотка | | |
|  | А | О | С |
|  | 1:15 | 1:20 | 1:10 |
| 1 | специфическая сыворотка | | ++++ | - | - |
| 2 | антиген  (испытуемый материал) | | - | ++++ | - |
| 3 | комплемент | | - | - | ++++ |
| водяная баня при Т 37 °С на 20 минут | | | | | |
| 4 | ГС (гемолитическая система : гемолизин и 2 % - ная взвесь эритроцитов барана) | 0,4 | | 0,4 | 0,4 |
| водяная баня при Т 37 °С на 20 минут | | | | | |

Дифференциальная диагностика. Необходимо исключить оспу, экзантему, некробактериоз, травматические повреждения конечностей.

**Иммунитет и специфическая профилактика.** В противовирусном иммунитете при ящуре принимают участие и неспецифические и специфические факторы.

Это и физические барьеры покровных тканей, это гуморальные не специфические факторы: комплемент, пропердин, ингибиторы, это и фагоцитарные реакции, обеспечивающие фагоцитоз инфицированных клеток, эта и синтез интерферона. Специфические факторы связаны с активизацией иммунокомпетентных клеток - Т - В - лимфоцитов, гуморальные специфические факторы связаны с синтезом вирус нейтрализующих антител.

**Контрольные вопросы**

1. Каковы основные свойства вируса ящура?
2. Каковы симптомы и эпизоотические особенности болезни, вызываемой вирусом ящура?
3. Какие методы лабораторной диагностики вы знаете?

**Определения и термины**

**Авирулентный** — невирулентный, не способный вызывать заболевание; такая степень снижения вирулентности (мера патогенности) определенного штамма микроба, при которой он способен размножаться в макроорганизме, не вызывая видимых признаков болезни, но обеспечивая в ряде случаев формирование имму­нитета.

**Адгезия микроорганизмов** — свойство микроорганизмов (вирусов, бактерий, грибов) взаимодействовать и соединяться с поверхностными рецепторами клеток. Адгезивные свойства микробов можно наблюдать с помощью флуоресцентной техники, световой и электронной микроскопии. Степень А. можно оценить по из­менению электрофоретической подвижности или поверхностного заряда клеток-рецепторов.

**Амантадин**—трициклический симметрический амин, 1-адаманта-намингид-рохлорид, блокирующий размножение некоторых вирусов, имеющих оболочку. Применяется для борьбы с вирусами гриппа.

**Антигены** — гинетически чужеродные вещества, вызывающие при введении в организм развитие специфических иммунологических реакций (синтез гумораль­ных антител или дифференциацию клона сенсибилизированных лимфоцитов). Антигенностью обладают белки, полисахариды, карбогидраты, липополисахариды, а также некоторые искусственные высокополимерные соединения. А. харак­теризуются чужеродностью, антигенностью, иммуногенностью, специфичностью.

**Антигенный дрейф —** постепенные, незначительные изменения некоторых вирусов (гриппа; возможно, ящура), обусловленные отбором (эволюционно) антиге­нов оболочки вируса. А. д. осложняет проведение мероприятий по борьбе с болез­нями, при которых наблюдается это явление. Мутанты возникают преимуще­ственно при распространении вируса в частично иммунных популяциях, но также они могут быть получены в лаборатории путем выращивания исходного штамма в присутствии антител.

**Антитела, активный центр** — участок молекулы антитела, соответствующий пространственной конфигурации антигенной детерминанты (по типу «ключ — за­мок») и вступающий с ней во взаимодействие. Активный центр образуется обыч­но несколькими аминокислотами полипептидной цепи (или цепей) иммуногло­булина. Антитела могут содержать один-два активных центра и более.

**Антитела меченые** — антитела, соединенные с каким-либо флуоресцирующим веществом. Наиболее часто для этой цели используют флуоресцеин. При обработ­ке тканей, органов, содержащих антиген, специфичный к меченым антителам, происходит образование комплекса «антиген + антитело».

**Антитела нейтрализующие** — антитела, вызывающие нейтрализацию инфекци­онного агента. К определению А. н. часто прибегают при работе с вирусами, ток­синами, адгезинами. С сыворотками, содержащими эти антитела, ставят реакцию нейтрализации в культуре клеток тканей или на куриных (утиных) эмбрионах (при исследовании серотипов вирусов или идентификации вирусов из исследуе­мого материала).

**Аттенуация** — снижение вирулентных свойств возбудителя инфекции. Дости­гается путем создания условий, неблагоприятных для размножения возбудителей, но не вызывающих их гибель. А. проводят путем пассирования через иммунный или маловосприимчивый к вирусу (бактерии) организм, а также путем воздей­ствия УФ-облучения и рентгеновского излучения, культивирования при низких и высоких температурах и др.

**Аффинитет** — мера специфичности антител. При иммунизации антигенами образуется семейство антител, обладающих различной реакционной способнос­тью и специфичностью к антигену.

**Бабеша—Негри тельца** — специфические для вируса бешенства включения, со­четания скоплений вирионов с продуктами реакции клеток, локализирующиеся в цитоплазме клеток ножки гиппокампа (аммонова рога), в клетках Пуркинье моз­жечка и нейронах коры. Имеют округлую форму и характеризуются полиморфиз­мом; размер от 1 до 27 мкм, резко ограничены от прилежащей цитоплазмы. Обна­ружение телец Б.—Н. в мозгу погибших животных или человека имеет диагности­ческое значение (см. Внутриклеточные включения).

**Бактериофаг** — вирус бактерий. Известны ДНК- и РНК-бактериофаги, боль­шинство из ДНК-фагов двухспиральные, РНК-фаги односпиральные. Нуклеино­вая кислота фага окружена полиэдрическим капсидом (головка), к которому у многих фагов присоединяется отросток (хвост). Диаметр головок приблизительно 60...95 нм, а длина отростков 250 нм при толщине 10...25 нм. Отросток служит структурой прикрепления к бактерии. Взаимодействие Б. и микробных клеток — сложный биологический процесс, исход которого зависит главным образом от свойств фагов и проявляется лизисом бактериальных клеток или лизогенизациеи культур.

**Биологическая проба, биопроба —** метод диагностики с помощью эксперимен­тального заражения восприимчивых подопытных животных изучаемым патологи­ческим материалом с целью воспроизведения инфекции, выявления и идентифи­кации возбудителей болезней или их токсинов. Кроме того, Б. п. является мето­дом контроля в биологии препаратов (вакцин, сывороток) на их безвредность, отсутствие токсичности, пирогенности и оценки активности.

**Биотехнология** — комплекс естественных или искусственно созданных техно­логических приемов для образования биологических систем или использования в промышленных и научных целях. Важнейшие направления Б.: энзимная, клеточ­ная и эмбриологическая технология и автоматизированное управление приведен­ными системами. Б. находит применение в энергетике, сельском хозяйстве, хими­ческой промышленности, медицине, ветеринарии и др.

**Бляшкообразующая единица (БОЕ), бляшки** — типичный цитопатический эф­фект, возникающий в результате действия вируса на клетки, что приводит к обра­зованию очагов поражения (бляшек). Наиболее точным методом титрования ви­руса служит метод, основанный на подсчете числа бляшек. Число бляшек, образу­ющихся в результате инкубации на сплошном слое культур клеток, пропорционально количеству вирионов.

**Боксы** (бактериологические) — изолированные, застекленные камеры, предназ­наченные для микробиологических и вирусологических исследований в асепти­ческих условиях.

**Вакцина** — биологический препарат, содержащий ослабленные или убитые патогенные микроорганизмы или продукты их жизнедеятельности, которые применяют для активной иммунизации (вакцинации) с целью создания невосприимчивости (иммунитета) организма к определенным инфекционным болез­ням. В. готовят как из целых микроорганизмов и вирусов, так и из их токсинов или отдельных антигенов. Различают следующие типы вакцин: живые, убитые, активные, химические, генно-инженерные, рикомбинантные, анавакцины, ана­токсины. В зависимости от количества входящих антигенов В. подразделяют на моно-, ди- и поливакцины. В. широко применяют в практике и терапии инфек­ционных болезней. Вводят подкожно, внутрикожно, внутримышечно, аэрозоль-но и др.

**Вакцина авинизированная** — вакцина, приготовленная из штамма вируса, адап­тированного к эмбрионам кур.

**Вакцина аттенуированная** — вакцина, приготовленная из аттенуированного живого штамма бактерии или вируса (см. Аттенуация). В отличие от инактивиро-ванных аттенуированные вакцины обеспечивают формирование иммунитета в те­чение 5...8 сут после вакцинации. Однако в некоторых случаях они могут созда­вать длительное вирусо- или бактерионосительство среди иммунизированных жи­вотных и птиц.

**Вакцина живая —** вакцина, изготовленная, как правило, из искусственно ос­лабленных (аттенуированных) или из природных авирулентных или слабовиру­лентных штаммов возбудителей инфекций, которые утратили способность вы­зывать клиническое заболевание организма. В ветеринарии применяют живые вакцины против сибирской язвы, ящура, ларинготрахеита птиц, болезни Нью­касла и др.

**Вакцина инактивированная, убитая** — вакцина, изготовленная из химически или физически (прогревом; ультрафиолетовым, ультразвуковым облучением и др.) обработанных микроорганизмов, потерявших способность к размножению, но сохранивших антигенную структуру, т. е. антигенность и иммуногенность. В инактивированной противовирусной вакцине должен быть убит вирусный геном. Это достигается воздействием на вирус пропиолактона, формальдегида и других химических факторов.

**Вакцина культуральная** — вакцина, изготовленная из вирусов, адаптированных и размноженных в культуре определенной ткани или клеток. Такая вакцина, в ча­стности, используется в некоторых странах для профилактики бешенства.

**Везикулы** — одна из форм экзантемы, характеризующаяся длительным локаль­ным расширением субпапиллярных сосудов дермы и образованием пузырьков при некоторых вирусных инфекциях (ящуре, злокачественной катаральной горяч­ке крупного рогатого скота, оспе коров и овец, везикулярной болезни и др.).

**Вирион** — морфологически полноценная внеклеточная вирусная частица, фи­зическая единица какого-либо вируса. Представляет собой заключительную фор­му онтогенетического развития вируса (см. Вирусы, капсид, капсомеры).

**Вирусемия, виремия** — присутствие инфекционного вируса в кровяном русле.

**Вирусные гены** — материальные единицы наследственности вируса. Нуклеино­вые кислоты вирусов служат носителями наследственной информации, содержат информацию для синтеза специфических энзимов и белков оболочки.

**Вирусоносительство** — пребывание вируса в организме животного без видимых клинических симптомов болезни.

**Вирусы** — облигатные внутриклеточные паразиты животных, растений, насе­комых, грибов, простейших, бактерий, микоплазм и других живых существ. Не­клеточные формы жизни, обладающие собственным геномом и способные к вос­произведению лишь в клетках хозяина. В. содержат только один тип нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК). В. открыты русским ученым Д.И. Ивановским (1864— 1920) в 1892 г. Масса В. измеряется в дальтонах.

**Вирусы дефектные (неполные)**— вирусные частицы, отличающиеся от полно­ценных вирусов более короткой ДНК, чем полный вирусный геном, как прави­ло, за счет укорочения правого конца. В. д. характеризуются низкой инфекци-онностью, но хорошо индуцируют синтез интерферона и продукцию тканевых антигенов. Дефектные вирусы выделяют, например, из пула аденовирусов чело­века типа 12 методом центрифугирования в градиенте плотности. Инактивация В. д. УФ-облучением подавляет в первую очередь интерферонпродуцирующую активность вируса, а затем и способность к стимуляции образования тканевых антигенов.

**Вирусы онкогенные** — некоторые из РНК-содержащих вирусов, способные вы­зывать у различных видов животных развитие лейкозов, лимфом, сарком.

**Внутриклеточные включения** — разграниченные, единичные или множествен­ные, многообразные, гомогенные или структурные образования величиной от 1...2 до 20..30 мкм. Выявляют в окрашенном препарате с помощью обычной све­товой или электронной микроскопии в ядре или цитоплазме клеток различных органов и тканей. В. в. локализуются избирательно и появляются при многих ви­русных болезнях (оспе, бешенстве, гриппе, парагриппе, чуме крупного рогатого скота, везикулярном стоматите, борнарской болезни, ринопневмонии лошадей, аденовирусной инфекции). Обычно они состоят из вирионов и являются накоп­лениями нуклеиновой кислоты или протеинов вируса.

**Встречный иммуноэлектрофорез (ВИЭФ)** — метод иммунологической диагнос­тики различных болезней; основан на образовании преципитата при наличии в исследуемой системе гомологичных антигенов и антител. Реакцию проводят в гелевой среде, но в отличие от обычных иммунодиффузных методов диффузия ан­тигенов и антител происходит не свободно во всех радиальных направлениях, а навстречу друг другу, под воздействием электрического поля.

**Гемагглютинация** — склеивание и выпадение в осадок эритроцитов под воздей­ствием вирусов, бактерий, токсинов и др., способных адсорбироваться на поверх­ности эритроцитов, а также гемагглютининов. Оболочка некоторых вирусов со­держит специфические белки (гемагглютинины), которые способны присоеди­няться к эритроцитам. Г. вызывается орто-, парамиксовирусами и др.

**Гемагглютинин** — вещество, содержащееся в некоторых вирусах (болезни Нью­касла, гриппа, парагриппа), способное вызывать агглютинацию эритроцитов од­ного или нескольких видов животных. Г. вируса гриппа — гликопротеид, образу­ющий на поверхности вириона многочисленные короткие выступы.

**Генетика вирусов** — раздел генетики, изучающий наследственность и изменчи­вость вирусов.

**Генетическая рекомбинация** — обмен генетическим материалом между разными родительскими вирусами, при котором потомство (рекомбинанты) содержит пос­ледовательность нуклеотидов, происходящих от того и другого родителя.

**Генная (генетическая) инженерия** — отрасль биологической науки, изучающая закономерности конструирования ин витро рекомбинантных молекул ДНК и по­ведение их в реципиентной клетке. Цель Г. и. — создание новых генетических структур, рекомбинантных молекул. Основа Г. и. была заложена в 1972 г. в Наци­ональной академии наук США.

**Геном вириона** — совокупность генетических элементов (генов), локализован­ных в вирионе. У вирусов с фрагментированным геномом (орто-, миксовирусы и реовирусы) каждая молекула РНК соответствует одному гену. У вирусов живот­ных число генов от 3 до 160.

**Гены** — фрагменты молекул ДНК (у некоторых вирусов — РНК), контролиру­ющие синтез одного белка или пептида. В Г. записана генетическая информация о всех признаках, присущих клетке.

**Гибридизация вирусов** — объединение в одном вирусном геноме генетического материала разных родительских вирусов (см. Генетическая рекомбинация).

**Гибридомы** — гибридные клетки, получаемые при слиянии лимфоидных и неопластических клеток и наследующие от первых способность продуцировать антитела, а от последних — свойство длительное время репродуцировать.

**Гипериммунизация** — многократная иммунизация животного каким-либо ан­тигеном (вакциной). Обычно проводится с целью получения сывороток с высо­ким содержанием антител.

**Гликопротеиды вирусов** — сложные белки, состоящие из углеводов и их произ­водных. Установлены в составе суперкапсида больших вирусов; иногда клеточно­го происхождения.

**Гнотобиоты** — животные, выращенные в период постнатального развития в стерильных условиях.

**Депротеинизация** («раздевание» вириона) — высвобождение инфекционной нуклеиновой кислоты из вирусного чехла. Может представлять простое высво­бождение вирусной нуклеиновой кислоты на клеточной мембране (энтеровирусы) или в случае виропексиса — внутриклеточно в вакуолях (поксвирусы). Некоторые вирусы (реовирусы) полному «раздеванию» не подвергаются.

**Диплоидные клеточные штаммы** — клетки одного типа, способные претерпе­вать до 100 делений, сохраняя при этом свой исходный диплоидный набор хро­мосом.

**Игла среда** — питательная среда, разработанная Иглом, включает изотоничес­кий буферный (рН 7,4) раствор органических солей, глюкозы, витаминов, коэн-зимов, аминокислот, содержащий антибиотики для предотвращения роста бак­терий.

**Идентификация вирусов** — определение видовой или типовой принадлежности вируса, заключительный этап диагностического исследования. Проводится в результате воспроизведения инфекции у лабораторных животных, установления цитопатического эффекта в культуре клеток; феномен гемадсорбции и гемагглютинации в ходе постановки реакций РТГА, РН, РСК. Окончательная идентифика­ция достигается после применения комплекса серологических методов (см. РТА, РИГА, РТГА, РН, РСК).

**Иммунизация активная** — создание искусственного иммунитета за счет введе­ния вакцин и анатоксинов.

**Иммунизация пассивная** — метод профилактики и терапии инфекционных бо­лезней, при котором иммунологическая защищенность организма (пассивный иммунитет) достигается путем введения гипериммунных или реконвалесцентных сывороток (серопрофилактика), содержащих специфические антитела. Для И. п. в последнее время используют также гамма- и полиглобулиновые препараты, сво­бодные от балластных белков,

**Иммунитет** — состояние устойчивости организма к заразному началу (вирусам, микробам, токсинам, простейшим) и другим генетически чужеродным природ­ным и синтетическим соединениям. И. обеспечивается многочисленными клеточ­ными и гуморальными факторами и обусловливает постоянство внутренней среды организма в течение всего периода его существования. Различают видовой и при­обретенный И., активный и пассивный, а также другие его виды.

**Иммунитет активный** — состояние устойчивости к микроорганизмам или анти­генным веществам, возникающее в результате реакции организма на активную иммунизацию или инфицирование соответствующими микроорганизмами или веществами. Для И. а. необходимо время от нескольких дней до нескольких не­дель, так как в этот период происходит перестройка защитных систем организма и развитие индуцированного ответа.

**Иммунитет пассивный** — устойчивость организма к инфекционным агентам, созданная путем парентерального введения в него специфических антител. Такие антитела содержатся в гипериммунных сыворотках, сыворотках реконвалесцентов или гамма- и полиглобулиновых препаратах. В отличие от активного И. п. форми­руется сразу после введения антител в организм и сохраняется до тех пор, пока последние не будут из него выведены естественным путем.

**Иммунитет противовирусный** — невосприимчивость организма к определенным вирусным инфекциям, достигнутая переболеванием, активной или пассивной им­мунизацией. Кроме защитных факторов, участвующих в возникновении антибак­териального и противовирусного иммунитетов, важную роль играют интерфероны (см. Интерферон).

**Иммунная сыворотка** — сыворотка, содержащая специфические антитела, полученная от иммунизированного (вакцинированного) или переболевшего живот­ного. Применяется для лечения или профилактики (пассивная иммунизация) при определенных инфекционных болезнях.

**Иммуноглобулины** — группа белков, глобулинов сыворотки крови, обладающих свойствами антител. У человека и млекопитающих установлено пять классов Ig: lgA, lgG, IgM, IgD и IgE. Классы неоднородны и включают несколько подклассов. Их молекулы построены из двух легких и двух тяжелых полипептидных цепей. Легкие цепи для всех классов иммуноглобулинов являются общими, тяжелые — специфичны для каждого класса. **Иммунодефицит** — врожденное или индуцированное в постнатальный период отсутствие в организме того или иного фактора иммунитета (конституционально­го, фагоцитарного, гуморального).

**Иммунодиффузия** — свободное движение молекул антигена и антител в на­правлении друг к другу в геле. На И. основана реакция преципитации в агаровом геле, широко используемая для количественного и качественного анализа состава антигенов микроорганизмов, вирусов, простейших, тканей организма и других органических и биологических веществ.

**Иммуномодуляторы** — вещества, вызывающие изменения функциональной ак­тивности системы иммунитета или ее отдельных компонентов и позволяющие по­дойти к управлению иммунными реакциями.

**Иммунофлуоресценция** — специфическое свечение комплекса антигена с анти­телом в клетках или исследуемом материале при определенной длине волны. Для получения эффекта антиген или антитело (гамма-глобулины) предварительно со­единяют (окрашивают) с флуорохромами. Явление И. позволяет определить лока­лизацию антигенов или антител в клетках исследуемых органов, т. е. проследить за диссиминацией антигена в организме, а также за интенсивностью синтеза ан­тител в органах. На И. основаны экспресс-методы люминесцентной диагностики возбудителей многих инфекционных заболеваний.

**Иммуноэлектрофорез** — физико-химический метод определения локализации антител к антигенам в различных фракциях сывороточных белков. Проводится в специальных аппаратах на стеклянных пластинках в агаровом, крахмальном и др. гелях. Вначале электрофорезу подвергают пробу сыворотки крови. Затем рядом с полосой электрофореза белков в специальную канавку наливают раствор антигена и создают условия для свободной диффузии. Через некоторое время в местах со­единения антител с антигенами образуются линии (дуги) преципитации, которые подвергаются учету и идентификации.

**Инактивация вирусов** — уничтожение инфекционной активности вирусов пу­тем повреждения генома физическим или химическим воздействием.

**Интерференция вирусов** — процесс, где развитие одной вирусной инфекции в результате действия интерферона препятствует развитию другой инфекции.

**Интерферон** — защитный белок, вырабатываемый клетками млекопитающих и птиц в ответ на заражение вирусами; неспецифичный фактор противовирусного иммунитета. Особенность интерферона — высокая видовая специфичность в отношении тканей организма хозяина (например, И. из клеток кур активен только в клетках кур) и отсутствие вирусной специфичности (один и тот же И. подавляет размно­жение различных вирусов). Используется для профилактики и лечения вирусных болезней, например гриппа.

**Инфекционность вирусов** — фенотипическое проявление генетически детерми­нированной способности вирусов к облигатному паразитизму в чувствительных к ним клетках хозяина. И. в. связана с его нуклеиновой кислотой и может иногда проявляться после введения изолированной вирусной

**Информационная РНК** — рибонуклеиновая кислота, синтезирующаяся на мо­лекуле ДНК в процессе синтеза белков и антител. Она полностью повторяет пос­ледовательность нуклеотидов ДНК, перенимая на себя генетическую информа­цию, после чего выходит из ядра и прикрепляется к рибосоме.

**Капсид** — белковая оболочка вириона, предохраняющая его нуклеиновую кис­лоту от внешних воздействий. Состоит из отдельных субъединиц, пространствен­ная укладка которых может иметь не только спиральную, но и кубическую, и сме­шанную симметрию. Структурные субъединицы состоят из одной или нескольких полипептидных цепей (15 000...20000). Морфологические единицы капсида — капсомеры (см.) выявляются при электронной микроскопии.

**Капсомеры** — морфологические единицы капсида, симметрические группы структурных единиц вириона. Капсомеры состоят из одной или нескольких асим­метричных белковых молекул.

**Кислота дезоксирибонуклеиновая (ДНК)** — высокополимерное соединение, со­стоящее из большого количества нуклеотидов. В состав ДНК входят пуриновые и пиримидиновые основания (аденин, гуанин, цитозин, тимин), дезоксирибоза и фосфорная кислота. ДНК содержится в ядрах клеток, в небольшом количестве — в митохондриях. Входит в состав бактерий и вирусов. ДНК является материаль­ным носителем наследственности. При изменении структуры некоторых участков ДНК (мутации) у вирусов и бактерий изменяются антигенные и иммуногенные свойства.

**Клеточный (тканевый) иммунитет** — понятие, включающее изменение в клетках тканей, участвующих в иммунологических реакциях, например при развитии ре­акции гиперчувствительности замедленного типа, и повышающих устойчивость к инфекции.

**Культура клеток** — клетки какой-либо ткани, выращиваемые в лаборатории в питательной среде.

**Культуры диплоидных клеток** — морфологически однородная популяция кле­ток, стабилизированная в процессе культивирования ин витро. Имеет ограничен­ный срок жизни, характеризующийся тремя фазами роста. Сохраняет в процессе пассирования кариотип, свойственный исходной ткани; популяция свободна от контаминантов и не обладает гуморогенной активностью при трансплантации хо­мячками.

**Куриный эмбрион —** оплодотворенное куриное яйцо, выдержанное в инкубато­ре. Применяется для культивирования некоторых вирусов (гриппа, оспы и др.). Заражение производится в аллантоисную полость (показателем размножения ви­руса гриппа является гемагглютинация) или на хорион-аллантоисную оболочку, где некоторые вирусы (оспа) образуют локусы.

**Летальная доза (ЛД)** — понятие, используемое для количественного выраже­ния вирулентности микроорганизмов. Наиболее часто в иммунологических иссле­дованиях пользуются определением ЛД5о или ЛДюо, т. е. величинами патогенного начала, способными вызывать гибель 50 или 100 % подопытных животных.

**Медленные вирусные инфекции** — ретровирусная инфекция овец висна-мэди с длинным инкубационным периодом. Виремия у экспериментально зараженных животных продолжается до 6 месяцев; вирус легко выделяется из лейкоцитов перифе­рической крови.

**Метод флуоресцирующих антител (МФА)** — метод иммунологической диагнос­тики, основанный на визуальном учете специфического взаимодействия флуорес­цирующих антител с гомологичным антигеном. Образующийся при этом комп­лекс «антиген + антитело», меченный флуорохромом, обнаруживают по характер­ному свечению в сине-фиолетовых лунах люминесцентного микроскопа. МФА можно использовать для быстрого обнаружения вирусов.

**Модификация вирионов** — изменение свойств вируса после прохождения одно­го цикла на определенном хозяине. М. в лучше всего изучена у фагов. Она конт­ролируется бактериальной клеткой, в которой фаг репродуцируется.

**Молекулярная гибридизация** — метод определения гомологии дезоксирибонук-леиновых кислот двух вирусов и более, клеток животных и др. Служит одним из тестов с целью установления родства между видами животных, штаммами микро­организмов при их классификации.

**Моноклональные антитела** — строго специфические антитела, способные выя­вить минимальные различия в химическом составе и пространственной конфигу­рации молекул. Каждое антитело является продуктом отдельного клона антителопродуцирующих клеток.

**Сборка, или созревание, вирионов** — предпоследняя стадия репродукции виру­сов. У РНК-вирусов вирусный геном ассоциируется с вирусспецифическими бел­ками вскоре после синтеза или в процессе его. У ДНК-вирусов С. в. состоит из ассоциации ДНК с внутренними белками и формирования сердцевин или нуклео-капсидов, соединения ДНК с капсидными структурами и перехода у сформиро­ванных неполных форм вириона некоторых вирусов в зрелые.

**Серологические реакции —** методы иммунодиагностики, разработанные для установления в сыворотке крови антител или антигена. С. р. являются специ­фическими и основаны на взаимодействии антигена и антитела. К С. р. отно­сятся реакции: агглютинации, связывания комплемента, преципитации, ней­трализации, гемагглютинации, а также методы определения групп крови и преципитационные пробы в судебно-ветеринарной экспертизе (см. Иммуноди­агностика).

**Серотипизация** — иммунологический метод идентификации возбудителей ин­фекционных болезней, основанный на реакции антиген—антитело. Для определе­ния точной антигенной структуры конкретного возбудителя используют сыворот­ки, содержащие специфические монорецепторные антитела.

**Симметрия вирусов** — упорядоченная укладка субъединиц в белковой оболоч­ке — капсид вириона. Вирусы бывают сферического (кубический) и спирального типа симметрии капсида. При кубической симметрии капсид состоит из многих капсомеров в виде икосаэдра. У палочкообразных вирусов спирального типа кап­сид имеет более одного витка, нуклеиновая кислота располагается между белко­выми субъединицами, повторяя ход белковой спирали.

**Структурная единица** — наименьшая функционально-эквивалентная единица капсида, может состоять из единственной полипептидной цепи или совокупности одинаковых или различных полипептидных цепей.

**Тельца-включения** — характерные морфологические изменения в клетках, за­раженных вирусами, разные по форме и размеру образования, появляющиеся в цитоплазме или ядре. Т.-в. локализуются избирательно, выявляются при окраши­вании клеток; при некоторых вирусах служат патогномоническими признаками, например при бешенстве (т. Бабеша—Негри), при оспе человека (т. Гвавньери), при оспе птиц (т. Боллингера), при ларинготрахеите птиц (т. Зейфрида), при бор-нарской болезни (т. Иоста—Дегена) и др..

**Титр вируса** — концентрация инфекционных единиц вируса в определенном объеме материала.

**Трансдукция** — процесс переноса генетических фрагментов ДНК от донорской бактериальной клетки к реципиентной, осуществляемый бактериальными вируса­ми (бактериофагами).

**Транскрипция** — процесс передачи информации от ДНК к РНК.

**Трансляция** — перевод информации с 4-буквенного кода (по числу нуклеоти-дов) РНК на 20-буквенный код (по числу аминокислот), осуществляемый в про­цессе синтеза белка при участии РНК и рибосом.

**Трансовариальный перенос вируса** — наблюдается при клещевом энцефалите, краснухе, вирусной диарее, ринопневмонии лошадей и т. д. Впервые был установ­лен при болезни овец и коз в Найроби. Е. Н. Павловским и его сотрудниками выработано учение о природной очаговости трансмиссивных болезней.

**Трансформация клеток вирусами** — изменение свойств животных клеток при заражении их онкогенными вирусами, в результате чего они превращаются в опу­холевые клетки, делящиеся бесконтрольно.

**Ультрацентрифуга** — центрифуга, работающая при числе оборотов нескольких десятков тысяч.

**Фаготерапия** — лечение больных инфекционной болезнью специфическим бактериофагом.

**Фенотип** — совокупность признаков, структур и свойств организма, сформи­ровавшихся в процессе его индивидуального развития и определяющих сущность данной особи.

**Фенотипическое смешивание** — образование «гибридного», смешанного по со­ставу белков вируса, проходящее при инфицировании клетки одновременно дву­мя различными вирусами.

**Флуоресцирующие антитела** — иммуноглобулины, меченные каким-либо флуорохромом. Флуоресцирующие антитела используют для экспресс-диагностики инфекций, а также для оп­ределения локализации антигена в тканях. Для этого тканевый срез обрабатывают флуоресцирующие антителами . и в месте взаимодействия их со специфическим антигеном наблюдают явле­ние флуоресценции.

**Химические единицы вириона** — отдельные полипептиды, образующие струк­турные (морфологические) единицы, капсомеры.

**Цитопатический эффект, цитопатогенное действие вируса (ЦПД)** —специфичес­кая морфологическая деструкция (разрушение) и функциональная патология за­раженных вирусами клеток в культурах.

**Цитоплазматические включения** — тельца-включения, появляющиеся в цито­плазме при некоторых вирусных инфекциях.

**Штамм** — культура микроорганизмов (популяция) одного вида с одинаковыми морфологическими и биологическими свойствами.

**Электронный микроскоп** — прибор, позволяющий изучать субмикроскопичес­кую структуру различных объектов, в том числе вирусов и даже некоторых моле­кул. В современных Э. м. первого класса максимальное увеличение составляет 800 тыс., а гарантируемое разрешаемое расстояние — 0,14 нм. Различают Э. м. просве­чивающего типа, сканирующие, эмиссионные и теневые.

**Список использованных источников**

1 Белоусова Р.В., Троценко Н.И. Практикум по ветеринарной вирусологии.- Москва: Колос, 2006.- 247 с.

2 Мырзабеков Ш.Б. Практикум по ветеринарной вирусологии.- Алматы,2006.- 147 с.

3 Мырзабекова Ш. Б.Общая вирусология. Учебник. Алматы. 1993.

4 Мырзабекова Ш. Б. Ветеринариялык вирусология. Алматы, 2004

5 СюринВ.Н., Фомина Н.В. Частная ветеринарная вирусология.  
Справочная книга. —М., Колос, 1979.

6 Сюрин В.Н.. Белоусова Р.В.. Фомина Н.В. - Ветеринарная  
вирусология. Учебник для с/х вузов. М., Колос, 1984.

7 Сюрин В.Н., Самуйленко Ф.Я., Соловьев Б.В., Фомина Н.В.  
Вирусные болезни животных. М., ВНИТБП. - 1988.

8 Сюрин В.Н., Белоусова Р.В. Фомина Н.В. Ветеринарная  
вирусология. Учебник для высших учебных заведений по  
специальности "Ветеринария", М. ВО "Агропромиздат", 1991.

9 Сюрин В.Н. и др. Диагностика вирусных болезней животных. —  
М.: «Агропромиздат» 1991.

10 Троценко Н.И. Общие принципы диагностики вирусных  
болезней животных. —М. —Московская вет.академия. —1981.

11 Троценко Н.И. Общие принципы обнаружения и  
идентификации вирусов животных. М., Московская вет.академия,  
2004.