

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

Т. В. ФЕДОРЕНКО

ВИРУСОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Лабораторный практикум

Благовещенск
Дальневосточный ГАУ
2022

УДК 619:576.858+60
ББК 28.3+30.16
Ф33

Рецензент – *Алена Владимировна Корнилова, кандидат биологических наук, доцент, доцент кафедры патологии, морфологии и физиологии Дальневосточного государственного аграрного университета*

*Рекомендовано к использованию в учебном процессе
методическим советом факультета ветеринарной медицины,
зоотехнии и биотехнологий
Дальневосточного государственного аграрного университета*

Федоренко, Т. В. Вирусология и биотехнология : лабораторный
Ф33 практикум / Т. В. Федоренко ; Дальневост. гос. аграр. ун-т. – Благовещенск : Дальневосточный ГАУ, 2022. – 136 с.

ISBN 978–5–9642–0559–3

Практикум написан в соответствии с рабочей программой дисциплины «Вирусология и биотехнология». Он содержит сведения по общей вирусологии. Даны методы работы с патологическим материалом и вирусами, лабораторными животными, развивающимися куриными эмбрионами, культурами клеток. Рассмотрены методики постановки серологических реакций, обоснование к решению диагностических задач. Приведены список рекомендуемой литературы, тестовые задания. Издание предназначено для студентов 3 курса очной формы обучения по направлению 36.03.01 «Ветеринарно-санитарная экспертиза» и для студентов 4 курса специальности 36.05.01 «Ветеринария».

УДК 619:576.858+60
ББК 28.3+30.16

ISBN 978–5–9642–0559–3

© Федоренко Т. В., 2022
© ФГБОУ ВО Дальневосточный
государственный аграрный университет, 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	4
Тема 1. Структура вирусологической и биотехнологической лабораторий, и правила работы в них.....	5
Тема 2. Схема лабораторной диагностики вирусных болезней	21
Тема 3. Получение и обработка патологического материала.....	28
Тема 4. Лабораторные животные и их использование в вирусологии	35
Тема 5. Идентификация вирусов в патологическом материале путем обнаружения телец-включений	40
Тема 6. Куриные эмбрионы и их использование в вирусологии	45
Тема 7. Культуры клеток и их использование в вирусологии.....	52
Тема 8. Лабораторная диагностика вирусных болезней с применением реакции иммунной флуоресценции.....	60
Тема 9. Лабораторная диагностика вирусных болезней с применением реакции иммуноферментного анализа	71
Тема 10. Лабораторная диагностика вирусных болезней с применением реакции диффузионной преципитации.....	75
Тема 11. Лабораторная диагностика вирусных болезней с применением реакции нейтрализации	80
Тема 12. Лабораторная диагностика вирусных болезней с применением реакции непрямой гемагглютинации	86
Тема 13. Лабораторная диагностика вирусных болезней с применением реакции торможения гемагглютинации.....	91
Тема 14. Лабораторная диагностика вирусных болезней с применением полимеразной цепной реакции	96
Тема 15. Получение вакцин, сывороток	100
Тема 16. Решение диагностических задач	109
Тестовые задания.....	125
Список рекомендуемой литературы.....	132
Приложение А. Отбор патологического материала для диагностики некоторых вирусных болезней	133
Приложение Б. Схема получения вакцины	134
Приложение В. Схема получения сывороток.....	135

ВВЕДЕНИЕ

Вирусология – одна из основных биологических наук, которая занимается изучением вирусов. Вирусы – мельчайшие микроорганизмы, стоящие на границе между живым и неживым, и неспособные к проявлению каких-либо признаков живого вне клеток. Вирусы остаются одними из главных возбудителей многих инфекционных болезней. Современный ветеринарный врач должен знать не только клинико-патологическую сторону болезней, но и иметь четкое представление о вирусах, их свойствах, методах лабораторной диагностики и особенностях постинфекционного и поствакцинального иммунитета.

Биотехнология – одна из наиболее быстро развивающихся областей науки, посвященная способам получения целевых продуктов с помощью биосинтеза, управляемого параметрами среды или генно-инженерными манипуляциями, либо сочетанием этих воздействий. К объектам биотехнологии относятся: вирусы, бактерии, водоросли, лишайники, грибы, водные растения, клетки растений и животных.

Цель дисциплины – дать представление о принципах работы в вирусологической и биотехнологической лаборатории с соблюдением правил работы в ней, а также о методах и методиках лабораторной диагностики вирусных болезней.

Планируемыми результатами обучения по дисциплине выступают:

ОПК-1. *Способен определять биологический статус, нормативные общеклинические показатели органов и систем организма животных, а также качества сырья и продуктов животного и растительного происхождения.*

ОПК-2 *Способен осуществлять профессиональную деятельность с учетом влияния на организм животных природных, социально-хозяйственных, генетических и экономических факторов.*

ОПК-6 *Способен идентифицировать опасность риска возникновения и распространения заболеваний различной этиологии.*

ТЕМА 1. СТРУКТУРА ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИЙ, И ПРАВИЛА РАБОТЫ В НИХ

Цель занятия – ознакомиться с планировкой и оборудованием вирусологической и биотехнологической лабораторий, документацией, правилами и техникой безопасности при работе в лабораториях.

Задания:

1) изучить основы организации вирусологической лаборатории и правила работы в ней; ознакомиться с вирусологической лабораторией кафедры и ее основным оборудованием; изучить правила работы с вирусосодержащим материалом;

2) изучить основы организации биотехнологической лаборатории и правила работы в ней.

Краткие теоретические сведения

Вирусологическая лаборатория используется для проведения лабораторных диагностических исследований на вирусные инфекции, контроля состояния и напряженности специфического постинфекционного и поствакцинального противовирусного иммунитета, и участия в профилактических мероприятий с вирусными заболеваниями.

Структура вирусологической лаборатории зависит от задач и особенностей ее деятельности. Как правило, вирусологические лаборатории, независимо от специализации, должны размещаться в чистых светлых помещениях с необходимым оборудованием и мебелью. Их следует изолировать от других лабораторий (бактериологических, токсикологических и др). Независимо от характера выполняемой работы, в них необходимо поддерживать рабочую чи-

стоту. Кроме ежедневной обычной уборки, помещения периодически обрабатывают растворами дезинфицирующих веществ (карболовой кислоты, лизола, хлорной извести, хлорамина и т. д.), подвергают ультрафиолетовому облучению. Комнаты, предназначенные для работы с вирусами, должны быть хорошо освещены и состоять из двух отделений, разобщенных стеклянной перегородкой: предбоксника и бокса.

В боксах, организованных по типу операционных, над рабочим столом, покрытым пластиком или нержавеющей сталью, на расстоянии 50–70 см от поверхности устанавливают бактерицидные лампы БУВ-30 или БУВ-60 для уничтожения инфекционных агентов. Дополнительно в боксе желательно иметь передвижную кварцевую лампу типа ПРК-4. У входа в бокс должен лежать коврик, пропитанный дезинфекционным раствором. В предбокснике в боксах должны быть сменные тапочки или сменная обувь, стерильные халаты, шапочки, маски, которые одевают перед работой.

Боксы и предбоксники, кроме ежедневной влажной дезинфекционной обработки, необходимо облучать бактерицидными лампами в течение 30–40 мин. перед началом и после работы. В предбокснике также можно размещать дополнительное оборудование: термостаты, холодильники, лабораторные центрифуги, микроскопы, водяную баню и др.

В боксе, кроме рабочих столов и стульев, должно быть все необходимое для работы: стерилизаторы для инструментов; банки с дезинфекционными растворами для отработанных пипеток; бак с дезинфекционным раствором для сбора отработанных материалов; баночки со спиртом, йодом; штативы для пробирок; пробирки с бульоном для проверки бактериального загрязнения; стерильные пипетки, ступки и т. д.

Потолок и стены лабораторных комнат покрывают масляной краской (стены на 1,5 м от пола можно выложить кафельными плитками), пол – лино-

леумом или кафельной плиткой. Лаборатория должна иметь 5–6 комнат; отдельный вход для сотрудников и для посетителей с тамбуром; обязательны гардероб и душевая.

Регистрацию поступающего на исследование патологического материала проводят в приемной. Пол в ней должен быть бетонный, стены покрыты масляной краской или керамической плиткой; окна заделаны железными решетками. При входе необходимо положить коврик с дезинфицирующим раствором. В приемной размещают несколько столов, обитых оцинкованной жестию; бак с дезинфицирующим раствором (чаще всего с 3-процентным раствором хлорамина или 5-процентным раствором фенола).

В комнате для предварительной обработки материала проводят вскрытие трупов и отбор материала для дальнейшего исследования. В ней должны быть бокс с предбоксом, соединенный окном с виварием для инфицированных животных. В боксе разбирают поступившие пробы, готовят и фиксируют мазки и т. д. В комнате также должны быть столы для вскрытия трупов и обработки материала. На столе для вскрытия трупов помещают инструментарий (ножницы, пинцеты, скальпели, корнцанги), эмалированный тазик, сосуды с дезинфицирующими растворами, стерильную посуду для сбора материала.

Комнату для вирусологических исследований оборудуют: термостатами, холодильниками, центрифугами, весами различных типов, электроплитками, фильтрами, насосами, водяными банями, электромагнитными мешалками и др. Лабораторию снабжают в достаточном количестве биксами, фильтрами Зейтца, ящиками для хранения сред, эмалированной и стеклянной посудой – матрацами, флаконами, колбами разных объемов, градуированными пипетками, микропипетками, цилиндрами и стаканами; серологическими, бактериологическими и центрифужными пробирками, ампулами и резиновыми пробками разных размеров; металлическими штативами для пробирок; карандашами по стеклу; фильтровальной бумагой, лейкопластырем и т. д.

На столах для определенных операций за каждым работающим закрепляют рабочее место. Здесь размещают нужную аппаратуру, соответствующие дезинфицирующие средства, краски, реактивы. На операционном столе необходимы микроскоп, набор инструментов (пинцеты, ножницы, скальпели и др.), вата, пастеровские пипетки, стерильные и обезжиренные покровные и предметные стекла, физраствор. При работе с куриными эмбрионами должны быть подставки для яиц, овоскопы, инструменты для вскрытия (ножницы, глазные пинцеты).

В автоклавной необходимо иметь два автоклава: для чистых материалов (где стерилизуют посуду, питательные среды, инструменты, обезвреживают заразный материал) и для инфицированных (бак для сбора инфицированного материала). Допускается наличие сушильных шкафов, дистилляторов, столов и шкафов для стерильной посуды.

Моечная предназначена для мытья посуды и приборов. В ней должна быть машина для посуды и белья, сушильные шкафы и т. д. Посуду, пипетки и инструменты, загрязненные инфицированным материалом, моют только после стерилизации.

Виварием называется помещение, используемое для выращивания и содержания лабораторных животных. В виварии имеется карантинное отделение, комнаты для экспериментальных и здоровых животных, мытья и дезинфекции клеток, инвентаря и спецодежды; кухня для приготовления пищи; кладовая, фуражная; трупосжигательная печь и др. Все помещения вивария должны быть изолированы друг от друга и иметь самостоятельные входы с дезинфекционными ковриками. Кроме того, они должны быть непроницаемыми для грызунов и различных насекомых. Виварий должен быть теплым, светлым (с источником дневного света) и сухим. В холодное время года здесь поддерживают температуру 12–20 °С.

Лабораторных животных содержат в клетках. В одной клетке может быть 1–2 кролика, 5–6 морских свинок, 8–10 крыс, 15–20 мышей. На каждой клетке с животными вывешивают паспорт, где отмечают дату их поступления в виварий, массу. В паспорте на клетках с подопытными животными дополнительно отмечают дату заражения и вид вирусосодержащего материала.

Чистку клеток и вивария делают ежедневно, используя мыльно-карболовый раствор. После уборки тщательно моют руки и обрабатывают их 2-процентным раствором хлорамина.

Сотрудники вирусологической лаборатории обязаны соблюдать следующие правила, предупреждающие попадание бактерий и плесневых грибов в исследуемый материал и возможность внутрилабораторных заражений персонала и распространения инфекции:

1. Работать разрешается в специальной одежде – халате и шапочке. При работе с особо опасным материалом дополнительно одевают резиновые перчатки, марлевую маску и защитные очки. Обязательно меняют обувь. В виварии во время мытья посуды и уборки на халат надевают передники, а на ноги – резиновые сапоги.

2. Запрещается выходить за пределы лаборатории в халатах или надевать верхнюю одежду на халат.

3. В лаборатории запрещается курить и принимать пищу.

4. Не допускаются хождение, разговоры во время работы.

5. Весь материал, поступающий в лабораторию на анализ, должен рассматриваться как инфицированный.

6. Банки следует обтирать снаружи дезинфицирующим раствором и ставить их на подносы или кюветы.

7. Переливание жидкостей, содержащих вирусы, производят над сосудом, наполненным дезинфекционным раствором.

8. В случае попадания заразного материала на халат, руки, стол, обувь и др. надо сообщить об этом заведующему лабораторией (в учебных заведениях – преподавателю) и немедленно произвести под его контролем дезинфекцию. При подозрении на заражение необходимо обратиться к врачу.

9. Зараженный материал подлежит обязательному уничтожению (автоклавирование, сжигание), по возможности в тот же день. Инструменты, а также поверхность рабочего стола после работы сразу же дезинфицируют.

10. При работе с пипетками для разлива жидкого инфицированного материала пользуются резиновыми баллончиками (грушами) небольшого объема.

11. В журнале регистрации ежедневно делают записи относительно использованного заразного материала и его уничтожения.

12. Запрещается выносить из лаборатории оборудование, инвентарь, материалы и т. д. без предварительной дезинфекции их на месте.

13. Пипетки, предметные и покровные стекла и другую посуду, бывшую в употреблении, обеззараживают, погружая в 5-процентный раствор лизола, фенола или серной кислоты, которые всегда должны быть на столах.

14. Запрещается оставлять на рабочих столах бактериологические чашки, пробирки и другую посуду с заразным материалом.

15. По окончании работы рабочее место приводят в порядок и тщательно дезинфицируют. Вирусосодержащий материал, необходимый для дальнейшей работы, ставят на хранение в сейф-холодильник и опечатывают. Руки тщательно дезинфицируют мыльным спиртом, 70-процентным спиртовым раствором и др. Лабораторию закрывают и опечатывают.

Для всех вирусологических лабораторий установлен единый порядок обращения с вирусами, предусматривающий правила их хранения, регистрации, передачи от одного сотрудника другому внутри лаборатории и за ее пределы.

Культуру вирусов хранят в холодильнике при температуре от минус 20 до минус 70 °С под замком с пломбой или печатью. Все пробирки и пенициллиновые флаконы, закрытые резиновыми пробками, должны иметь этикетки из лейкопластыря с указанием вида вирусов, индивидуального номера штамма и стабилизирующей среды, в которой он находится. Лучшим способом сохранения вирусов является лиофилизация.

В вирусологической лаборатории должна быть следующая документация:

1. Инвентарная книга музейных штаммов вирусов.
2. Журнал учета движения вирусосодержащего материала в лаборатории.
3. Журнал учета стерилизации и уничтожения инфицированного материала.
4. Журнал учета зараженных подопытных животных.
5. Журнал вирусологических исследований (экспертиз).
6. Журнал учета выделяемых вирусов.

Биотехнологическая лаборатория. Любые лабораторные микробиологические исследования необходимо проводить, соблюдая все правила предосторожности и помня о том, что любой изучаемый объект может таить в себе угрозу для здоровья человека, угрозу экологическому равновесию. Поэтому необходимо работать так, чтобы не навредить не только себе, но и изучаемому объекту – не обсеменить его какими-либо микробами из окружающей среды.

Территория, на которой располагаются производственные помещения, должна быть отделена санитарно-защитной зоной от жилой застройки или от объектов промышленной застройки. Величина санитарно-защитной зоны определяется Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Территория, на которой расположены здания или любые другие сооружения, относящиеся к производству микробиологической и биотехнологической

продукции, должна иметь ограждение, а также зеленую зону по периметру ограждения. Территория между производственными зданиями должна быть заасфальтирована. Должны быть приняты меры, исключающие возможность попадания в производственные помещения грызунов и насекомых.

Территория производства должна тщательно охраняться, ограждение должно иметь охранную сигнализацию, для входа на территорию производства необходимо использовать пропускную систему.

Для безопасного производства микробиологической и биотехнологической продукции должно быть предусмотрено изолированное размещение технологических помещений: биофабрика должна иметь отдельные здания или отдельные этажи одного здания с отдельным входом. Производственные помещения должны использоваться строго по назначению.

Производственные помещения должны иметь: гладкие внутренние поверхности (стены, потолки, полы, окна, двери). Все поверхности должны быть без трещин, выступов или других строительных деталей, затрудняющих доступ для уборки и обработки дезинфицирующими средствами. Все стыки между стенами, стенами и полом должны иметь закругленную форму, удобную для уборки и дезинфекции. Материалы для отделки стен, потолков, полов должны быть не горючими и устойчивыми к обработке дезинфицирующими средствами. Окна должны быть герметичными и обеспечивать достаточную освещенность помещений.

Производственные помещения должны иметь разделение на *заразную зону*, где осуществляется работа с микроорганизмами I–IV групп патогенности и их хранение, и на *чистую зону*, где проводятся работы с продукцией после прохождения процедуры инаktivации и контроля на специфическую безопасность.

В *чистой зоне* должны располагаться: гардероб для верхней одежды; подсобные помещения – препараторская, моечная, помещение для подготовки

растворов и питательных сред; стерилизационная; холодильная камера; комнаты для персонала; помещения для хранения реагентов и питательных сред; помещения для уборочного инвентаря.

В *заразной зоне* должны располагаться помещения: боксы для работы с инфицированными культурами клеток и производственными штаммами микроорганизмов, для подготовки посевных материалов, для хранения микроорганизмов, выращивания биомассы; помещения для инактивации; автоклавная для обеззараживания отходов производства.

Помещения названных зон должны быть разделены специальным помещением – санпропускником, в котором должен быть комплекс комнат: комната для снятия личной одежды, обуви; туалет; душевая; комната для переодевания в спецодежду и обувь. Двери санпропускника должны быть обеспечены звуковой и световой сигнализацией.

Зона отдыха и приема пищи должна находиться вне зоны производственных помещений.

В производственных помещениях трубы отопления, водопровода, провода электроснабжения, радио- и телефонной связи должны быть убраны в потолочные и настенные покрытия. Настенные или потолочные светильники, лампы ультрафиолетового облучения должны быть закрытыми и доступными для очистки.

В *заразной зоне* производственных помещений не должно быть источников воды – все процедуры, связанные с применением воды, должны проводиться в подсобных помещениях *чистой зоны* производства.

В производственных помещениях должна находиться только необходимая лабораторная мебель и оборудование. Мебель и оборудование должны иметь гладкие и доступные для уборки поверхности, должны быть закреплены за определенным технологическим участком и использоваться только по назначению.

Розлив отдельных наименований продукции должен проводиться в изолированных помещениях, которые предназначены для определенного вида продукции. Участок маркировки, фасовки и упаковки препаратов должен находиться рядом с холодильной камерой, в которой продукция хранится до завершения контроля и выдачи разрешения отделом контроля качества на маркировку, фасовку и упаковку. После завершения маркировки, фасовки и упаковки, продукция должна храниться на складе готовой продукции при соответствующем температурном режиме. Для обеспечения безопасности хранения продукции двери складских помещений должны иметь замки и опечатываться. Доступ посторонних лиц в эти помещения должен быть запрещен. За каждым складским помещением должно быть закреплено лицо, ответственное за движением и перемещением продукции внутри склада, за выдачей продукции в соответствии с документами на отгрузку. В организациях с небольшим объемом выпускаемой продукции разрешается ее хранение в холодильниках с соблюдением всех установленных режимов.

При биотехнологических лабораториях предусмотрены помещения для содержания лабораторных животных или животных-продуцентов биологических препаратов (виварии).

Самая простая биотехнологическая лаборатория состоит минимум из трех помещений. Это **бокс**, где ведутся стерильные работы; **комната для приготовления питательных сред**, хранения химикатов, оборудования и прочих вспомогательных мелочей; **автоклавная**.

Стерильные работы можно проводить в специальном помещении – микробиологическом боксе или же использовать ламинар-боксы. В любом случае, полы и стены комнаты, где ведутся стерильные работы, должны быть моющимися (в идеале – кафельные) и не содержать материалы – «пылесборники». Помещение, где ведутся работы с культурами тканей и клеток, необходимо

периодически стерилизовать ультрафиолетовыми лампами (кварцевать), поэтому наличие любой растительности исключено. Для работы с культурами животных клеток требования к стерильности более жесткие по сравнению с растительными культурами, поскольку вероятность контаминации выше. Не рекомендуется в одних и тех же боксах вести работы с микробиологическими объектами и культурами клеток. Микроорганизмы более устойчивы к внешним факторам, и простерилизовать после работы с ними помещение гораздо труднее, особенно это касается работ с грибами.

СО₂-инкубатор (термостат). При выращивании клеток в посуде типа чашек Петри и пластиковых планшетах, клеткам необходим СО₂ (в объеме 5 %). При культивировании клеток в сосудах Карреля, заткнутых пробками, СО₂ не нужен, его отключают. Термостат способен поддерживать определенную температуру, которую можно задавать исходя из условий эксперимента (рис. 1).



Рисунок 1 – Термостат

Ламинар-бокс. Выбор ламинарного бокса определяется тем, какой тип биологической безопасности (защиты) необходим в планируемой работе, то

Тема 1. Структура вирусологической и биотехнологической лабораторий, и правила работы в них

есть что необходимо защищать. В зависимости от этой задачи ламинарные боксы делятся на боксы для защиты продукта (всегда имеют фильтр высокой очистки на входе) и боксы для защиты оператора и окружающей среды.

Боксы биологической безопасности подразделяются на три класса и всегда имеют хотя бы один фильтр высокой очистки на выходе (рис. 2, 3, 4).



Рисунок 2 – Бокс биологической безопасности первого класса



Рисунок 3 – Бокс биологической безопасности второго класса



Рисунок 4 – Бокс биологической безопасности третьего класса

Бокс биологической безопасности первого класса создает защиту оператора, обеспечивая фильтрацию воздуха на выходе из рабочей зоны (рис. 2). Бокс биологической безопасности второго класса обеспечивает фильтрацию воздуха как на входе, так и на выходе из рабочей зоны, создавая стерильные условия работы с продуктом (рис. 3). Бокс биологической безопасности третьего класса предназначен для работы с особо опасными патогенами (рис. 4). Он имеет изолированную герметичную рабочую зону с перепадом давления, доступ в рабочую зону осуществляется с помощью перчаток и специального шлюза.

В микробиологических боксах проводят влажную уборку с дезинфицирующими агентами. Для надежности стерилизации перед началом работы помещение лаборатории и внутреннее пространство ламинара облучают ультрафиолетовыми лучами. Такое облучение (260 нм) – наиболее часто используется в лабораториях для стерилизации помещений, настольных боксов. При длительном воздействии эти лучи вызывают гибель всех бактерий.

Бактерии погибают очень быстро, а споры грибов медленнее, поэтому в боксах устанавливают бактерицидные лампы (БУФ-15), которые включают на 30 минут за один час до работы. Кроме того, рекомендуется проводить профилактическое облучение боксов в течении двух часов.

Непосредственно перед работой необходимо протереть внутренние поверхности ламинар этиловым спиртом, разложить в нем необходимые инструменты и материалы: спирт, горелка, спички, инструмент, посуда. Такая подготовка к работе необходима потому, что даже осевшая на поверхность стола пыль является потенциальным источником заражения культуры.

При работе все операции следует проводить в непосредственной близости от зараженной горелки, чтобы обеспечить максимальную защиту растворов от заражения. Кисти рук должны находиться между горелкой и задней стенкой ламинара.

Человек, приступающий к работе, должен быть в чистом халате, шапочке, маске. Перед работой в ламинаре необходимо обработать руки спиртовым ватным тампоном. После этой обработки не следует выносить руки за пределы ламинара (если это случилось, то необходимо повторно обработать руки для исключения попадания микроорганизмов в стерильную зону).

Хотя работа требует максимальной стерильности, использование резиновых перчаток может быть опасно (может произойти их возгорание). При стерильной работе используются горючие жидкости.

Автоклав – прибор, состоящий из котла, в который наливают воду, и внутреннего сосуда, в который на решетках устанавливаются предметы для стерилизации. Создается определенное давление (в одну атмосферу), пар под давлением стерилизует предметы.

Вынесение автоклавов в отдельную комнату продиктовано требованиями безопасности, поскольку процесс стерилизации идет под давлением. Современные модели автоклавов более надежны и безопасны, с ними могут работать и необученные люди, при этом специальных комнат не требуется.

Автоклавы бывают: вращающиеся, качающиеся, горизонтальные, вертикальные, и колонные (рис. 5).



Рисунок 5 – Горизонтальный автоклав

Помещение для стерилизации (автоклавная) должно быть оборудовано приточно-вытяжной вентиляцией и иметь канализационный слив для отвода конденсата из автоклава. Посуду, халаты, вату, дистиллированную воду, питательные среды стерилизуют в автоклавах под давлением пара 1–2 атмосферы и температуре 120 °С в течении 20–60 минут, в зависимости от объема стерилизуемого материала. Колбы, штативы со средой, пробирки перед автоклавированием заворачивают в целлофановую бумагу, либо помещают в биксы. Металлические инструменты автоклавировать нельзя, так как под воздействием пара образуется ржавчина. Поэтому их стерилизуют сухим жаром в специальных жаровых шкафах с температурой 150–250 °С в течении 1–2 часов.

Дополнительное оборудование: дистилляторы, сушильные шкафы, вытяжные шкафы, шкафы для хранения чистой посуды и инструментов и др.

Контрольные вопросы

1. Расскажите о технике безопасности и правилах работы в вирусологической лаборатории.
2. Расскажите о технике безопасности и правилах работы в биотехнологической лаборатории.
3. Расскажите о правилах работы с вирусосодержащим материалом.
4. Расскажите об основных методах консервации вирусов.
5. Расскажите об основном оборудовании, используемом в вирусологической и биотехнологической лабораториях.

ТЕМА 2. СХЕМА ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Цель занятия — ознакомиться с порядком и методами проведения диагностических исследований при вирусных заболеваниях.

Задания:

- 1) ознакомиться с экспресс методами диагностики вирусных болезней, их значением;
- 2) рассмотреть методику выделения вируса в чувствительных биосистемах и его идентификацию;
- 3) изучить принцип ретроспективной диагностики и его особенности.

Краткие теоретические сведения

Лабораторная диагностика вирусных болезней включает:

- 1) *экспресс-методы;*
- 2) *вирусологические методы;*
- 3) *серологические (ретроспективная диагностика).*

Зарисуйте схему лабораторной диагностики вирусных болезней (рис. 6).

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

Для обнаружения вирусных антигенов в патологическом материале используют наиболее чувствительные методы, так как их концентрация в нем обычно низкая. Наибольшее распространение получила **реакция иммунофлуоресценции (РИФ)**. Для этого на мазки-отпечатки или срезы из патматериала наносят меченные флуорохромами гипериммунные сыворотки, при этом образуются светящиеся иммунные комплексы. Препараты просматривают с помощью люминесцентного микроскопа.

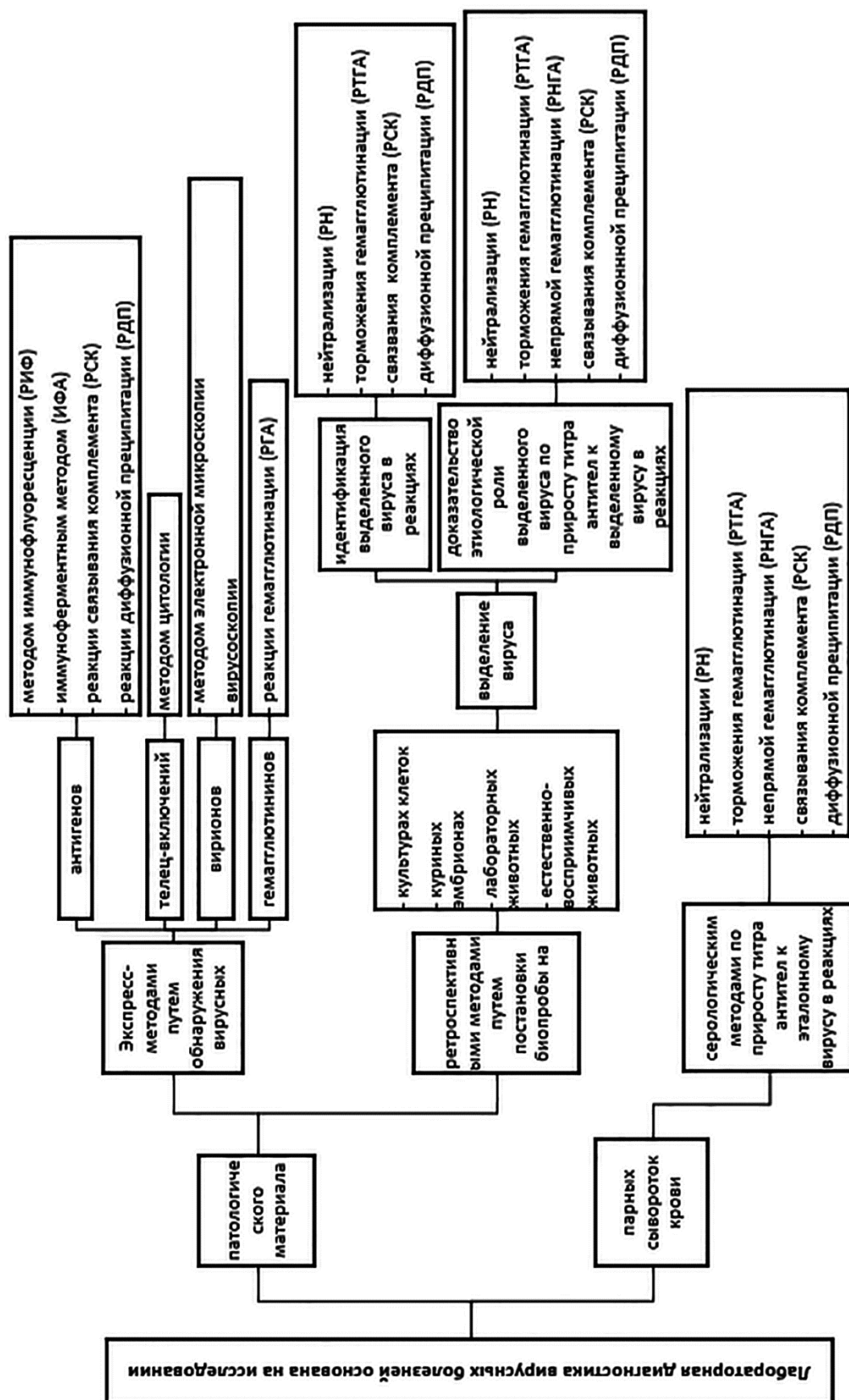


Рисунок 6 – Схема лабораторной диагностики вирусных болезней

Этот метод флуоресцирующих антител отличается быстротой и очень высокой чувствительностью. Однако его результаты требуют подтверждения другими методами из-за возможного неспецифического свечения.

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

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

Вирусологические методы предназначены для обнаружения активных форм вируса путем его выделения на живых биологических системах (культурах клеток и тканей, развивающихся куриных эмбрионах и лабораторных животных). Для этого из патологического материала делают 10-процентную суспензию на стерильном физиологическом растворе (кислотность 7,2–7,4). Затем освобождают ее от крупных частиц путем центрифугирования в течение 20–30 минут при 2 000–3 000 оборотах в минуту. Для подавления бактериальной микрофлоры к суспензии добавляют смесь антибиотиков (обычно пенициллин и стрептомицин по 200–1 000 ЕД каждого на 1 мл жидкости и нистатин) или для очистки пропускают ее через бактериальные фильтры. Эффективность такой обработки суспензии контролируют с помощью посевов ее на специальные питательные среды (для аэробов и анаэробов).

Полученной и обработанной таким образом суспензией заражают живые биологические системы и регистрируют появление у них признаков репродукции вируса, что служит показателем наличия вируса в патматериале. Однако вирус не всегда проявляет свое действие в первом пассаже и иногда требуется провести 2–3 *слепых* пассажа, чтобы вирус адаптировался к биологической системе и накопился в достаточном количестве для проявления своего действия.

Прежде всего заражают культуры клеток. Для этого в пробирки, флаконы или матрасы с выросшим монослоем клеток вносят небольшое количество суспензии для осуществления контактирования на 80–90 минут (для адсорбции и проникновения вируса в клетки). Затем добавляют поддерживающую питательную среду, которая не обеспечивает дальнейшего размножения клеток. Флаконы, пробирки и матрасы помещают в условия, благоприятные для инкубации. Происходит репродукция вируса в клетках. Пораженные вирусом клетки погибают, разрушаются; новое поколение вирусов выходит в культуральную жидкость, и происходит заражение новых клеток, из них – в следующие; и так до тех пор, пока есть живые клетки.

Обнаружение вируса в культуре клеток производят под малым увеличением светового микроскопа по цитопатическому действию (ЦПД) или цитопатическому эффекту (ЦПЭ). ЦПД – это любые изменения (дегенерация, гибель) клеток под влиянием размножающегося в них вируса. Формы ЦПД разнообразны – от едва заметных изменений в цитоплазме до полного распада клеток на фрагменты. Обнаружение вируса, обладающего гемагглютинирующими свойствами, в культуре клеток возможно методом гемадсорбции.

Большое значение имеет другая биологическая система для выделения вирусов – живые куриные эмбрионы 5–13-суточного возраста. Вирусы в них могут репродуцироваться в клетках самого зародыша, на хорион-аллантоисной оболочке, в стенках желточного мешка, накапливаясь в этих же структу-

рах и в жидкостях аллантоисной и амниотической полостей. Признаками размножения вируса в куриных эмбрионах являются их гибель и патологоанатомические изменения на эмбриональных оболочках и структурах. Куриные эмбрионы чувствительны к большинству вирусов птиц и некоторым вирусам млекопитающих (грипп, оспа, чума и др.).

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

При отсутствии моделей лабораторных животных при некоторых вирусных болезнях для выделения вирусов используют естественно-восприимчивых животных.

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

Большое значение для идентификации выделенного вируса приобрела **реакция связывания комплемента (РСК)** с разными разведениями известных сывороток и несколькими дозами комплемента; предпочтительно на холоде (18–20 часов при температуре от 2 до минус 4 °C).

Реакция нейтрализации (РН) обладает высокой специфичностью. Она наиболее универсальна и обеспечивает достоверные результаты при идентификации выделенных вирусов. Вместе с тем постановка реакции нейтрализации отличается трудоемкостью. Вирусы являются антигенами, так как их белковая оболочка вызывает выработку специфических антител. Антитела накапливаются в основном в сыворотке крови. Они способны соединяться в комплекс антиген + антитело только со своим антигеном. Если антиген – инфекционный агент (вирус), антитела его нейтрализуют: в этом состоит биологическая роль антител. Взаимодействие антител со своими антигенами возможно не только в живом организме, но и в пробирке. На этом и основаны серологические реакции (от лат. *serum* – сыворотка). Если взятая пара АГ (антиген) и АТ (антитело) гомологичны или соответствуют друг другу, то в пробирке они образуют комплекс АГ+АТ. Это позволяет обнаружить по известному антителу неизвестный антиген. А если брать сыворотку в разведениях, то можно установить и титр антител в ней.

Идентификация неизвестного антигена возможна также путем испытания его с различными антителами. Широкое распространение нашли следующие **серологические реакции**: 1) *нейтрализации (РН)*; 2) *торможения гемагглютинации (РТГА)*; 3) *непрямой гемагглютинации (РНГА)*; 4) *связывания компонента (РСК)*; 5) *диффузной преципитации (РДП)*; 6) *торможения гемадсорбции (РТГАд)*; 7) *иммунофлюоресценции (РИФ)*. Все эти реакции различаются между собой методом определения образовавшегося комплекса антиген + антитело или тем, что комплекс вообще не образовался.

При серологической (ретроспективной) диагностике исследованиям подлежат сыворотки больных животных. Обычно используют парные сыворотки, для получения которых от каждого животного кровь берут дважды с интервалом в 2–3 недели: в начале, то есть в острой стадии, и в конце болезни (в период реконвалесценции). Сроки взятия крови варьируют в зависимости

от особенностей течения болезни. Взятие крови и получение из нее сыворотки осуществляют в асептических условиях, так как сыворотки должны быть стерильными. До исследования сыворотки хранят в пробирках под пробками в холодильнике или в замороженном состоянии.

Контрольные вопросы

1. Какие методы применяются в лабораторной диагностике вирусных болезней?
2. Какие методы включает ретроспективная диагностика?
3. В чем заключается метод парных сывороток крови?
4. Какие серологические реакции используют в диагностике вирусных болезней?

ТЕМА 3. ПОЛУЧЕНИЕ И ОБРАБОТКА ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Цель занятия — ознакомиться с правилами и техникой взятия, упаковки и транспортировки, сохранения и подготовки вирусосодержащего материала для заражения лабораторных животных, куриных эмбрионов, культуры клеток.

Задания:

- 1) изучить правила получения и подготовки патологического материала для исследований, заполнить таблицу 1;
- 2) провести отбор смывов слизистых оболочек, патологического материала для вирусологического исследования от животных вивария;
- 3) подготовить отобранный материал для вирусологических исследований;
- 4) поставить бактериологический контроль вирусосодержащей суспензии.

Краткие теоретические сведения

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

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

Общий принцип взятия патматериала основан на четком представлении

о патогенезе предполагаемой инфекции и преимущественной локализации вируса в тех или иных органах или тканях, а также на знании тропизма вируса, входных ворот, путей распространения в организме, путей и сроков выделения из организма (приложение А). Заполните таблицу 1.

Таблица 1 – Отбор патологического материала для диагностики некоторых вирусных болезней

Материал	Болезнь												
	бешенство	везикулярный стоматит	ящур	болезнь Ауески	классическая чума свиней	африканская чума свиней	ротавирусная инфекция	инфекционный ринотрахеит	риноневмония лошадей	инфекционный гастроэнтерит свиней	болезнь Ньюкасла	вирусный гепатит утят	инфекционный бронхит кур
Носовые выделения													
Содержимое везикул, пустул, афт													
Слюна													
Кровь													
Фекалии													
Поражения конъюнктивы													
Кожные поражения													
Мозг													
Легкие													
Печень													
Лимфоузлы													
Спинно-мозговая жидкость													
Селезенка													
Почки													
Слизистая оболочка кишечника													
Кусочки новообразований													
Кусочки бронхов, трахеи													

При респираторных инфекциях для выделения вирусов из организма больного животного берут носоглоточные смывы, мазки из носа и глотки; для выделения энтеровирусов – кал; дермотропных агентов – свежие поражения кожи; при ящуре и оспе – стенки афт, содержимое везикул, пустул; при чуме – кровь. Мазки с конъюнктивы, слизистой оболочки носа, задней стенки глотки, прямой кишки и клоаки у птиц берут стерильными ватными тампонами, которые погружают в пенициллиновые флаконы или пробирки, содержащие 3–5 мл соответствующей жидкости (раствор Хенкса или среда для культур клеток с антибиотиками – пенициллином или стрептомицином из расчета по 500 ЕД на 1 мл среды).

Вытекающую изо рта слюну можно собирать в пробирку. Если ее выделяется мало, то слюной пропитывают стерильный тампон на палочке, который затем помещают в пробирку с небольшим количеством физиологического раствора. Мочу собирают с помощью катетера в стерильную посуду. Фекалии берут из прямой кишки с помощью шпателя или палочки, и затем помещают в стерильную пробирку или пенициллиновый флакон. Стенки афт, корочки с поверхности кожи снимают пинцетом. Спинномозговую жидкость берут асептично с помощью пункции. Для ретроспективной диагностики от каждого животного берут кровь дважды: первый раз в начале или в разгар болезни, второй раз – через 2–3 недели после первого, в зависимости от инфекции. Сыворотки крови используют для постановки различных серологических реакций.

После смерти животного особенно важно, как можно быстрее взять, соблюдая стерильность, кусочки органов, чтобы избежать посмертных изменений тканей (аутостерилизация), а также бактериального обсеменения. В качестве патологического материала чаще всего берут кусочки тех органов (размером в несколько кубических сантиметров), которые:

- 1) имеют видимые отклонения от нормы (форма, размер, цвет, консистенция, наличие необычных образований);
- 2) могут быть поражены или содержать вирус на основании клинической

картины болезни перед смертью;

3) наиболее часто содержат вирус – печень, селезенка, легкие, головной мозг, лимфатические узлы, почки.

Подготовка органов и тканей к исследованию. Вирус необходимо освободить из органов и тканей и перевести в фосфатный буфер или раствор Хенкса. Для этого материал тщательно измельчают ножницами, растирают в ступке с кварцевым песком (добавлять толченное стекло менее желательно, так как оно обладает щелочными свойствами и может инактивировать часть вирусных частиц). Из растертого материала готовят 10-процентную суспензию на фосфатном буфере или растворе Хенкса. Полученную суспензию центрифугируют со скоростью 1,5–3 тыс. оборотов в минуту в течение 10–15 минут. Надосадочную жидкость отбирают в стерильные флаконы и освобождают от микрофлоры:

1) обрабатывая антибиотиками (пенициллин, стрептомицин, нистатин, тетрациклин и др.) в дозе 100–1–2 тыс. ЕД/мл в зависимости от характера материала; избыток антибиотиков не желателен, так как при последующем культивировании вируса в культуре клеток он может вызвать их неспецифическую деградацию;

2) фильтруя через бактериальные фильтры.

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

При положительном результате бактериологического контроля (рост колоний на питательных средах) обработку антибиотиками повторяют и снова ставят бактериологический контроль. На время постановки бактериологического контроля вирусосодержащий материал хранят в холодильнике.

Подготовка выделений из носа, глаз. Тампоны, погруженные в соответствующий раствор, встряхивают 10–15 минут, тщательно отжимают, полученную жидкость центрифугируют при скорости 2–3 тыс. оборотов в минуту в течение 20 минут. Надосадочную жидкость отсасывают в стерильную пробирку, и в нее добавляют пенициллин и стрептомицин, выдерживают и после бактериологического контроля используют для заражения. Из осадка клеток готовят мазки для РИФ.

Подготовка фекалий. Пробу кала (приблизительно около одного грамма) помещают в баночку с бусами, содержащую 10 мл раствора Хенкса или фосфатно-буферного раствора. После гомогенизации материала встряхиванием и последующим центрифугированием (при скорости 2–3 тыс. оборотов в минуту в течение 30 минут) надосадочную жидкость отсасывают, добавляют пенициллин, стрептомицин по 500–1 000 ЕД/мл, нистатин 30 ЕД/мл и 200 мкг тетрациклина на 1 мл. После 30–60-минутного контакта производят посев на стерильность, замораживают и хранят при температуре минус 10–20 °С. В день заражения исследуемый материал оттаивают и повторно центрифугируют для удаления вновь образующегося после замораживания осадка. Неиспользованный материал хранят в замороженном состоянии до конца исследования. Исследование кала может быть заменено ректальными мазками, обработка которых требует меньше времени, а частота выделения вируса при этом не только не меньше, но иногда выше, чем при исследовании кала.

Мочу обрабатывают антибиотиками из расчета 500–1 000 ЕД/мл и используют для заражения.

При кожных высыпаниях исследуют содержимое папул, пузырьков и пустул, чешуйки и корки. Содержимое папул и пузырьков разводят физиологическим раствором (1:5), а корки, чешуйки после растирания суспендируют в солевом растворе (1:5–1:10) и подвергают центрифугированию при скорости

2–3 тыс. оборотов в минуту в течение 10–15 минут. После обработки пенициллином и стрептомицином (по 200–500 ЕД/мл) материал используют для заражения.

Подготовка крови. Для выделения вируса может быть использована либо цельная дефибринированная, либо *лаковая* кровь, либо кровь с антикоагулянтом. В последнем случае берут 5 мл крови в пробирку с 5–6 каплями гепарина и замораживают. После оттаивания гемолизированную кровь центрифугируют при скорости 2–3 тыс. оборотов в минуту в течение 15 минут, добавляют пенициллин и стрептомицин из расчета 100–200 ЕД/мл, и после проверки на стерильность используют для заражения. Для этих целей пригодна и свернувшаяся кровь. Ее растирают в ступке и добавляют небольшое количество раствора Хенкса (1:1 или 1:2).

Отбор крови для серологических исследований. Для серологической диагностики необходимо иметь сыворотки двух проб крови (парные сыворотки), взятых в начале и в конце болезни. Первую пробу берут как можно раньше – в инкубационный период или в начале проявления клинических симптомов болезни, вторую – во время выздоровления или через 2–3 недели после заболевания. Кровь в объеме 10–15 мл берут в стерильные пробирки с резиновыми пробками, выдерживают при комнатной температуре до образования сгустка, обводят стеклянной палочкой (или другим инструментом) и переносят в холодильник при температуре 4 °С на 18–20 часов. После максимальной ретракции сгустка сыворотку отсасывают, добавляют антибиотики (пенициллин и стрептомицин по 100 ЕД/мл), проводят высевы на бактериологические среды. Вместо отстаивания в холодильнике, кровь после обведения можно центрифугировать.

Серологические методы вирусологической диагностики требуют исследования парных сывороток, поэтому необходимо правильно сохранять первые

пробы, пока не будут получены вторые. Хранить сыворотки необходимо в холодильнике при температуре 4 °С или в замороженном состоянии, строго соблюдая порядок нумерации и соответствия записей в журнале и пробах.

Учет, хранение и транспортировка вирусов. Для всех вирусологических лабораторий установлен единый порядок обращения с вирусами, предусматривающий правила хранения, регистрации, передачи внутри лаборатории и за ее пределы. Материал должен быть снабжен этикеткой с указанием вируса, штамма, даты получения, номера пассажа, объема и других сведений. Данные этикеток должны совпадать с записями в журнале. В лаборатории ведется журнал вирусологических экспертиз.

Штаммы вирусов хранятся в холодильнике под замком с пломбой и печатью. Штаммы должны храниться в условиях, обеспечивающих их максимально длительную жизнеспособность. При транспортировке патологический материал необходимо как можно быстрее поместить в условия, обеспечивающие замедление процессов инактивации вируса. Такие условия обеспечивают низкие температуры (используют охлаждающие смеси) или консервирующие вещества. Выбор метода консервирования обусловлен видом патологического материала, методом его исследования, длительностью транспортировки.

Контрольные вопросы

1. Расскажите об общих правилах 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 4. ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

Цель занятия – ознакомиться с целью использования, методами заражения и методикой вскрытия лабораторных животных.

Задания:

- 1) ознакомиться с использованием лабораторных животных для выделения, накопления и поддержания вируса в лабораторных условиях;
- 2) отработать приемы фиксации и заражения лабораторных животных различными способами;
- 3) выполнить вскрытие лабораторных животных с целью получения вирусосодержащего материала.

Краткие теоретические сведения

Лабораторных животных используют в вирусологии для:

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

Лабораторных животных применяют для индикации вирусов в патологическом материале, то есть для постановки биопробы. Суспензией патологического материала заражают лабораторных животных и учитывают их реакцию на заражение.

Биопроба сопровождается характерной клинической картиной, специфичной для определенного заболевания. Положительная биопроба позволяет

сделать вывод о присутствии вируса в патологическом материале и о его видовой принадлежности.

Полученный от зараженного животного вирусосодержащий материал считают выделенным вирусом.

В организме экспериментально зараженных животных вирус накапливается, что используется для его изучения (идентификации) или для получения противовирусных вакцин.

В лаборатории требуется поддержание вирусов на протяжении многих лет в активном состоянии. Поддержание состоит в чередовании пассажей вирусов на живых системах (в том числе на лабораторных животных) и хранение их в консервирующих условиях. При консервации вирусы теряют свою активность. Новый пассаж вируса позволяет ее восстановить. *Пассаж – заражение чувствительной живой системы с целью получения от нее новой популяции вируса.* Такой вирус хранят в консервирующих условиях.

При работе с вирусом нужно знать его инфекционный титр, то есть его концентрацию в материале. Определяют инфекционный титр путем заражения разными разведениями вирусосодержащего материала чувствительных к вирусу живых систем, в том числе лабораторных животных.

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

Требования к лабораторным животным:

- 1. Животное должно быть здоровым, свободным от латентных (скрытых) инфекций.*
- 2. Вид животного должен быть чувствительным к данному вирусу (морские свинки – ящур, кролики – бешенство, ящур, болезнь Ауески и т. д.).*
- 3. Стандартная чувствительность животного (при этом учитывают*

возраст, массу, пол животных). Наибольшей чувствительностью обладают линейные животные (животные, полученные в результате близкородственного скрещивания в течении ряда поколений).

Методы заражения лабораторных животных. Вирусосодержащий материал вводят в орган, содержащие чувствительные к этому вирусу клетки. Например, вирус гриппа вводят интраназально, вирус оспы – внутрикожно, вирус бешенства – интрацеребрально и т. д. Если исследователь не имеет данных о тропизме находящегося в материале вируса, то животных нескольких групп заражают разными методами. Наиболее часто используются заражения: подкожное, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное, интраназальное, интрацеребральное и т. д.

Выбор места заражения определяется тропизмом вируса. *Тропизм – способность вирусов к репродукции в определенных типах клеток организма.*

После заражения животные должны быть помещены в клетки, на которые навешивают этикетки с указанием вируса или номера экспертизы исследуемого материала, количества и номеров зараженных животных, даты заражения. За животными устанавливают наблюдение, обращая внимание на их внешний вид, подвижность, прием пищи и т. д.

При заражении лабораторных животных *признаками присутствия вируса в патологическом материале являются:*

- 1) клинические признаки;*
- 2) гибель в характерные для данного вируса сроки;*
- 3) патологоанатомические изменения, которые выражаются изменением цвета, размера, формы и консистенции органов, а также появлением в органах образований, не встречающихся в норме.*

Вскрытие лабораторных животных. Для изучения патологоанатомических изменений и получения вирусосодержащего материала экспериментально

зараженных животных вскрывают. Делают это сразу же после гибели. Или животных убивают в момент максимального проявления симптомов болезни, или при их отсутствии на 8–10 день после заражения.

Для удобства вскрытия крупных животных фиксируют на специальных столах, а мелких – в кюветах, залитых воском, с помощью булавок, иголок. Вскрытие проводят стерильными инструментами. Брюшную и грудную полости вскрывают при фиксации животного в спинном положении с направленными в разную сторону конечностями. Шерсть животного по линиям разреза обрабатывают дезинфицирующим раствором. Разрез кожи делают по белой линии от лонной кости (симфиза) до шеи. Чтобы не порезать брюшную стенку, пинцетом приподнимают кожу и делают сначала поперечный разрез складки кожи у симфиза, а затем, вставив одну браншу ножниц в образовавшееся отверстие, разрезают кожу до шеи животного, после чего кожу разрезают по направлению к каждой конечности. Тупым путем кожу отпрепаровывают, открывая ее лоскуты вправо и влево наподобие дверок шкафа. Лоскуты кожи фиксируют булавками за верхние и нижние углы.

Заменив инструменты, вскрывают брюшную полость. Для этого разрез брюшной стенки делают под линией диафрагмы и по белой линии до лонной кости. Треугольники брюшной стенки отводят в сторону и фиксируют. В качестве вирусодержащего материала из брюшной полости берут кусочки (а у мелких животных целый орган) печени, селезенки, почек, брыжеечных лимфатических узлов, участков кишечника при наличии патологоанатомических изменений или симптомов болезни, наблюдавшихся перед смертью.

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

Череп вскрывают, укрепив животное в брюшном положении путем фиксации передних конечностей и головы. Кожу головы и шеи обрабатывают дезинфицирующим раствором. Разрез кожи делают перпендикулярно оси тела за

ушами, продолжают слева и справа вперед к глазницам. Кожу вместе с ушами отпрепаровывают и отбрасывают вперед, оголяя черепную коробку. Одну браншу ножниц вставляют в затылочное отверстие и режут кости влево и вправо по направлению к глазницам. Затем разрезают кости черепа между глазницами и удаляют весь вырезанный участок. Мозг животных извлекают из основания черепа. В тех случаях, когда требуется комплекс диагностических исследований используются микроскопические методы обнаружения вируса, из органов делают мазки или отпечатки.

Контрольные вопросы

1. Расскажите о видах лабораторных животных и целях их использования в вирусологии.
2. Какие методы заражения лабораторных животных Вы знаете?
3. Каковы признаки размножения вирусов в организме?

ТЕМА 5. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВИРУСОВ В ПАТОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ ПУТЕМ ОБНАРУЖЕНИЯ ТЕЛЕЦ-ВКЛЮЧЕНИЙ

Цель занятия – ознакомиться с техникой приготовления и способами окрашивания мазков, препаратов-отпечатков для выявления внутриклеточных включений.

Задания:

- 1) изучить характеристику телец-включений и элементарных телец, методику приготовления и окраски препаратов;
- 2) изучив литературные источники, выписать названия вирусных болезней и телец-включений которые могут наблюдаться в клетках (например, *бешенство – тельца Бабеша-Негри*);
- 3) приготовить мазки и отпечатки из различных органов;
- 4) провести окраску препаратов по Селлерсу;
- 5) провести микроскопию готовых препаратов.

Краткие теоретические сведения

Специфическими морфологическими признаками вирусной инфекции, очень часто имеющими диагностическое значение, являются разнообразные включения, выявляемые при окрашивании зараженных клеток. Тельца-включения при разных вирусных заболеваниях имеют свои характерные особенности.

При характеристике включений выделяют следующие признаки:

- 1) локализация в клетке;
- 2) тип нуклеиновой кислоты;
- 3) тинкториальные свойства;
- 4) гомогенность;
- 5) величина;

6) форма;

7) численность.

Тельца-включения, в зависимости от локализации в клетке, различают на *внутриядерные* и *цитоплазматические*. Выявлена определенная связь между типом нуклеиновой кислоты и локализацией телец-включений в клетке. РНК-содержащие вирусы в основном цитоплазматические включения, а ДНК-содержащие являются внутриядерными. Такое разграничение в известной степени условно. Иногда вирус может образовывать включения обоих типов.

В зависимости от окрашивания разными красителями тельца-включения бывают *базофильными* или *ацидофильными*. Величина телец-включений варьирует от одного до 30 нм; форма бывает округлой, овальной, неправильной. Количество включений при разных инфекциях различно, от единичных до 10–12 в клетке. Природа включений разнообразна. В основном это *вирусные фабрики*, то есть очаги, где идет репликация, транскрипция, сборка вирусных частиц.

Включения могут быть представлены:

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

Диагностическое значение телец-включений. При ряде вирусных инфекций обнаружение телец-включений имеет диагностическое значение, то есть обнаружение их при соответствующей клинической картине заболевания служит достаточным основанием для установления диагноза. Это относится к таким инфекциям, как бешенство, оспа, ринопневмония лошадей, аденовирусная инфекция, ринотрахеит крупного рогатого скота. При других заболеваниях обнаружение телец-включений имеет вспомогательное значение. На частоту выявления телец-включений влияют штамм вируса, возраст животного, физиологическая активность пораженного органа.

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

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

Подготовка и окрашивание мазков отпечатков при лабораторной диагностике бешенства. Для микроскопического исследования делают отпечатки и мазки из разных участков головного мозга.

Для приготовления отпечатка кусочки головного мозга (аммонов рог, кора полушарий, мозжечок, продолговатый мозг) кладут на фильтровальную бумагу, сложенную в 4–6 слоев. К поверхности среза несколько раз (три – четыре) подряд прикасаются чистым предметным стеклом, слегка надавливая, чтобы на стекле получился тонкий отпечаток.

Мазки делают из тех же участков головного мозга. Для этого кусочки мозга растирают в фарфоровой ступке пестиком или в пробирке стеклянной

палочкой до образования гомогенной массы, из которой делают грубые мазки на обезжиренном предметном стекле.

Можно делать мазки и другим способом. Для этого небольшой кусочек мозга кладут на край предметного стекла, а другим стеклом раздавливают его и размазывают от одного края до другого, в результате чего на поверхности стекла получается тонкий равномерный мазок.

Полученные мазки или отпечатки окрашивают одним из следующих способов:

1. Окраска по Муромцеву. Изготовленные, еще влажные мазки или отпечатки сразу же фиксируют в этиловом или метиловом спирте или в смеси спирта пополам с эфиром или ацетоном (химически чистым) в течение 1–2 часов и после этого промывают водой. Сосуд с фиксатором должен быть хорошо закрыт, чтобы предупредить испарение фиксирующей жидкости. После промывания водой влажные мазки помещают на 5–10 минут в раствор краски Мансона, разведенной водой (1:40). Затем краску сливают, и тут же мазки погружают в 10-процентный водный раствор танина на 8–10 минут до появления голубоватой окраски. После этого мазки промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой, проводят через смесь из равных частей спирта с ацетоном (химически чистым) или спирта с ксилолом и снова высушивают фильтровальной бумагой. Окрашенный мазок должен иметь светло-голубой фон, при этом ядра нервных клеток окрашиваются в синий цвет, а тельца Бабеша-Негри – в бледно-фиолетовый с темными включениями.

2. Окраска по Селлерсу. На приготовленный влажный отпечаток или мазок наносят на 4–5 секунд смесь реактива А (метиленовый синий – 2 г, метиловый спирт без ацетона – 100 мл) и реактива В (основной фуксин – 0,5 г, этиловый спирт без следов ацетона – 100 мл). Рабочий раствор красителя состоит из 15 мл реактива А, 2–4 мл реактива В и 25 мл метилового спирта. После окраски препарат промывают проточной водой и высушивают. В окрашенном

мазке цитоплазма нейронов ярко-синяя, ядрышки темно-синие, эритроциты кирпично-красные, тельца Бабеша-Негри пурпурно-красные с отчетливо видной базофильной структурой телец.

3. Окраска по Михину. Мазки или отпечатки фиксируют в смеси спирта и эфира (поровну) в течение 5–10 минут, после чего их просушивают фильтровальной бумагой и окрашивают в течение 30–40 минут краской Гимза (одна – две капли на 1 мл дистиллированной воды), быстро промывают подкисленным спиртом (одна капля ледяной уксусной кислоты на 30 мл 96-градусного спирта), а затем водой, просушивают фильтровальной бумагой и подвергают исследованию. Если материал был в глицерине, то его предварительно хорошо прополаскивают в воде и просушивают фильтровальной бумагой. В окрашенном препарате при микроскопическом исследовании основной фон должен быть красным с фиолетовым оттенком. При преобладании синего тона мазок снова обмывают подкисленным спиртом и промывают водой. Пирамидальные нервные клетки имеют синеватый цвет с интенсивно черным ядром, а тельца Бабеша-Негри – розово-красный с точечными включениями темно-синего цвета.

Контрольные вопросы

1. Дайте определение понятию тельца-включения и перечислите их особенности.
2. Как проводят исследование патологического материала на выявление телец-включений?

ТЕМА 6. КУРИНЫЕ ЭМБРИОНЫ И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

Цель занятия – изучить строение куриного эмбриона, ознакомиться с методами заражения его вирусосодержащим материалом и порядком вскрытия и отбора патологического материала.

Задание:

- 1) подготовить куриные эмбрионы к заражению;
- 2) провести заражение куриных эмбрионов;
- 3) на следующем занятии провести вскрытие куриных эмбрионов;
- 4) отобрать патологический материал для вирусологических исследований.

Краткие теоретические сведения

Цели использования куриных эмбрионов в вирусологии:

- 1) *обнаружение в патологическом материале активного вируса биопробой;*
- 2) *первичное выделение вируса;*
- 3) *поддержание вируса в активном состоянии в лаборатории;*
- 4) *титрование вируса;*
- 5) *накопление вируса для лабораторных исследований и получения вакцин;*
- 6) *тест-объект в реакции нейтрализации.*

Требования к куриным эмбрионам:

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

Строение куриного эмбриона. Яйцо с развивающимся куриным эмбри-

оном покрыто снаружи твердой пористой скорлупой, к которой плотно прилегает подскорлупная оболочка. Последняя в тупом конце яйца разделяется на два листка, между которыми образуется воздушная камера. Тело зародыша лежит в яйце эксцентрично, спиной ближе к скорлупе, голова направлена в сторону воздушной камеры. Зародыш погружен в околоплодную жидкость, заполняющую амниотическую полость, и пуповиной связан с желтком. Желток также располагается эксцентрично и относительно зародыша, как бы по другую сторону продольной оси (рис. 7).

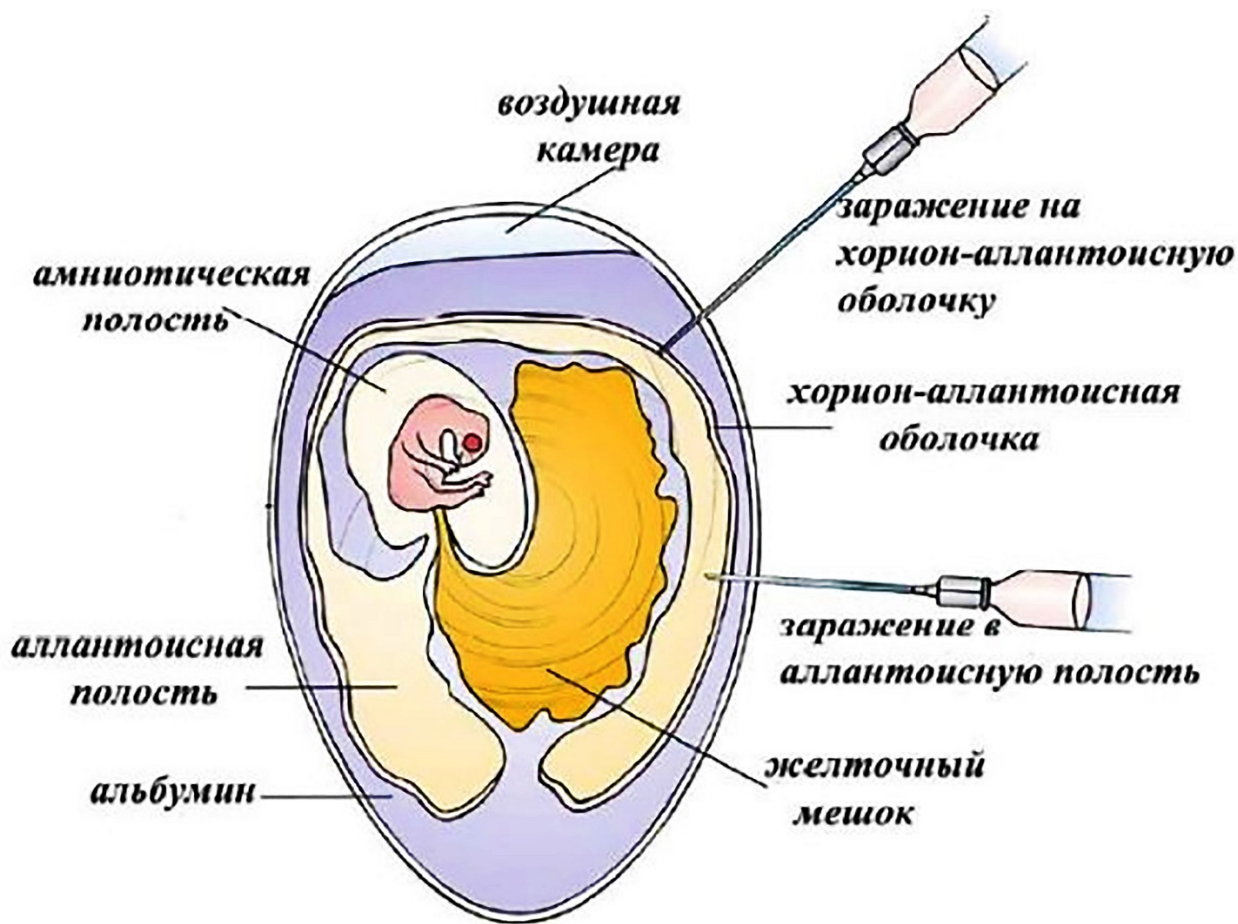


Рисунок 7 – Строение куриного эмбриона

Непосредственно под подскорлупной оболочкой находится аллантальная полость, покрывающая амнион и желточный мешок, а к 10–11-му дню замыкающаяся в остром конце яйца. В процессе развития аллантоисная оболочка срастается с хорионом, образуя единую хорион-аллантоисную оболочку

(ХАО). В остром конце яйца находится остаток белка.

Размножение вирусов возможно во всех структурах эмбриона, имеющих клеточное строение, к которым относятся зародыш, хорион-аллантоисная оболочка и желточный мешок. Накопление вирусов происходит в тех же структурах, но целый ряд вирусов может накапливаться в аллантоисной и в амниотической жидкостях, образуя практически готовую суспензию вирусов.

Заражение в ту или другую часть эмбриона проводится в период его максимального развития, когда количество чувствительных клеток будет наибольшим. В процессе инкубации меняются размеры зародышевых структур, что во многом объясняется их функциональным назначением и определяет оптимальный для заражения возраст эмбриона. Так, желточный мешок как резервуар питательных веществ, имеет наибольший объем в начале инкубации, а затем (после 12-го дня), по мере развития зародыша, он уменьшается. Заражают в желточный мешок с 5-го по 7-й день инкубации.

Подготовка куриных эмбрионов к заражению. Эмбрионы доставляют из инкубатория, не допуская их охлаждения в пути. В лаборатории эмбрионы инкубируют в термостате при температуре 37 °С и влажности 60–70 %, что достигается установлением в термостате открытых широкогорлых сосудов с водой. Вентиляционные отверстия термостата должны быть открыты. Эмбрионы размещают воздушной камерой вверх в специальных штативах. Рекомендуется до момента заражения дать возможность эмбрионам в течение суток адаптироваться к новым условиям и нормализовать свои функции после транспортного стресса. Если лаборатория располагает собственным инкубаторием, то снесенные курицей оплодотворенные яйца пригодны для закладки в него в течение десяти дней.

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

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

Способы заражения:

Заражение в аллантоисную полость. Используют 9–12-дневных эмбрионов. Яйца овоскопируют, на скорлупе делают отметку над воздушным мешком, ближе к его границе. Это место протирают раствором йода. Инъецируют 0,1–0,2 мл вирусного материала в аллантоисную полость. Иглу вводят примерно на 10–15 мм параллельно длинной оси яйца. Отверстие в скорлупе яйца протирают раствором йода и запечатывают парафином. Зараженные яйца инкубируют при 35 °С в течение 25–72 часов, в зависимости от вируса и предполагаемого использования вирусного материала.

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

Заражение в амнион. При таком способе заражения получают небольшое количество вирусосодержащего материала, поэтому вирусы, выделенные заражением в амнион, обычно пассируют заражением в полость аллантоиса для адаптации к росту в клетках аллантоисной оболочки. Используют чаще эмбрионы в возрасте 10–11 дней.

Тупой конец яйца протирают слабым раствором йода, после чего в скорлупе острым зондом делают отверстие. Скорлупу в месте отверстия снова про-

тирают раствором йода; яйцо помещают на овоскоп и заражают, используя туберкулиновый шприц с иглой диаметром 0,6 мм и длиной 4,5 см. Иглу вводят по направлению к телу эмбриона, быстрым уколом проникают в амниотическую полость и инъецируют 0,1–0,2 мл вирусного материала. Иглу извлекают; место отверстия протирают раствором йода; отверстие запечатывают смесью парафина с вазелином или коллодием. Зараженные яйца инкубируют при 33–37 °С (в зависимости от вируса) в течение 48–72 часов.

Заражение в амнион производят также *открытым* способом. Для этого скорлупу над воздушной камерой разрезают ножницами и через образовавшееся окно размером 1–1,5 см осторожно отслаивают глазным пинцетом подскорлупную оболочку. Прокалывают ХАО глазным пинцетом и продвигают его к эмбриону. Затем захватывают амниотическую оболочку и осторожно вытягивают ее часть через образовавшееся отверстие. Извлеченный амнион перехватывают широким пинцетом, который держат в левой руке. Затем шприцем для туберкулинизации с иглой вводят в вытянутый амниотический мешок 0,1–0,2 мл вирусного материала. После заражения пинцет разжимают, и амнион погружается в аллантоисную полость. Окно в скорлупе закрывают стеклянным колпачком, края которого запаивают расплавленным парафином.

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

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

Наблюдение за зараженными эмбрионами. Длительность наблюдения

зависит от вируса и дозы его введения. Эмбрионы просвечивают два раза в день: в начале и в конце работы; погибшие вынимают и исследуют. Результаты наблюдений записывают в протоколы исследований. Отрицательный результат заражения не исключает присутствия вируса в исследуемом материале. Он может свидетельствовать о том, что вируса ввели слишком мало или, что к данному вирусу эмбрион нечувствителен. Для исключения первого предположения необходимо провести один – два пассажа.

Реакция эмбрионов на вирусное заражение может быть различной. Как правило, гибель эмбриона в первые 24 часа после введения испытываемого материала – результат травмы. Однако существуют вирусы (например, восточного и западного энцефаломиелита лошадей), которые могут вызвать и столь быструю гибель зародыша. Характер локализации и интенсивность патологических изменений у зародыша зависит от вируса, его дозы, пути введения и степени адаптации к эмбриону. Последнее означает, что свежевыделенный и в первых пассажах вирус, будет вызывать у эмбрионов не такие изменения, как тот же вирус в последующих пассажах.

Выделяют следующие **возможные варианты изменений у эмбрионов под действием вирусов:**

- 1) *гибель эмбрионов;*
- 2) *кровоизлияние под кожу, в фолликулы перьев, затылочную область;*
- 3) *инъецирование сосудов на крыльях, ногах или всего зародыша;*
- 4) *замедление развития зародыша;*
- 5) *скручивание зародыша, уменьшение объема амниотической жидкости;*
- 6) *увеличение объема аллантоисной жидкости;*
- 7) *отек хорион-аллантоисной оболочки;*
- 8) *очаги некроза или скопления лейкоцитов с центральным омертвлением;*
- 9) *гистопатологические изменения;*
- 10) *образование телец-включений.*

Характерной чертой некоторых вирусов, а иногда даже разных штаммов одного вируса, является различный срок жизни эмбрионов после заражения.

Иногда по этому признаку можно предварительно идентифицировать вирусы. Изменения эмбриона после заражения имеют большую диагностическую ценность, но не гарантируют возможности абсолютно безошибочной идентификации вируса. Окончательно распознать штамм исследуемого вируса позволяют дополнительные исследования.

Вскрытие зараженных яиц и сбор вирусосодержащего материала. Зараженные яйца вскрывают в сроки максимального накопления вируса. Для каждого вируса и даже штамма этот срок является определенным и варьирует в пределах от 2 до 7–8 суток. Так, для вируса Ньюкаслской болезни штамма Н он составляет 2–3 дня, а для того же вируса В1 – 5 дней; для вируса инфекционного ларинготрахеита птиц – 5 дней и т. д.

Перед вскрытием их оставляют на ночь при температуре 40 °С или на 2–3 часа при температуре от минус 10 до 20 °С. Обрабатывают яйца спиртом, затем 2-процентным раствором йода и обжигают пламенем. Яйцо держат в руке слегка наклонно, чтобы избежать попадания скорлупы в полость яйца. Рассекают скорлупу немного выше очерченной карандашом границы воздушного пространства и при помощи ножниц и пинцета вскрывают. Аллантоисную жидкость отделяют пипеткой для отсасывания, на которую надета резиновая груша, или она подсоединена к вакууму. Амниотическую жидкость лучше всего брать при помощи шприца с подходящей иглой. В зависимости от поставленной задачи жидкости можно брать порциями или полностью.

Контрольные вопросы

1. Для чего используют куриные эмбрионы в вирусологии?
2. Как устроен куриный эмбрион?
3. Какие известны методы заражения куриных эмбрионов?
4. Как получают патологический материал от куриных эмбрионов?

ТЕМА 7. КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ВИРУСОЛОГИИ

Цель занятия – ознакомиться с общими сведениями о культурах клеток, с техникой получения первичных культур клеток методом трипсинизации и методами индикации вируса в культуре клеток.

Задания:

- 1) ознакомиться с техникой получения культур клеток;
- 2) получить первично-трипсинизированную культуру клеток;
- 3) ознакомиться с методикой заражения культур клеток.

Краткие теоретические сведения

Культура клеток – это клетки тканей различных органов многоклеточного организма, живущие и размножающиеся в искусственных условиях вне организма (*in vitro*). При этом в пробирках или матрасах образуется клеточный монослой. Культуру клеток практически можно получить из любого органа или ткани человека или животного (взрослого или эмбриона). Однако, лучше это удастся сделать из эмбриональных органов, так как их клетки еще слабо дифференцированы и обладают более высокой потенцией роста.

В вирусологической практике применяют следующие **культуры клеток**:

1. Первичные. Их готовят непосредственно перед применением (для длительного культивирования они не пригодны). Их можно получить из различных органов и тканей человека и животных. Однако, лучше это удастся сделать из эмбриональных органов. Чаще всего используют почки, легкие, кожу, тимус, тестикулы эмбрионов или молодых животных. После соответствующей подготовки их измельчают на кусочки размером 1–2 мм и обрабатывают трипсином (такие культуры называют первично-трипсинизированными). Затем по-

лученную взвесь клеток разливают по пробиркам или в другую посуду, заливают питательной средой, инкубируют в термостате и получают монослой клеток. Обычно он формируется через 3–5 дней. Скорость формирования зависит от вида ткани, возраста животного, качества питательной среды, посевной концентрации клеток и других факторов. Питательную среду меняют по мере ее загрязнения продуктами жизнедеятельности клеток. Монослой сохраняет жизнеспособность в течение 7–21 дня.

Из первичных клеток можно получить **субкультуры** путем снятия их со стекла раствором версена (или смесью версена и тринсина) и ресуспендирования в новой питательной среде. Субкультуры получают от 2–5 пассажей и очень редко до 8–10 пассажей. Последующие пассажи приводят к изменению морфологии клеток и их гибели.

2. Перевиваемые. 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. Эта работа проводится в течение многих месяцев. Полагают, что механизм происхождения перевиваемых клеток – результат их генетической изменчивости.

Клетки перевиваемых культур имеют одинаковую форму, гетероплоидный набор хромосом (у первичных культур он диплоидный), они стабильны в условиях роста в пробирке; некоторые из них обладают онкогенной активностью. Последнее свойство ограничивает их использование при производстве вакцин.

Перевиваемые клетки можно получить как из здоровых тканей животных, так и из опухолевых. Примеры таких клеток: ВНК-21 (почка новорожденного хомячка); ППТ (перевиваемая почка теленка); ППО (перевиваемая почка

овцы); *HeLa* (раковая опухоль шейки матки женщины); *Нер-2* (карцинома гортани человека); *Нер-3* (лимфоидная карцинома человека) и др.

3. Диплоидные. По сути дела, это перевиваемые культуры с двойным (правильным) набором хромосом. В первых 50–60 пассажах такие культуры остаются диплоидными и их широко используют для решения ряда теоретических и практических задач биологии (приготовление биопрепаратов для человека, выделение онковирусов и др.). Они весьма жизнеспособны, не подвержены морфологическим изменениям, свободны от спонтанного вирусоносительства и т. д.

Работа с культурой клеток требует абсолютной стерильности, тщательной подготовки посуды и соответствующих питательных сред.

Подготовка посуды. Качество посуды имеет важное значение для успешного культивирования клеток вне организма. Лучшей является посуда из боросиликатного или натриевого стекла. Посуда должна быть чистой, обезжиренной, не обладать токсическим действием, быть абсолютно стерильной.

Предложено много способов обработки посуды, и в каждой лаборатории выбирают наиболее подходящий из них. При культивировании клеток особенно большие требования предъявляют к подготовке и стерилизации посуды, пробок и других материалов. Во многих случаях неправильная их мойка и стерилизация служат причиной неприкрепления клеток к стеклу или быстрой генерации клеточного монослоя.

При обработке посуды необходимо учитывать высокую чувствительность клеток к токсическому действию солей тяжелых металлов. Одним из обязательных условий успешной работы с клетками является высокое качество воды. Для ополаскивания посуды используют дистиллированную, а лучше бидистиллированную воду.

Солевые растворы. Для культивирования клеток большинство питатель-

ных сред готовят на сбалансированном солевом растворе, для которого необходимы высокоочищенные препараты, так как следы ряда примесей (свинец, ртуть и другие тяжелые металлы) токсичны для клеток. Солевые растворы готовят на бидистиллированной воде. Они обеспечивают сохранение концентрации водородных ионов, осмотического давления в клетках, соответствующую концентрацию необходимых неорганических веществ. Лучшими из них являются растворы Хенкса и Эрла. Эти растворы являются обязательным компонентом любой питательной среды.

Для определения в солевых растворах и питательных средах концентрации водородных ионов (рН) применяют индикатор феноловый красный (0,002 %). Он не оказывает токсического воздействия на клетки и вирусы. При сдвигах концентрации водородных ионов в щелочную сторону растворы принимают красно-малиновую окраску, в кислую – желтую. При нейтральном значении (7,2–7,4) цвет среды оранжево-красный. Для регулирования рН солевых растворов и питательных сред используют 7,5-процентный раствор бикарбоната натрия (NaHCO_3) и 3-процентный раствор уксусной кислоты (CH_3COOH). Эти растворы готовят на бидистиллированной воде, стерилизуют кипячением и хранят в холодильнике при температуре 4–6 °С не более месяца.

Чтобы получить однослойную культуру клеток, применяют протеолитические ферменты, разрушающие цитоплазматические мостики между клетками. К таковым относятся трипсин, панкреатин, папаин и др. Наиболее часто используют трипсин в виде 0,25-процентного раствора на фосфатном буфере. Хранят его в замороженном состоянии в течение 6–8 месяцев.

При пересеве перевиваемых клеток с целью отделения их от стекла используют версен (натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты). Он оказывает на клетки более легкое действие, чем трипсин. Механизм действия заключается в том, что он вступает в реакцию со стеклом, образуя промежуточное соединение, которое механическим путем отделяет клетки друг от

друга.

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

Естественные питательные среды – это биологические жидкости (сывотка крови, эмбриональный экстракт, асцитическая жидкость, коровья амниотическая жидкость, тканевые экстракты и др.).

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

К *полусинтетическим питательным средам* относят гемогидролизаты, гидролизат лактальбумина, аминокептид и др.

Лучшими искусственными питательными средами являются синтетическая среда 199 и среда Игла. В состав среды 199 входит 60 компонентов: 10 аминокислот, 17 витаминов, 8 минеральных солей, 10 компонентов, входящих в состав нуклеиновых кислот и др.

Все питательные среды принято делить на две группы: 1) *ростовые, обеспечивающие жизнь и размножение клеток; применяются в первые дни культивирования клеток;* 2) *поддерживающие, обеспечивающие жизнедеятельность клеток, но не их размножение; используются обычно после заражения культуры клеток вирусами.*

Методика культивирования вирусов в культуре клеток:

1. *Подбор культуры клеток.*
2. *Получение вирусосодержащего материала.*
3. *Подготовка для заражения.*
4. *Заражение клеток вирусосодержащим материалом.*
5. *Культивирование вируса в клетках.*
6. *Индикация вируса в культуре клеток.*
7. *Сбор культуральной жидкости и идентификация в ней вируса.*

Получение первично-трипсинизированных культур клеток из кожно-мышечной ткани развивающихся куриных эмбрионов. Куриные эмбрионы 9–11-дневной инкубации овоскопируют. Поверхность скорлупы протирают йодированным спиртом и обжигают. Стерильными ножницами срезают скорлупу на 2–3 мм выше границы воздушной камеры, разрывают подскорлупную и хорион-аллантаисную оболочки, и за шейку извлекают эмбрион в стерильную чашку Петри (рис. 8). У эмбриона удаляют голову, лапки, крылья и внутренние органы. Оставшийся кожно-мышечный мешок переносят в стерильную банку и измельчают ножницами на кусочки 3–4 мм.

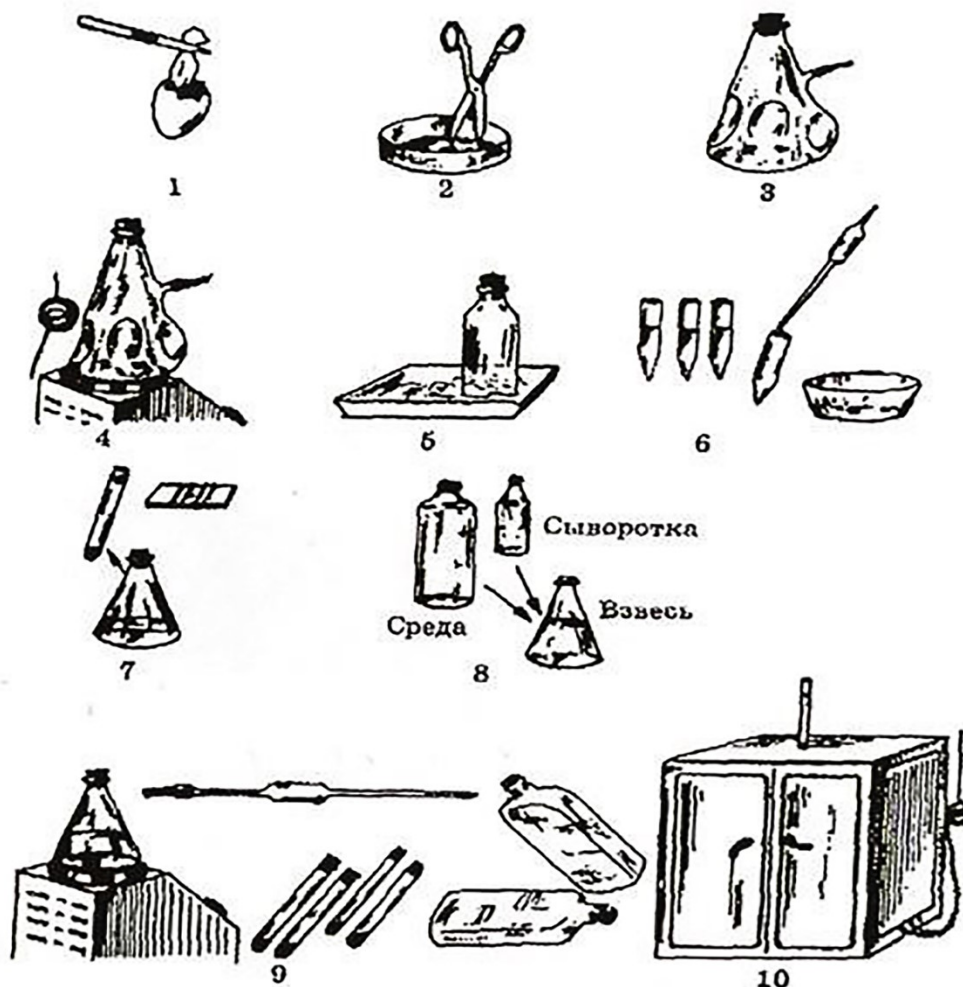


Рисунок 8 – Схема получения культуры клеток

Измельченную ткань два – три раза отмывают раствором Хенкса от слизи и кровяных элементов до получения прозрачных сливных вод и переносят в

колбу для трипсинизации. В колбу наливают 0,15-процентный раствор трипсина, подогретого до температуры 35–37 °С (соотношение ткани и трипсина составляет (1:3)); вносят стерильный магнитик и ставят на магнитную мешалку.

Трипсинизацию проводят дробно, то есть через каждые 3–5 минут отделившиеся клетки вместе с трипсином сливают в центрифужные флаконы и помещают на лед или в холодильник для прекращения действия трипсина на клетки. К оставшемуся в колбе содержимому добавляют новую порцию трипсина. Скорость вращения на магнитной мешалке регулируют так, чтобы не было пены. Процесс повторяют несколько раз (от трех до пяти) до полного истощения ткани.

После трипсинизации суспензию клеток в растворе трипсина центрифугируют при скорости 1 000 оборотов в минуту в течение 10 минут. Надосадочную жидкость сливают (выбрасывают), а осадок клеток ресуспендируют в теплой (37 °С) питательной среде (в заведомо известном объеме) и фильтруют через трехслойный марлевый фильтр. После тщательного перемешивания клеток берут один миллилитр для подсчета клеток.

Успех культивирования клеток в значительной степени зависит от посевной дозы. При малом количестве клеток не наблюдается образование монослоя даже при длительном культивировании. При слишком большой дозе клеток происходит интенсивная их пролиферация, и образованный слой клеток значительно раньше подвергается старению и неспецифической дегенерации. Подсчет клеток производят в камере Горяева.

В пробирки заливают по 1 мл, в матрасы емкостью 1 000, 250 и 100 мл вносят соответственно 100, 40 и 15 мл взвеси клеток. Сосуды и пробирки плотно закрывают стерильными резиновыми пробками (для предупреждения защелачивания среды), делают надпись (вид культуры клеток и дату). На пробирках восковым карандашом проводят продольную черту, укладывают их

чертой вверх в лотки с наклонным углом 5° и помещают в термостат при температуре 37 °С.

Ежедневно культуры просматривают под малым увеличением микроскопа для определения характера роста. Если клетки не пролиферируют, выглядят округлыми, зернистыми, темными и отслаиваются от стекла, это свидетельствует о плохой обработке посуды или токсичности сыворотки, питательной среды. Пролиферирующие клетки светлые, связаны цитоплазматическими отростками, растут однослойным пластом.

В процессе размножения клеток выделяются продукты обмена веществ, которые вызывают изменение концентрации водородных ионов питательной среды в кислую сторону (среда желтеет), что отрицательно влияет на клетки и может привести их к гибели. Такую среду заменяют свежей. Обычно сплошной монослой куриные фибробласты образуют через 36–48 часов. От одного куриного эмбриона получают 70–120 млн. клеток. Культуры клеток куриных фибробластов используют при работе с вирусом болезни Ауески, оспы птиц, ньюкаслской болезни, гриппа птиц, вируса саркомы Рауса и др.

Контрольные вопросы

1. Расскажите о видах культур клеток и дайте их характеристику.
2. Как используются культуры клеток в вирусологии?
3. Какова методика получения первично-трипсинизированной культуры клеток?

ТЕМА 8. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕАКЦИИ ИММУННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Цель занятия – освоить принцип метода флуоресцирующих антител.

Задания:

- 1) ознакомиться с устройством люминесцентного микроскопа;
- 2) изучить общие принципы постановки реакции иммунофлуоресценции.

Краткие теоретические сведения

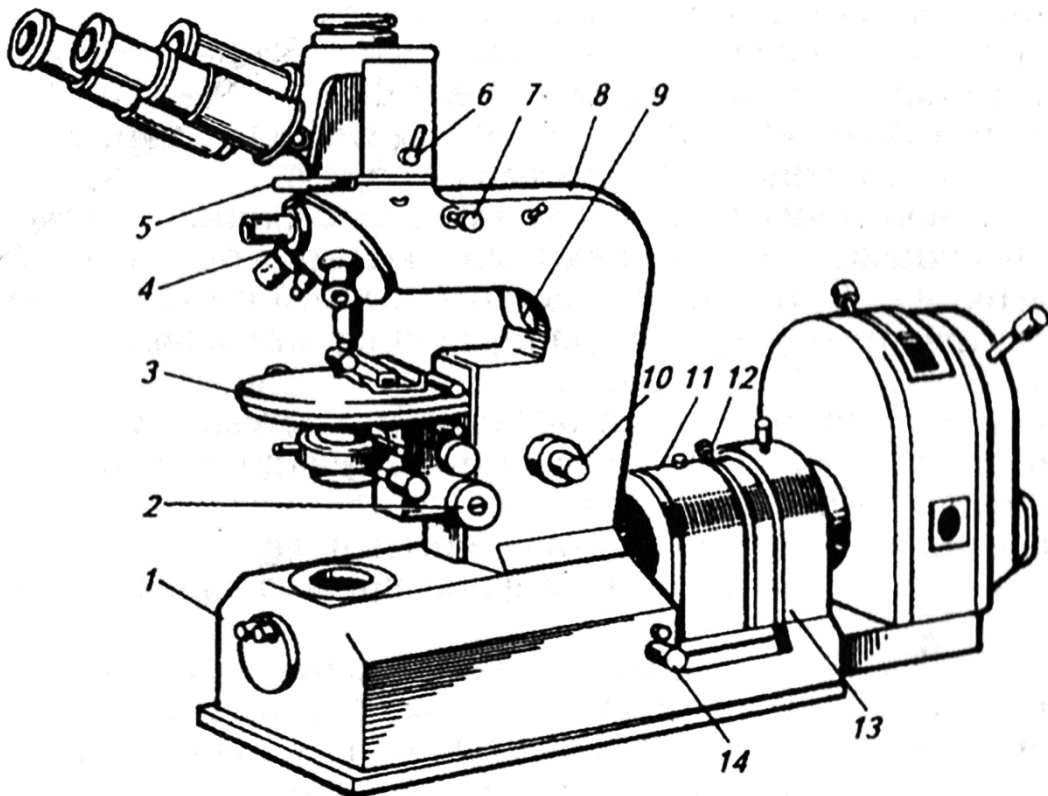
В основе метода флуоресцирующих антител лежит явление люминесценции. *Сущность его в том, что, поглощая различные виды энергии (световую, электрическую и др.), атомы некоторых веществ переходят в возбужденное состояние, а затем, возвращаясь в исходное состояние, выделяют поглощенную энергию в виде светового излучения.*

Люминесценция наблюдается в виде флуоресценции или фосфоресценции. **Флуоресценция** – свечение, возникающее в момент облучения возбуждающим светом и прекращающееся сразу после его окончания. **Фосфоресценция** – свечение, продолжающееся длительное время и по окончании процесса возбуждения.

Многие вещества живых организмов обладают собственной флуоресценцией (так называемой первичной, или аутофлуоресценцией), однако интенсивность ее очень мала. *Вещества, обладающие интенсивной первичной флуоресценцией и используемые для придания флуоресцирующих свойств нефлуоресцирующим веществам, получили название флуорохромы (флуоресцирующие красители).* Такая наведенная флуоресценция называется вторичной. Флуорохромы очень широко используют в люминесцентной микроскопии для обработки биологических объектов, имеющих слабую первичную флуоресценцию.

Люминесцентное свечение подчиняется правилу Стокса, согласно которому свет флуоресценции имеет большую длину волны, чем свет возбуждения. Так, если возбуждающий свет синий, то свет флуоресценции – зеленый. Это позволяет отфильтровывать сравнительно слабую флуоресценцию от более ярких возбуждающих лучей.

Для возбуждения флуоресценции при люминесцентной микроскопии используют ближнюю ультрафиолетовую или сине-фиолетовую часть спектра. Люминесцентная микроскопия осуществляется с помощью специальных микроскопов. В настоящее время в лабораториях используют люминесцентные микроскопы серии МЛ, «Люам», ОРТО-EDU, Микромед-ЛЮМ (рис. 9). *Зарисуйте схему микроскопа.*



- 1 – основание микроскопа; 2 – маховик грубой подачи; 3 – предметный столик;
4 – револьверное устройство; 5 – поворотный диск со светофильтрами;
6, 7 – рукоятки подвижной трубки; 8 – тубусодержатель; 9 – рукоятка
полевой диафрагмы; 10 – маховички микроподачи; 11 – откидной кожух;
12 – ручка диафрагмы; 13 – осветительное устройство; 14 – рукоятка откидного зеркала

Рисунок 9 – Схема люминесцентного микроскопа МЛ-1

В люминесцентном микроскопе используют систему светофильтров для выделения сине-фиолетовой части спектра; теплозащитные фильтры для предохранения оптики от перегрева и выцветания препаратов; запирающий фильтр на окуляре для снятия возбуждающего света и пропускания света люминесценции. Люминесцентный микроскоп устанавливают в затемненной части комнаты на прочном столе. Следует исключить вибрацию, которая создает помехи, что особенно сказывается при микрофотографировании. В помещении должна быть хорошая вентиляция, устраняющая вредные газы от источника света. Лампа достигает полной силы света через 5–10 минут после включения, если сила тока при работе равна 4–5 ампер. Повторное включение лампы возможно только после ее охлаждения.

Большинство исследователей проводят люминесцентную микроскопию препаратов в падающем свете, поскольку он имеет ряд преимуществ перед освещением препарата снизу, а именно: наименьшая потеря света, идущего от источника света; лучший спектральный состав возбуждающего света; незначительное попадание прямого света в глаза исследователя и увеличение освещенности объектов.

При люминесцентной микроскопии используют нефлуоресцирующее иммерсионное масло высокого качества.

В вирусологической практике люминесцентную микроскопию используют в двух основных методах: флуорохромировании и методе флуоресцирующих антител.

Флуорохромирование – это обработка препарата флуорохромом с целью увеличения силы и контрастности свечения препарата. Отечественная промышленность в настоящее время выпускает специальные наборы флуорохромов. Наиболее широко применяется акридиновая группа (акридин оранжевый, акридин желтый и др.) и тиозидовая группа (примулин). Флуорохромы чаще всего используют в водных растворах очень низкой концентрации

(от 1:1 000 до 1:1 000 000). Метод флуорохромирования может быть использован при изучении некоторых вирусов (оспы, болезни Борна, аденовирусной инфекции и др.).

Препараты для метода флуорохромирования можно готовить двумя способами:

1) на свежий мазок-отпечаток (из органов, соскобов со слизистых оболочек) или суспензии инфицированных клеток наносят одну – две капли рабочего раствора (1:10 000) акридинового оранжевого и накрывают покровным стеклом; приготовленный таким образом свежий (в течение 10–20 минут после его приготовления) препарат рассматривают в люминесцентном микроскопе;

2) мазки-отпечатки, полученные из патологического материала, или инфицированные культуры клеток (на покровных стеклах) фиксируют 96-градусным этиловым спиртом в течение 15–30 минут; промывают раствором Хенкса; наносят на препарат одну – две капли раствора акридинового оранжевого (1:10 000); через 5–10 минут покрывают покровным стеклом и исследуют; в результате окрашивания ДНК, содержащаяся в ядрах клеток, дает изумрудно-зеленое свечение; РНК, находящаяся в цитоплазме, светится красным или оранжевым цветом; в препаратах ДНК-содержащих вирусов (например, аденовирус), вирусный материал светится зеленым цветом в ядре в виде гранул различной величины; при наличии в препарате РНК-содержащего вируса (например, вируса гриппа), вирусный материал обнаруживается в виде ярко-красных гранул в цитоплазме клеток.

Чтобы различить происхождение ДНК или РНК (клеточное или вирусное), применяют обработку препаратов 0,5-процентным раствором РНК-азы или ДНК-азы в течение 5–10 минут, или облучение ультрафиолетовыми лучами. При этом свечение клеточных РНК или ДНК сразу исчезает, а вирусные продолжают светиться еще 20–30 минут. Это служит доказательством специфичности вирусных нуклеиновых кислот.

Метод простого флуорохромирования не сложен, однако в большинстве случаев он не дает возможности полно дифференцировать возбудителей заболеваний.

Метод флуоресцирующих антител (МФА), или реакция иммунофлуоресценции (РИФ). Принцип данного метода заключается в том, что антитела, соединенные с флуорохромом, сохраняют способность вступать в специфическую связь с гомологичным антигеном. Образующийся комплекс антиген + антитело обнаруживают под люминесцентным микроскопом по характерному свечению, благодаря присутствию в нем флуорохрома. Таким образом, с помощью МФА реализуется непосредственный контроль за первой фазой серологических реакций, причем специфичность метода сочетается с высокой чувствительностью.

Для получения антител используют высокоактивные гипериммунные противовирусные сыворотки, максимально освобожденные от гетероантител. Из таких сывороток выделяют гомогенные фракции, содержащие антитела, которые метят флуорохромом. В качестве флуорохрома наиболее часто используют ФИТЦ-флуоресцеина изотиоционат (зеленое свечение) и РСХ-родамина сульфохлорид (красное свечение). Антитела, меченные флуорохромом, называют конъюгатом.

Хранить конъюгаты рекомендуется при температуре минус 20 °С или при более низких температурах в герметически закрытых сосудах. Можно также консервировать конъюгат путем добавления тиомерсала (1:10 000) и хранить при температуре 4 °С. Флуоресцирующие сыворотки или их глобулиновые фракции длительное время сохраняют специфическую активность в лиофилизированном состоянии.

При использовании каждой серии конъюгата необходимо опытным путем проверить рабочее разведение, так как оно зависит не только от качества флуоресцирующей сыворотки, но и от освещения препарата в люминесцентном

микроскопе. С этой целью микроскопируют препараты, содержащие специфический антиген, окрашенные конъюгатом, взятым в разных разведениях (обязательно на одно – два разведения выше и ниже рабочего разведения, указанного на этикетке препарата); выбирают наибольшее разведение, дающее интенсивное свечение (красящий титр), и удваивают его.

Приготовление препаратов. Для исследования иммунофлуоресцентным методом используют мазки, отпечатки, гистологические срезы и культуры клеток.

Предметные стекла, применяемые для приготовления препаратов, должны быть тонкими, чистыми, обезжиренными, бесцветными и не иметь царапин. Для этого их промывают в нейтральных детергентах, прополаскивают в дистиллированной воде и сохраняют в спирте или смеси спирта с эфиром. Перед употреблением чистые стекла проводят через пламя горелки и охлаждают. Все надписи делают простым карандашом на специально подготовленной матовой площадке у края предметного стекла. Надписи восковым карандашом при фиксации препаратов растворяются и образуют на стекле восковую пленку, мешающую обработке мазков флуоресцирующими сыворотками.

Мазки готовят из смывов и других жидкостей. Мазки-отпечатки готовят из тех органов и тканей, в которых предполагается наибольшая концентрация вируса. Для диагностики бешенства применяют мазки-отпечатки из мозга; ринопневмонии лошадей, гепатита собак – из печени; гриппа, инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота, аденовирусной инфекции и других – мазки из носовых смывов, а также отпечатки слизистых оболочек носовой полости, бронхов, трахеи; оспы – мазки из везикул, папул. Для выявления вируса гриппа или других возбудителей респираторных заболеваний очищают носовой ход от слизи, берут мазок ватным тампоном, который помещают в пробирку с забуференным физиологическим раствором или питательной средой для культур клеток (3 мл). Тампон встряхивают, отжимают и удаляют; раствор

центрифугируют и из осадка делают мазки диаметром 1,5 см каждый на стекле. Исследование слизистых оболочек, выстланных многослойным плоским эпителием (например, глотки, конъюнктивы, влагалища), требует приготовления соскобов после очистки слизистой оболочки. Поверхностные ороговевшие клетки таких эпителиев обладают сильной аутофлуоресценцией и не годятся для исследования. Поэтому препараты готовят из клеток скарифицированных участков, содержащих базальные слои эпителия.

Из органов готовят отпечатки, прикладывая быстрым движением предметное стекло к поверхности органа. Отпечаток должен быть тонким и равномерным. Мазки-отпечатки подсушивают на воздухе, затем фиксируют и сохраняют в холодильнике до исследования (при минус 4 °С, минус 70 °С).

Для контроля таким же образом готовят препараты из органов здоровых животных.

Если вирусы предварительно накапливают в культурах клеток, то последние выращивают на узких пластинках покровного или такого же размера обрезах предметного стекла. Извлеченные в разные сроки после заражения из пробирок с культурой клеток, эти пластинки осторожно отмывают от питательной среды физиологическим раствором или фосфатным буфером. Затем сушат при комнатной температуре на воздухе, на чистом листе фильтровальной бумаги, положив клеточным слоем вверх, и фиксируют.

Наилучший фиксатор для вирусных антигенов – чистый ацетон, охлажденный до температуры минус 10–15 °С; можно также использовать метиловый спирт. Фиксируют препараты 10–20 минут. Продолжительность и температура фиксации могут колебаться в зависимости от вида вируса. При особо опасных инфекциях время фиксации увеличивают. Например, при работе с уличным вирусом бешенства препараты фиксируют не менее 4 часов. **Различают два основных способа применения флуоресцирующих антител: прямой и непрямой.**

1. При использовании прямого, или одноступенчатого, способа (Weller и Coons, 1954) (рис. 10) для индикации различных вирусных антигенов применяют соответствующие каждому антигену флуоресцирующие антитела. Непосредственно на препарат наносят конъюгат и выдерживают его в течение 20–60 минут при температуре 37 °С во влажной камере, хотя некоторые исследователи предпочитают проводить эту процедуру при 4 °С, удлиняя время. Препараты отмывают физиологическим раствором (рН 7,2–7,5) от несвязанного с антигеном конъюгата. Затем их подсушивают на воздухе, наносят нефлуоресцирующее масло и исследуют под микроскопом.



Рисунок 10 – Схема прямого варианта реакции иммунной флуоресценции

Результаты учитывают по интенсивности и специфичности флуоресценции исследуемого объекта с учетом структурных особенностей по *следующей шкале*:

- (++++) *– яркая, сверкающая флуоресценция изумрудно-зеленого цвета;*
- (+++) *– яркая флуоресценция зеленого цвета;*
- (++) *– слабая флуоресценция желтовато-зеленого цвета;*
- (+) *– очень слабая флуоресценция неопределенного цвета;*
- (–) *– объект не флуоресцирует.*

В качестве обязательного контроля берут препараты из материалов, не содержащих искомый вирус (нормальные тканевые культуры, отпечатки органов здоровых животных и т. д.). Их обрабатывают также, как опытные препараты, и одновременно с ними.

С целью уменьшения неспецифической фоновой флуоресценции исследуемых препаратов применяют так называемое контрастирование неспецифического свечения. Для этого исследуемые мазки обрабатывают смесью специфической сыворотки, меченной ФИТЦ (и поэтому излучающей зеленый свет), и альбумина нормальной сыворотки лошади или быка, меченной родамином (излучающим красный свет). В таком препарате специфический антиген будет светиться зеленым, а фон препарата (свободные от вируса клетки и т. д.), адсорбируя альбумин, окрашивается в оранжево-красный или бурый цвет (контрольный в отношении зеленого).

Выпускаемые нашими биофабриками сухие специфические иммунные люминесцирующие сыворотки и альбумины перед окрашиванием мазков растворяют в дистиллированной воде в объеме, указанном на этикетке ампулы. Хорошие препараты должны легко и без осадка растворяться. Если при этом препарат мутнеет или образуется осадок, то от муты или осадка освобождаются центрифугированием при скорости 6 000 оборотов в минуту. Растворенными препаратами, сохраняемыми при температуре 4 °С, можно пользоваться в течение нескольких недель. Перед обработкой исследуемых препаратов готовят рабочую смесь специфического конъюгата с люминесцирующим альбумином. Наиболее выгодное соотношение между флуоресцирующим иммунным глобулином, меченным ФИТЦ, и альбумином, конъюгированным с родамином, приходится определять опытным путем для каждой новой серии любого из этих препаратов, ибо характеристика их активности с момента выпуска до применения может изменяться.

Прямой метод позволяет выявить и идентифицировать антиген. Для этого нужно иметь на каждый вирус флуоресцирующую сыворотку.

2. При непрямом, или двухступенчатом, способе (рис. 11) вначале антиген обрабатывают гомологичными не флуоресцирующими антителами (пер-

вая ступень). Образуется комплекс антиген-антитело, для обнаружения которого применяют флуоресцирующую антивидовую сыворотку, соответствующую виду животного-продуцента гомологичных антител. Антивидовые сыворотки получают, иммунизируя животных глобулинами животных тех видов, которые служат продуцентами антивирусных антител.



Рисунок 11 – Схема непрямого варианта реакции иммунной флуоресценции

При непрямом методе на фиксированный препарат наносят немеченую сыворотку или гамма-глобулины, содержащие антитела к предполагаемому вирусу, после чего препарат в течение 30 минут выдерживают при температуре 37 °С. Отмывают несвязанные антитела. На препарат наносят конъюгат, содержащий антитела против гамма-глобулинов животных того вида, на которых получали антивирусные антитела (то есть если использовали антитела, полученные на курах, то применяют меченные флуорохромом антитела против глобулинов кур). Время окрашивания этим конъюгатом такое же, как и при прямом методе. Препарат отмывают для удаления несвязанных меченых антител, наносят нефлуоресцирующее масло и исследуют под люминесцентным микроскопом.

Непрямой способ имеет ряд преимуществ. Его применяют не только для обнаружения антигена, но и для выявления и титрования антител. Этот метод в несколько раз более чувствителен, чем прямой, так как каждая молекула антигена связывает обычно больше, чем одну молекулу антитела. Эти антитела,

соединяющиеся с изучаемым антигеном, в свою очередь, являются антигенами для флуоресцирующего антиглобулина, которого связывается значительно больше. Кроме того, этот метод требует одной меченой сыворотки для обнаружения антигенов различных вирусов.

Для подготовки антиглобулиновых люминесцирующих сывороток к работе, выпускаемые биофабриками лиофильно высушенные конъюгаты, слегка встряхивая, растворяют в 1 мл (или 0,5 мл) дистиллированной воды. Затем, добавляя физиологический раствор, разведение сыворотки доводят до указанного на этикетке ампулы рабочего разведения. Хорошие конъюгаты должны растворяться легко, без осадка. После растворения конъюгат при температуре 2–4 °С можно хранить в течение 1–2 месяцев.

Разработано несколько модификаций непрямого метода. Наибольшего внимания заслуживает метод с использованием комплемента (Goldwasser и Shepard, 1958). Метод заключается в том, что на препарат наносят инактивированную нефлуоресцирующую специфическую сыворотку и комплемент морской свинки, затем для выявления комплекса антиген + антитело + комплемент наносят флуоресцирующую антикомплементарную сыворотку.

Этот вариант намного чувствительнее первого и имеет еще большую универсальность, так как требуется только одна антикомплементарная флуоресцирующая сыворотка для обнаружения антигенов различных вирусов.

Контрольные вопросы

1. В чем состоит метод флуоресцирующих антител? Укажите его использование в диагностике вирусных болезней.
2. Какие модификации метода флуоресцирующих антител применяются в вирусологии?
3. Какие задачи можно решать с помощью данного метода?

ТЕМА 9. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕАКЦИИ ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Цель занятия – освоить принцип постановки реакции иммуноферментного анализа.

Задания:

- 1) ознакомиться с устройством люминесцентного микроскопа;
- 2) изучить общие принципы постановки реакции иммунофлуоресценции.

Краткие теоретические сведения

Реакция иммуноферментного анализа (ИФА), или другое ее название – ELISA (от англ. *enzyme-linked immunosorbent assay*) занимает одно из ведущих мест в современной диагностике и профилактике вирусных болезней человека и животных. *Реакция иммуноферментного анализа позволяет с высокой степенью достоверности проводить качественное выявление вирусных антигенов в ранней диагностике вирусных болезней и количественную оценку вирусных антигенов при изготовлении вакцин, диагностических препаратов и т. д.*

ИФА используют и для определения уровня антител в ретроспективной серодиагностике вирусных болезней, при проведении мониторинга эпизоотической обстановки, при изучении механизмов формирования иммунитета и роли различных факторов иммунной системы в патогенезе вирусных болезней.

В основе реакции иммуноферментного анализа лежит принцип взаимодействия между антигенами (АГ) вируса и специфическими антителами (АТ), связанными с ферментом (АТ–ф–конъюгат), с образованием комплекса антиген – антитело (АГ–АТ–ф). Индикатором в реакции является ферментночувствительное вещество (субстрат), которое при окислении вызывает окрашивание реакционной смеси (рис. 12).

удаляют сыворотку, лунки промывают буфером.

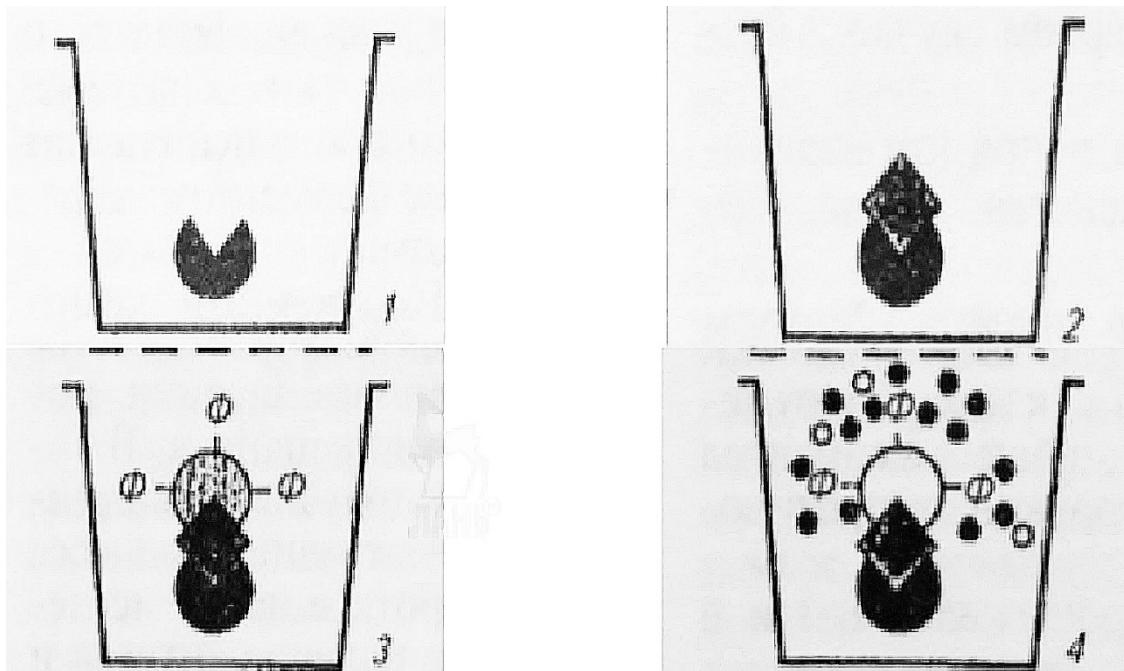


Рисунок 13 – Схема «сэндвич»-варианта иммуноферментного анализа

3. Вносят в лунки планшета по 100,0 мкл антивидового ферментативного конъюгата и инкубируют. Затем удаляют конъюгат, лунки промывают буфером.

4. Вносят в лунки планшета по 100,0 мкл субстратно-хромогенной смеси и инкубируют. Реакцию останавливают добавлением стоп-раствора.

5. Учет реакции проводят путем сканирования оптической плотности. Зависимость между оптической плотностью и антителами в сыворотке прямо пропорциональная: чем больше концентрация антител, тем выше значение оптической плотности. В случае визуального учета реакции сравнивают цвет растворов с антителами в опытных и контрольных лунках.

Достоинства метода ИФА являются его высокая чувствительность и специфичность, возможность использования в ранней диагностике болезни и в изучении динамики инфекционного процесса. Кроме того, простая методика выполнения реакции, вплоть до полной ее автоматизации, позволяет одновременно проводить достаточно большое число исследований.

Однако этот метод не исключает возможность получения и некоторого процента недостоверных результатов исследований, а также требует высоких затрат на высокотехнологичное оборудование и коммерческие тест-системы, в особенности зарубежных производителей.

Контрольные вопросы

1. В чем принцип реакции иммуноферментного анализа?
2. В чем состоит методика сэндвич-варианта иммуноферментного анализа?
3. Как проводят учет результатов иммуноферментного анализа?

ТЕМА 10. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕАКЦИИ ДИФФУЗИОННОЙ ПРЕЦИПИТАЦИИ

Цель занятия – изучить реакцию диффузионной преципитации и ее применение в диагностике вирусологических заболеваний.

Задания:

- 1) изучить реакцию диффузионной преципитации;
- 2) овладеть методикой постановки реакции.

Краткие теоретические сведения

Реакция диффузионной преципитации (РДП), или реакция иммунной диффузии (РИД), основана на способности молекул антигенов и антител диффундировать между молекулами агарового геля.

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.

Методика постановки реакции диффузионной преципитации 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, последствие 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 негомолгичны, полосы преципитации не образуется.

Основные задачи реакции диффузионной преципитации:

1) обнаружение в сыворотке крови антител, гомологичных данному антигену (например, вирусу); если в сыворотке содержатся антитела к антигену, между лунками с антителом и антигеном образуется полоса преципитации, отсутствующая между лунками с контрольными компонентами;

2) обнаружение в материале антигена, гомологичного известным антителам сыворотки; при наличии в исследуемом материале антигена, гомологичного антителам сыворотки, между антигеном и антителом должна образоваться полоса преципитации, отсутствующая между остальными лунками;

3) идентификация неизвестного вируса может быть произведена в РДП с неизвестным антигеном и сывороткой, содержащей антитела к известным антигенам; если полоса преципитации образовалась, значит, исследуемый антиген гомологичен антителам сыворотки;

4) титрование антител сыворотки.

РДП может быть поставлена в чашках Петри, на предметных стеклах и в капиллярах. Наиболее широкое применение в практике нашел метод постановки РДП на предметных стеклах. Для его осуществления необходимо иметь обезжиренные предметные стекла, градуированные пипетки на 2–5 мл и пастеровские пипетки; трубку диаметром около 5 мм с острыми краями или специальный штамп; влажную камеру; ученическое перо или другой инструмент,

пригодный для извлечения агарового геля из лунки; 1,0–1,5-процентный агар на физрастворе или фосфатном буфере с рН – 7,2–7,4; антигены; сыворотки.

Специфические антигены и сыворотки должны быть в высоких титрах, обеспечивающих образование комплекса антиген + антитело в количестве, достаточном для образования четко видимой полосы преципитации.

Реакция диффузионной преципитации в ветеринарной практике используют в диагностике бешенства, лейкоза крупного рогатого скота, болезни Марека, инфекционной анемии лошадей и др.

Реакция относится к экспресс-методам диагностики, очень простая и не требует стерильности в выполнении. Однако она обладает низкой чувствительностью, в связи с чем не всегда представляется возможным визуально обнаружить преципитат в агаровом покрытии.

Именно поэтому специфические антигены и антитела, используемые в реакции, должны находиться в достаточной концентрации, чтобы можно было с высокой степенью вероятности выявлять линии преципитации.

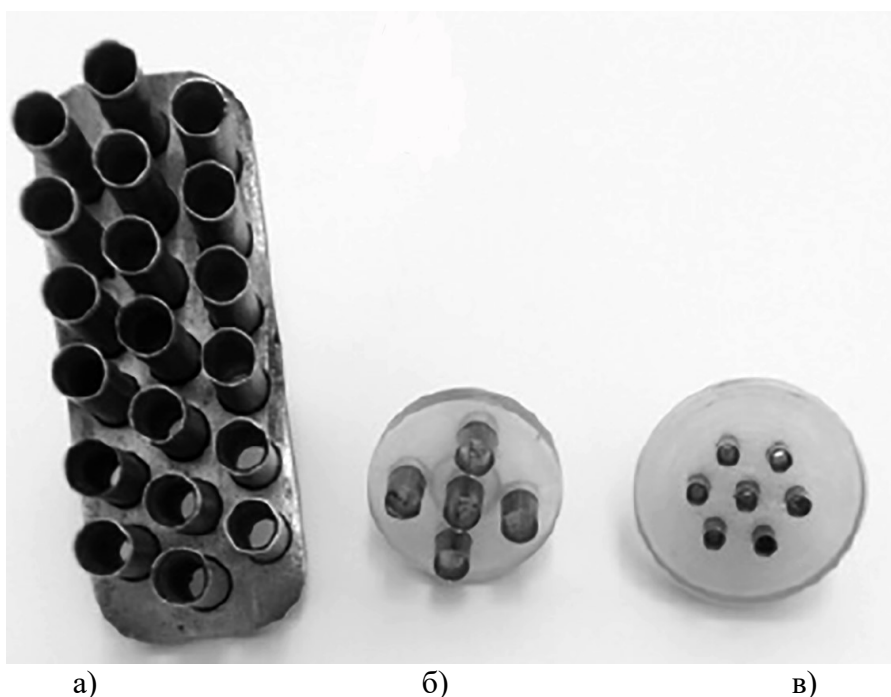
Методика постановки реакции диффузионной преципитации:

1. Готовят 1,0-процентный раствор агара на дистиллированной воде и нагревают его на водяной бане в течение 60–90 минут до образования коллоидного раствора (золь).

2. Наливают раствор расплавленного агара ровным слоем на предметное стекло (или чашку Петри), расположенное на горизонтальной поверхности, сначала по периметру, а потом быстро заполняя середину стекла. Толщина агара должна не превышать 1,5–2,0 мм. Не следует допускать образования пузырей и волн в слое агара. Раствор оставляют при комнатной температуре до затвердевания агарового покрытия (агаровый гель).

3. Вырезают в агаре лунки диаметром 5,0 мм (2,0 мм – для микрометода РДП) на расстоянии 3,0 мм друг от друга. Для этого можно использовать либо специальные штампы для РДП, представляющие собой трубочки одинакового

диаметра с остро заточенными краями, расположенные на одной плоскости и на одинаковом расстоянии друг от друга (рис. 14); либо самостоятельно изготовленные бумажные трафареты, с количеством лунок, расположенных строго в соответствии с оригинальным штампом. Такой трафарет помещают под стекло с застывшим агаровым гелем, и с помощью любой трубки заданного диаметра вырезают лунки. Количество и расположение лунок определяется диагностической задачей.



а) используется в диагностике бешенства; б) используется для постановки РДП макрометодом ($\varnothing$ лунки = 5,0 мм); в) используется для постановки РДП микрометодом ($\varnothing$ лунки = 2,0 мм)

Рисунок 14 – Штампы для реакции диффузионной преципитации

4. Вносят в лунки компоненты реакции (АГ, АТ). При этом лунка должна быть полностью заполнена. Одновременно с исследуемыми пробами в лунки вносят положительные контроли – антиген специфический и сыворотку специфическую; и отрицательные контроли, не содержащие вирусных антигенов (например, физиологический раствор) и специфических противовирусных антител (например, сыворотка крови от здорового донора).

Предметные стекла помещают во влажную камеру на инкубацию в течение 6–12–24–48–72 часов при температуре 37 °С. Через 48–72 часов препараты можно высушить и окрасить раствором амидного черного, что позволяет сохранять результат реакции длительное время и создает возможность документирования результата путем фотографирования.

5. Проводят учет результата РДП визуально по линии преципитации.

Реакцию диффузионной преципитации используют для индикации и идентификации вируса, для обнаружения и определения титра антител в сыворотке крови.

Контрольные вопросы

1. В чем принцип реакции диффузионной преципитации?
2. По какой методике ставят реакцию диффузионной преципитации?
3. В чем достоинства и недостатки реакции диффузионной преципитации?

ТЕМА 11. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕАКЦИИ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ

Цель занятия – изучить реакцию нейтрализации и ее применение в диагностике вирусологических заболеваний.

Задания:

- 1) изучить реакцию нейтрализации;
- 2) овладеть методикой определения титра антител в реакции нейтрализации.

Краткие теоретические сведения

Реакция нейтрализации (РН) основана на взаимодействии антигенов вириона вируса с гомологичными антителами с образованием комплекса, что приводит к нейтрализации инфекционной активности вируса. Индикатором инфекционной активности вируса является чувствительная живая система (лабораторные животные, куриные эмбрионы, культура клеток). Чувствительную систему и метод ее заражения выбирают с учетом тропизма вируса (биопроба на тест-объектах).

Положительный результат реакции нейтрализации учитывают по результатам биопробы:

- 1) на лабораторных животных: отсутствует гибель, симптомы болезни и патологические изменения в органах и тканях;
- 2) на куриных эмбрионах: отсутствует гибель, патологические изменения в оболочках или тканях зародыша, отрицательная реакция гемагглютинации;
- 3) в культуре клеток: отсутствуют признаки цитопатического действия или бляшки, отрицательная реакция гемагглютинации.

Так как неизвестно, какое количество инфекционных единиц вируса или

в каком титре антитела содержатся в исследуемом материале, то перед реакцией готовят последовательные разведения данного материала. Вирусосодержащий материал, как правило, разводят с кратностью 10, а сыворотку крови – с кратностью 2.

Второй стандартный специфический компонент (референс) берут в реакцию или в постоянном рабочем разведении (сыворотка), или в постоянной рабочей дозе (вирус) соответственно. Для референс-вируса таким стандартом является его инфекционный титр, равный 102 ЭД₅₀/мл (103 ЭД₅₀/мл).

Реакцию нейтрализации используют, во-первых, для идентификации вируса, во-вторых – для обнаружения антител и определения титра антител.

Методика идентификации вируса в реакции нейтрализации:

1. Готовят два ряда последовательных 10-кратных разведений исследуемого вирусосодержащего материала.

2. Добавляют к каждому разведению вируса первого ряда такой же объем референс-сыворотки (специфическая сыворотка, содержащая антитела против антигенов вируса, который идентифицируют в исследуемом материале) в постоянном рабочем разведении.

3. Добавляют к каждому разведению вируса второго ряда такой же объем отрицательной сыворотки.

4. Оставляют реакционные смеси (вирус + сыворотка) на контакт в течение 90–60 минут при температуре 20 °С или 37 °С соответственно.

5. Заражают равными объемами каждой реакционной смеси (вирус + сыворотка) четное количество, но не менее четырех тест-объектов.

6. Проводят учет результата биопробы в каждой группе тест-объектов, принимая за положительный результат инфекционное действие вируса, за отрицательный – его отсутствие.

7. Рассчитывают титр вируса в реакционной смеси с отрицательной сывороткой (ТВ + SN) и титр вируса со специфической сывороткой (ТВ + SS).

8. Определяют индекс нейтрализации (ИН) вируса по следующей формуле:

$$\text{ИН} = \frac{T_{B+SN}}{T_{B+SS}} \quad (1)$$

Индекс нейтрализации показывает, во сколько раз специфическая сыворотка снижает инфекционный титр вируса по сравнению с отрицательной сывороткой.

Индекс тем больше, чем выше концентрация вируса в исследуемой пробе.

Принято, что, если $\text{ИН} < 10^1$ – результат реакции нейтрализации отрицательный, $10^1 < \text{ИН} < 10^2$ – результат сомнительный; $\text{ИН} > 10^2$ – результат положительный.

Отрицательный результат реакции нейтрализации по индексу нейтрализации свидетельствует о том, что в исследуемом материале отсутствовал вирус, гомологичный специфической сыворотке, то есть комплекс АГ–АТ между антигенами вируса и специфическими антителами сыворотки в реакции нейтрализации не образовывался.

Положительный результат реакции нейтрализации по индексу нейтрализации свидетельствует о полной гомологии антигенов вируса и специфических антител в сыворотке, то есть в комплексе АГ–АТ вирус был нейтрализован специфическими антителами сыворотки и полностью утратил инфекционную активность (или репродуцировался с очень низким инфекционным титром). При том, что в присутствии отрицательной сыворотки вирус накапливался в живой системе в высоком инфекционном титре.

В случае сомнительного результата реакцию рекомендуется повторить.

Методика исследования сыворотки крови в реакции нейтрализации.

Перед реакцией исследуемые пробы сыворотки крови освобождают от термо-

лабильных неспецифических ингибиторов (могут вызывать ложноположительные результаты реакции) методом прогревания на водяной бане в диапазоне температур от 56 до 62 °С в зависимости от вида хозяина сыворотки: сыворотку крови крупного рогатого скота, лошади, морской свинки – при 56 °С; петуха, гуся, утки – при 58 °С; крысы, мыши, кролика – при 60 °С; овцы, козы – при 62 °С.

1. Готовят последовательные двукратные разведения исследуемой сыворотки.

2. Добавляют к каждому разведению сыворотки равный объем референс-вируса (специфический вирус, антитела против которого определяют в исследуемой сыворотке), имеющего инфекционный титр 10^2 ЭД₅₀/мл или 10^3 ЭД₅₀/мл.

3. Оставляют реакционные смеси (вирус + сыворотка) на контакт на 90–60 минут при температуре 20 °С или 37 °С соответственно.

4. Заражают равными объемами каждой реакционной смеси четное количество, но не менее четырех тест-объектов.

5. Проводят учет результата биопробы в каждой группе живых систем, принимая за положительный результат защиту тест-объекта от действия вируса, за отрицательный – инфекционное действие вируса на объект.

6. Рассчитывают разведение сыворотки, в котором она защищает 50 % тест-объектов от действия 10^2 ЭД₅₀/мл (10^3 ЭД₅₀/мл).

Полученный результат и есть титр вируснейтрализующих антител.

Пример расчета. Требуется определить в реакции нейтрализации титр вируснейтрализующих антител в сыворотке крови кролика, иммунизированного вирусом ньюкаслской болезни.

В качестве тест-объектов использовали восемь групп куриных эмбрионов (по четыре эмбриона в группе), которым вводили по 0,2 мл реакционной смеси

Тема 11. Лабораторная диагностика вирусных болезней с применением реакции нейтрализации (РН)

вирус + сыворотка. Сыворотка предварительно была прогрета при температуре 58 °С и разведена двукратно от (1:2) до (1:256), вирус ньюкаслской болезни имел титр 10^2 ЭЛД₅₀/мл.

Результат биопробы (табл. 2) учитывали по гибели эмбрионов:

- 1) положительный – эмбрионы живые (есть защита сывороткой);
- 2) отрицательный – гибель эмбрионов (нет защиты).

Таблица 2 – Результаты титрования сыворотки в РН

Разведение сыворотки ¹	Количество КЭ в группе (n)	Результат биопробы	
		«+» КЭ выжили (r)	«-» КЭ не выжили
1: 2 = $10^{-0,3}$	4	4	0
1: 4 = $10^{-0,6}$	4	4	0
1: 8 = $10^{-0,9}$	4	3	1
1: 16 = $10^{-1,2}$	4	2	2
1: 32 = $10^{-1,5}$	4	2	2
1: 64 = $10^{-1,8}$	4	1	3
1: 128 = $10^{-2,1}$	4	1	3
1: 256 = $10^{-2,4}$	4	0	4
¹ Значения двукратных разведений (1: 2, 1: 4, 1: 8, ..., 1: 256) переведены в десятичные логарифмы.			

По формуле Кербера (2) рассчитываем разведение сыворотки, в котором она защищает 50 % куриных эмбрионов от 10^2 ЭЛД₅₀/мл вируса ньюкаслской болезни:

$$\lg \text{ЭД}_{50} = \lg D + \frac{\lg d}{2} - \lg d \cdot \frac{\sum r}{n} \quad (2)$$

где ЭД₅₀ – искомое разведение сыворотки;

D – наибольшее разведение сыворотки, еще обеспечивающее 100-процентный эффект защиты от вируса;

d – коэффициент разведения сыворотки;

$\frac{\sum r}{n}$ – отношение суммы тест-объектов, положительно реагирующих на сыворотку ($\sum r = r_1 + r_2 + r_3 + \dots + r_n$), к количеству объектов в группе (n).

$$\lg ЭД_{50} = -0,6 + \frac{0,3}{2} - 0,3 \cdot \frac{(0 + 1 + 1 + 2 + 2 + 3 + 4)}{4},$$

$$\lg ЭД_{50} = -0,6 + 0,15 - 0,3 \cdot 0,25 = -0,45 - 0,075 = -0,525$$

Таким образом, исследуемая сыворотка в разведении $1:10^{1,425}$ ($10^{-1,425}$) защищает 50 % куриных эмбрионов от 10^2 ЭД₅₀/мл вируса ньюкаслской болезни. По таблице десятичных антилогарифмов $10^{1,425}$ соответствует значению 26,5. Титр вируснейтрализующих антител в исследуемой сыворотке – 1:26,5.

Достоинством реакции нейтрализации является ее высокая специфичность и достоверность результатов. Это позволяет считать ее *золотым стандартом* в серологических исследованиях.

К недостаткам метода относят трудоемкость реакции. В частности, необходимо соблюдение стерильных условий, использование живых систем, длительное наблюдение за биопробой, а также статистическая обработка полученных данных.

Данную реакцию не относят к экспресс-методам исследования, так как перед ее постановкой требуется провести индикацию вируса в патологическом материале методом биопробы в живой системе.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается принцип реакции нейтрализации?
2. В чем состоит методика титрования сыворотки крови в реакции нейтрализации?
3. С какой целью рассчитывают индекс в реакции нейтрализации?
4. В чем видите достоинства и недостатки реакции нейтрализации?

ТЕМА 12. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕАКЦИИ НЕПРЯМОЙ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Цель занятия – изучить реакцию непрямой гемагглютинации и ее применение в диагностике вирусологических заболеваний.

Задания:

- 1) изучить реакцию непрямой гемагглютинации;
- 2) ознакомиться с методами производства эритроцитарных диагностикумов;
- 3) овладеть методикой определения титра антител в реакции непрямой гемагглютинации.

Краткие теоретические сведения

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) заключается в том, что эритроциты, на которых предварительно и необратимо адсорбированы или специфические антигены вируса, или специфические противовирусные антитела, приобретают способность агглютинироваться в присутствии или гомологичных антител, или гомологичных антигенов вируса.

Реакцию учитывают визуально по агглютинации эритроцитов, которые используются в реакции как носители адсорбированных на них специфических белков (АГ или АТ). Положительный результат РНГА – это «зонтик», отрицательный – «пуговка».

Следует отличать реакцию непрямой гемагглютинации от реакции гемагглютинации. В реакции гемагглютинации эритроциты агглютинируются в результате взаимодействия их рецепторов с гемагглютинирующими белками вируса (гемагглютинины) (рис. 15), в реакции непрямой гемагглютинации – через комплекс АГ–АТ (рис. 16).

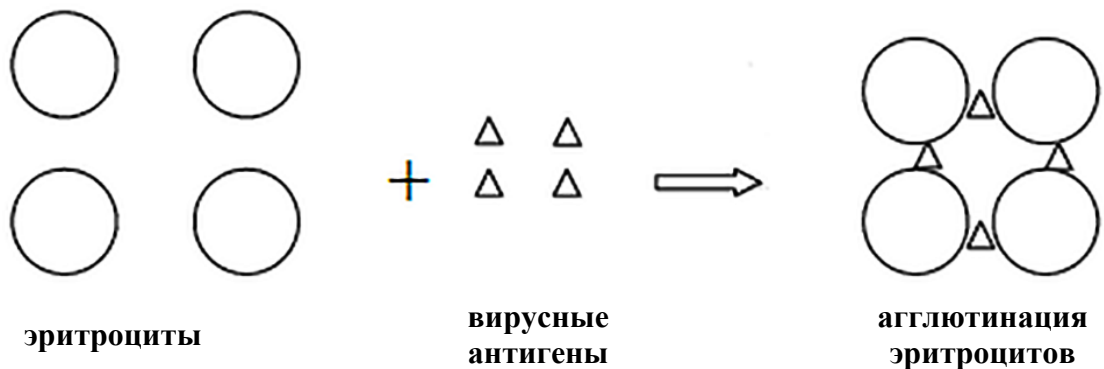


Рисунок 15 – Схема реакции гемагглютинации

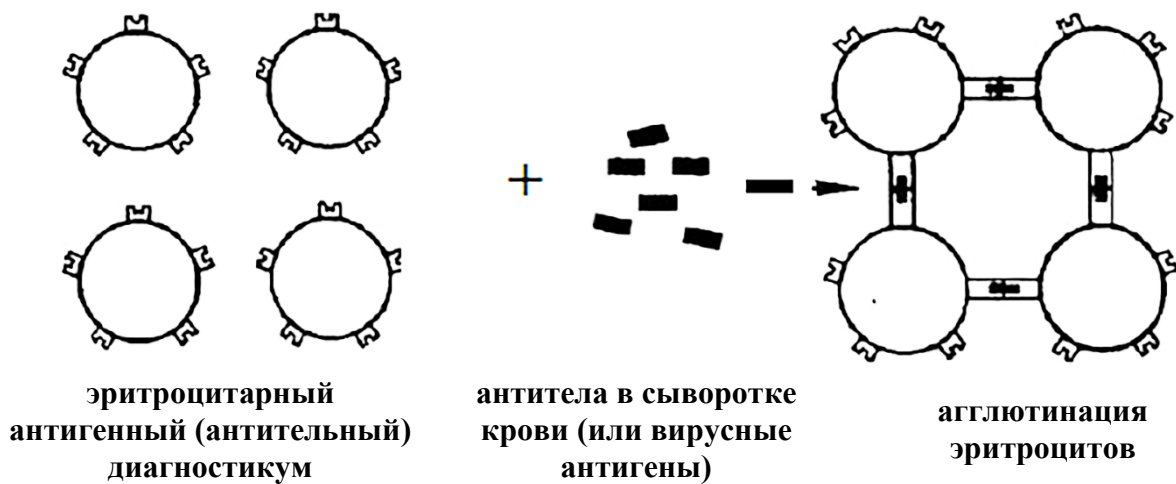


Рисунок 16 – Схема реакции непрямой гемагглютинации

Эритроциты, сенсibilизированные вирусными антигенами, называются эритроцитарным антигенным диагностикумом. Он используется в РНГА для обнаружения антител в сыворотке крови и определения титра антител.

Эритроциты, сенсibilизированные специфическими антителами, называются эритроцитарным антителенным диагностикумом. Он используется в РНГА для индикации и идентификации вирусов.

Этапы приготовления эритроцитарных диагностикумов:

1. Получают эритроциты от барана или птицы (куры, индейки, утки) по общепринятой методике.
2. Стабилизируют эритроциты 50-процентным раствором формалина. Для этого 50-процентную взвесь отмытых изотоническим раствором хлорида

натрия и осажденных центрифугированием при скорости 1 000 оборотов в минуту в течение 15 минут эритроцитов соединяют с равным объемом (1:1) 50-процентного раствора формалина. Инкубируют при температуре 37 °С в течение двух часов с периодическим перемешиванием через каждые 30 минут. Затем трижды отмывают 0,15 М раствором NaCl (pH 7,2).

3. Танизируют эритроциты путем смешивания равных объемов (1:1) 3-процентной взвеси эритроцитов на физиологическом растворе (pH 7,2) и растворе танина в разведении (1:20 000). Инкубируют 10–15 минут при температуре 37 °С и центрифугируют при скорости 1 000 оборотов в минуту в течение 15 минут. Удаляют надосадочную жидкость, осадок танизированных эритроцитов трехкратно промывают фосфатным буферным раствором (pH 7,2).

4. Готовят для сенсibilизации 10-процентную взвесь эритроцитов на 0,15 М фосфатном буфере (pH 6,4) и смешивают с равным объемом (1:1) специфических вирусных антигенов. Инкубируют 60 минут при температуре 37 °С, перемешивая через каждые 15 минут. Затем центрифугируют при скорости 1 000 оборотов в минуту в течение 15 минут и трижды промывают фосфатным буферным раствором (pH 7,2).

5. Разводят осадок сенсibilизированных эритроцитов до однопроцентного раствора в фосфатном буферном растворе (pH 7,2) с добавлением одного процента сыворотки кролика (для стабилизации эритроцитов).

6. Хранят готовые эритроцитарные диагностикумы при температуре от 2 до 8 °С и используют в реакции непрямой гемагглютинации в соответствии с инструкцией по применению.

Методика определения титра антител в реакции непрямой гемагглютинации. С использованием эритроцитарного антигенного диагностикума. РНГА ставят микрометодом в специальных иммунологических 96-луночных планшетах.

1. Готовят последовательные двукратные разведения исследуемой пробы

сыворотки крови. Для этого в лунки вносят по 50,0 мкл физиологического раствора (рН 7,2). В лунку № 1 вносят 50,0 мкл исследуемой сыворотки, перемешивают и переносят 50,0 мкл в лунку № 2, перемешивают и 50,0 мкл переносят в лунку № 3 (и так далее до пятой лунки). Из лунки № 5 после перемешивания удаляют 50,0 мкл разведенной сыворотки (1:32).

2. Одновременно в лунках № 6, 7, 8, 9 ставят следующие контроли: в лунку № 6 (контроль исследуемой сыворотки крови на наличие гемагглютининов) вносят 50,0 мкл физиологического раствора и 50,0 мкл неразведенной сыворотки крови; в лунку № 7 (контроль эритроцитарного диагностикума на самоагглютинацию) вносят 50,0 мкл физиологического раствора; в лунку № 8 (контроль активности эритроцитарного диагностикума) вносят 50,0 мкл физиологического раствора и 50,0 мкл сыворотки специфической (SS); в лунку № 9 (контроль специфичности эритроцитарного диагностикума) вносят 50,0 мкл физиологического раствора и 50,0 мкл сыворотки отрицательной (SN).

3. Вносят во все лунки (кроме лунки № 6) 50,0 мкл эритроцитарного антигенного диагностикума (ЭАС), в лунку № 6 – 50,0 мкл несенсибилизированных эритроцитов.

4. Инкубируют один час при комнатной температуре.

5. Учитывают результаты РНГА по гемагглютинации.

6. Определяют титр антител в исследуемой сыворотке крови.

За титр антител в реакции непрямой гемагглютинации принимают то наибольшее разведение сыворотки крови, которое еще вызывает агглютинацию сенсibilизированных эритроцитов не менее, чем на два «креста» (++).

Протокол определения титра антител в РНГА представлен в таблице 3.

Согласно результатам агглютинации сенсibilизированных эритроцитов, титр антител в сыворотке SX равен 1:8 – большее из двух разведений сыворотки с агглютинацией на «++».

*Тема 12. Лабораторная диагностика вирусных болезней
с применением реакции непрямой гемагглютинации (РНГА)*

Таблица 3 – Протокол определения титра антител в реакции непрямой гемагглютинации

Номера лунок	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Компоненты реакции	Разведения сыворотки SX					Контроли			
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	SX	ЭАС		
Физраствор, мкл	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Исследуемая сыворотка SX	50,0	перенос по 50,0				50,0	–	–	–
Сыворотка специфическая SS	–	–	–	–	–	–	–	50,0	–
Сыворотка отрицательная SN	–	–	–	–	–	–	–	–	50,0
ЭАС	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	–	50,0	50,0	50,0
Эритроциты несенсибилизированные	–	–	–	–	–	50,0	–	–	–
Учет результата	+++	++	++	–	–	–	–	+++	–

Реакция непрямой гемагглютинации относится к экспресс-методу, характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, дает возможность проводить раннюю диагностику болезни, а также отличается простой методикой выполнения и не требует стерильных условий.

Однако следует отметить, что качество и стабильность эритроцитарных диагностикумов напрямую зависит от степени очистки антигенов, а также от индивидуально подобранных для каждого антигена вируса условий фиксации, танизации и сенсибилизации эритроцитов.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается принцип реакции непрямой гемагглютинации?
2. В чем отличие непрямой гемагглютинации от прямой?
3. В чем заключается методика реакции непрямой гемагглютинации для определения титра антител в сыворотке крови?

ТЕМА 13. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ РЕАКЦИИ ТОРМОЖЕНИЯ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Цель занятия – изучить реакцию торможения гемагглютинации и ее применение в диагностике вирусологических заболеваний.

Задания:

- 1) изучить реакцию торможения гемагглютинации;
- 2) овладеть методикой определения титра антител в реакции торможения гемагглютинации.

Краткие теоретические сведения

Реакция торможения (задержки) гемагглютинации (РТГА, РЗГА) основана на том, что антитела при взаимодействии с гомологичными антигенами гемагглютинирующих вирусов образуют комплекс антиген – антитело, в котором вирус утрачивает не только инфекционную, но и гемагглютинирующую активность. В качестве индикатора свободного несвязавшегося вируса в реакции используют эритроциты, которые получены от животного того вида, в отношении которого вирус проявляет агглютинирующую активность. Признаком положительной реакции является отсутствие (торможение или задержка) гемагглютинации.

Реакцию торможения гемагглютинации используют, во-первых, для идентификации вируса, во-вторых – для обнаружения антител и определения титра антител. Так как неизвестно, каково количество антигена гемагглютинирующего вируса или в каком титре антитела содержатся в исследуемом материале, то перед реакцией данный материал разводят с кратностью равной двум. Второй стандартный специфический компонент (референс) берут в реакцию или в постоянном рабочем разведении (сыворотка), или в постоянной рабочей дозе (вирус) соответственно. Для референс-вируса таким стандартом

*Тема 13. Лабораторная диагностика вирусных болезней
с применением реакции торможения гемагглютинации (РТГА)*

является его гемагглютинирующий титр, равный 4 ГАЕ.

Методика определения титра антител в реакции торможения гемагглютинации показана в таблице 4. РТГА ставят микрометодом в специальных иммунологических 96-луночных планшетах.

Таблица 4 – Протокол титрования сыворотки в реакции торможения гемагглютинации

Номера лунок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Компоненты реакции	Разведения сыворотки SX					Контроли					
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	Эр.	SX	АГ (вируса) ГАЕ			
								2	1	1/2	1/4
Физраствор, мкл	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Исследуемая сыворотка SX	50,0	перенос по 50,0				—	50,0	—	—	—	—
Вирус Т=4 ГАЕ	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	—	—	50,0	перенос по 50,0		
Контакт в течение 30–40 минут при комнатной температуре											
1-процентная суспензия эритроцитов	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0	50,0
Контакт в течение 15–20 минут при комнатной температуре											
Учет результата	—	—	—	+++	+++	—	—	+++	++	+	—

1. Готовят последовательные двукратные разведения исследуемой пробы сыворотки крови. Для этого вносят в лунки с № 1 по № 5 по 50,0 мкл физиологического раствора (рН 7,2); далее в лунку № 1 вносят 50,0 мкл исследуемой сыворотки; перемешивают и переносят 50,0 мкл в лунку № 2; перемешивают и 50,0 мкл переносят в лунку № 3 (и так далее до пятой лунки). Удаляют из лунки № 5 после перемешивания 50,0 мкл сыворотки в разведении 1:32.

2. Добавляют к каждому разведению сыворотки по 50,0 мкл 4 ГАЕ референс-вируса.

3. Ставят одновременно следующие контроли в лунках № 6, 7, 8, 9, 10, 11: в лунке № 6 (контроль исследуемой сыворотки крови на наличие гемагглютининов) – вносят 50,0 мкл физиологического раствора и 50,0 мкл неразведенной сыворотки крови; в лунке № 7 (контроль эритроцитов на самоагглютинацию) –

вносят 100,0 мкл физиологического раствора; в лунках № 8, 9, 10, 11 (контроль рабочей дозы вируса 4 ГАЕ) – вносят 50,0 мкл физиологического раствора; затем в лунку № 8 вносят 50,0 мкл вируса в титре 4 ГАЕ; перемешивают и переносят 50,0 мкл в лунку № 9; перемешивают и переносят 50,0 мкл в лунку № 10; перемешивают и переносят 50,0 мкл в лунку № 11. Из лунки № 11 после перемешивания удаляют 50,0 мкл вируса.

4. Инкубируют 30–40 минут при комнатной температуре.
5. Вносят во все лунки по 50,0 мкл однопроцентной суспензии эритроцитов.
6. Инкубируют 15–20 минут при комнатной температуре.
7. Учитывают результат по гемагглютинации.
8. Определяют титр антител в исследуемой сыворотке крови.

За титр антител в реакции торможения гемагглютинации принимают наибольшее разведение сыворотки, которое полностью тормозит гемагглютинацию.

Таким образом, титр антител в сыворотке SX равен 1:8.

При постановке реакции торможения гемагглютинации необходимо иметь в виду, что чем ниже титр вируса, взятого в РТГА, тем меньшие концентрации антител можно обнаружить в сыворотке крови. Титр вируса 4 ГАЕ – наиболее низкий, еще позволяющий получать достоверную гемагглютинацию, так как при разведении вируса равным объемом сыворотки титр понижается до 2 ГАЕ. Это означает, что при добавлении в каждую лунку суспензии эритроцитов в объеме, равном суммарному объему вируса и сыворотки, количество вирионов будет достаточным для агглютинации 100 % эритроцитов. Если взять титр вируса ниже 4 ГАЕ, то возникает опасность не получить феномена гемагглютинации, так как количество вирионов может оказаться меньшим, чем необходимо для агглютинации 50 % эритроцитов.

На точность определения титра антител влияет также кратность разведения сыворотки крови. Чем меньше кратность разведения, тем точнее будет значение титра антител. Поэтому принято использовать двукратные разведения сыворотки.

Для обнаружения и определения титра антител пробы исследуемой сыворотки предварительно освобождают от термолабильных и термостабильных неспецифических ингибиторов, способных подавлять гемагглютинирующие свойства вирусов. От термолабильных ингибиторов – методом прогревания на водяной бане в диапазоне температур от 56 до 62 °С в зависимости от вида хозяина сыворотки: сыворотку крови крупного рогатого скота, лошади, морской свинки – при 56 °С; петуха, гуся, утки – при 58 °С; крысы, мыши, кролика – при 60 °С; овцы, козы – при 62 °С.

Для освобождения от термостабильных ингибиторов в сыворотку вносят один из сорбентов (риванол, иодат калия, бентонид, каолин, активированный уголь) или пропускают через нее (предварительно разведя (1:10) дистиллированной воды) углекислый газ так, чтобы пузырьки газа проходили через сыворотку в течение 3–5 минут до ее помутнения. Затем сыворотку центрифугируют при скорости 2 000–2 500 оборотов в минуту в течение 10-20 минут и отбирают надосадочную жидкость (ингибиторы остаются в осадке). Для восстановления изотонии к сыворотке добавляют физиологический раствор в объеме, равном 0,1 объема разведенной сыворотки.

К достоинствам реакции торможения гемагглютинации относят ее специфичность и чувствительность, простую технику постановки и возможность ранней диагностики болезни. Однако реакция не относится к экспресс-методам, так как перед ее постановкой требуется провести индикацию гемагглютинирующего вируса в капельной РГА.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается принцип реакции торможения гемагглютинации?
2. Какие вирусы можно идентифицировать с помощью реакции торможения гемагглютинации?
3. Как подготовить сыворотку крови для реакции торможения гемагглютинации?
4. В чем состоит методика титрования сыворотки в реакции торможения гемагглютинации? Что принимают за титр сыворотки?
5. Почему реакцию торможения гемагглютинации не относят к экспресс-методам?

ТЕМА 14. ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Цель занятия – изучить полимеразную цепную реакцию и ее применение в диагностике вирусологических заболеваний.

Задания:

- 1) ознакомиться с методикой выделения нуклеиновых кислот вирусов;
- 2) ознакомиться с методикой постановки полимеразной цепной реакции и детекции ее результатов методом горизонтального электрофореза.

Краткие теоретические сведения

В основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) лежит амплификация специфического участка ДНК вируса за счет многократного повторения циклов денатурации ДНК в исследуемой пробе, отжига специфических олигонуклеотидных затравок (праймеров) и синтеза комплементарных цепей ДНК с помощью фермента Таq-полимеразы.

В ветеринарной практике при диагностике вирусных болезней животных методом ПЦР используют коммерческие тест-системы.

Как правило, тест-система состоит из четырех комплектов:

- 1) комплект для выделения ДНК, включающий лизирующий раствор, растворы для отмывки, суспензию сорбента, буфер для элюции ДНК;*
- 2) комплект для проведения ПЦР;*
- 3) комплект для электрофоретического анализа продуктов ПЦР, состоящий из концентрата буфера с бромидом этидия и агарозы для электрофореза;*
- 4) комплект контрольных образцов: положительный контрольный образец; отрицательный контрольный образец, внутренний контрольный образец.*

Методика проведения ПЦР-анализа. ПЦР-анализ состоит из трех этапов: выделения нуклеиновых кислот вируса; амплификации; детекции продуктов амплификации.

Подготовку проб проводят в соответствии с инструкцией к тест-системе.

Нуклеиновые кислоты вирусов выделяют из 100,0 мкл вирусосодержащей суспензии с помощью комплекта для выделения ДНК.

Этап I. Выделение ДНК вирусов. Цель выделения ДНК вируса – концентрирование в малом объеме (100,0 мкл), удаление ингибиторов полимеразной цепной реакции и получение очищенного препарата ДНК.

Для этого 100,0 мкл подготовленной пробы помещают в лизирующий раствор для лизиса клеток и деструкции нуклеопротеидных комплексов. Затем ДНК сорбируют на сорбенте, проводят инактивацию эндогенных и экзогенных нуклеаз (ферменты, разрушающие нуклеиновые кислоты), и удаляют ингибиторы ПЦР путем трехкратных отмывок. После элюции ДНК (десорбирование) получают очищенный препарат суммарной ДНК. Пробы готовы к постановке полимеразной цепной реакции.

Этап II. Постановка реакции амплификации. Предварительно готовят пробирки с реакционной смесью компонентов для постановки амплификации в соответствии с инструкцией к тест-системе.

Реакционная смесь состоит из следующих компонентов: буферного раствора, четырех видов дезоксинуклеотидтрифосфатов, праймеров, ДНК-полимеразы, хлорида магния, исследуемого препарата суммарной ДНК. На поверхность реакционной смеси наносят каплю минерального масла для предотвращения ее испарения. Объем реакционной смеси составляет 25,0 мкл.

Подготовленные пробирки помещают в лунки амплификатора, запускают программу в соответствии с инструкцией к тест-системе.

После окончания реакции пробирки готовы к анализу продуктов полимеразной цепной реакции методом горизонтального электрофореза.

Этап III. Электрофоретический анализ продуктов полимеразной цепной реакции. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР заключается в разделении фрагментов ДНК по молекулярной массе в агарозном геле.

Для этого готовят рабочий электрофорезный буфер и расплавляют агарозу. Агарозный гель заливают в форму электрофоретической камеры, устанавливают гребенки для получения лунок и дают полностью застыть (в течение 30 минут при комнатной температуре).

Далее осторожно вынимают гребенки, не повредив лунки. Помещают подложку с готовым гелем в камеру. Лунки должны располагаться ближе к отрицательному электроду, так как ДНК перемещается по направлению к положительному. Заливают в камеру готовый буфер так, чтобы он покрывал гель на 5,0 мм сверху.

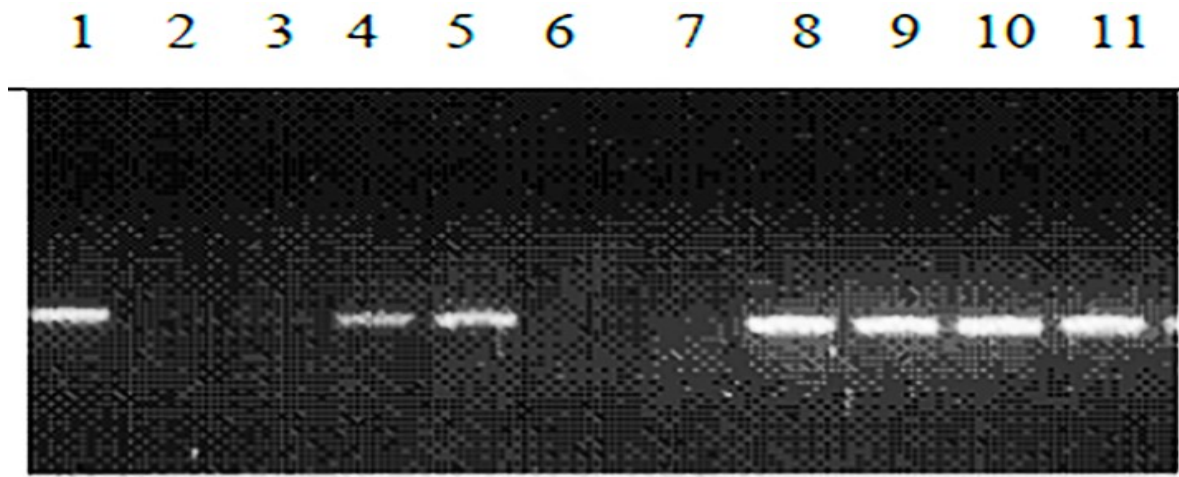
После амплификации отбирают из пробирок по 10,0–15,0 мкл проб и вносят в лунки геля. В каждом ряду дорожек (трек) геля должен быть обязательно представлен положительный и отрицательный контроли.

После электрофореза гель переносят на трансиллюминатор, расположив полосы горизонтально лунками вверх. При просматривании геля глаза и лицо должны быть защищены специальной маской или стеклянной пластиной.

Учет и интерпретация результатов. Учет результатов ПЦР-анализа проводится по наличию или отсутствию на электрофореграмме специфических полос амплифицированной ДНК. Учет следует начинать с результатов амплификации контролей. В дорожке, соответствующей положительному контролю, должна быть яркая специфическая светящаяся полоса на определенном уровне. В дорожках, соответствующих отрицательным контролям, такая полоса отсутствует.

Положительными считаются образцы, которые содержат специфическую светящуюся полосу большей или меньшей интенсивности на том же

уровне, что и полоса с положительным контрольным образцом ДНК. Отрицательными считаются пробы, в дорожках которых отсутствует специфическая полоса (рис. 17).



1 – положительный контроль; 2 – отрицательный контроль;
3, 6, 7 – отрицательные пробы; 4, 5, 8, 9, 10, 11 – положительные пробы

Рисунок 17 – Электрофореграмма результатов полимеразной цепной реакции

Результаты анализа не учитывают, если в дорожке отрицательного контроля выявляется специфическая полоса. Возможно, произошла контаминация реактивов или проб. В этом случае результаты анализа считаются недействительными. Требуется повторить анализ проб, а также принять меры по выявлению источника контаминации.

Контрольные вопросы

1. В чем заключается принцип полимеразной цепной реакции?
2. Из каких этапов состоит ПЦР-анализ?
3. В чем заключается методика выделения ДНК?
4. В чем состоит методика амплификации?
5. Как интерпретируют результаты полимеразной цепной реакции?

ТЕМА 15. ПОЛУЧЕНИЕ ВАКЦИН, СЫВОРОТОК

Цель занятия – изучить и освоить методику получения вакцин и сывороток.

Задания:

- 1) ознакомиться с методикой получения вакцин;
- 2) привести примеры схем получения вакцин (приложение Б);
- 3) ознакомиться с методикой получения сывороток;
- 4) привести примеры схем получения сывороток (приложение В).

Краткие теоретические сведения

Иммунобиотехнология основана на реакции антиген (АГ) – антитело (АТ). В качестве примера иммунобиотехнологического генного процесса может служить получение вируса полиомиелита из культуры ткани живого человека для получения вакцины. Биопродукты (вакцины) должны проходить тщательную проверку на безопасность и эффективность.

Вакцины – это препараты, приготовленные из убитых или ослабленных болезнетворных микроорганизмов или их токсинов. Как известно, вакцины применяются с целью профилактики или лечения. Введение вакцин вызывает иммунную реакцию, за которой следует приобретение устойчивости организма человека или животного к патогенным микроорганизмам.

В состав вакцины входят:

- 1) действующий компонент, представляющие специфические антигены;
- 2) консервант, который определяет стабильность вакцины при ее хранении;
- 3) стабилизатор, который продлевает срок годности вакцины;
- 4) полимерный носитель, который повышает иммуногенность антигена.

Под иммуногенностью понимают свойство антигена вызывать иммунный ответ. В роли антигена можно использовать:

1. Живые ослабевшие микроорганизмы.
2. Неживые, убитые микробные клетки или вирусные частицы.
3. Антигенные структуры, извлеченные из микроорганизма.
4. Продукты жизнедеятельности микроорганизмов, в качестве которых используют токсины, как вторичные метаболиты.

Классификация вакцин в соответствии с природой специфического антигена включает: живые; неживые; комбинированные вакцины.

Живые вакцины получают:

- 1) *из естественных штаммов микроорганизмов с ослабленной вирулентностью для человека, но содержащих полный набор антигенов* (в качестве примера можно привести вирус оспы);
- 2) *из искусственных ослабленных штаммов;*
- 3) *часть вакцин получают генно-инженерным способом;* для получения таких вакцин используют штамм, несущий ген чужеродного антигена, например, вирус оспы со встроенным антигеном гепатита В.

Неживые вакцины – это:

- 1) *молекулярные и химические вакцины;* при этом молекулярные вакцины конструируют на основе специфического антигена, который находится в молекулярном виде; эти вакцины могут быть получены и путем химического синтеза или биосинтеза; примерами молекулярных вакцин являются анатоксины (бактериальный экзотоксин, потерявший токсичность в результате длительного воздействия формалина, но сохранивший антигенные свойства; это дифтерийный токсин, столбнячный токсин, ботулинический токсин);

- 2) *корпускулярные вакцины,* которые получают из целой микробной клетки, которая инактивизирована температурой, ультрафиолетовым облучением или химическими методами, например, спиртом.

Комбинированные вакцины. Они комбинируются из отдельных вакцин, превращаясь при этом в поливакцины, которые способны иммунизировать сразу от нескольких инфекций. В качестве примера можно назвать поливакцину АКДС, содержащую дифтерийный и столбнячный анатоксины и коклюшные корпускулярные антигены.

Токсины – как продукты жизнедеятельности микроорганизмов включают две группы:

Первая группа токсинов – экзотоксины (белковые вещества, выделяемые клетками бактерий во внешнюю среду). Они в значительной степени определяют болезнетворность микроорганизмов. Экзотоксины в своем строении имеют два центра. Один из них фиксирует молекулу токсина на соответствующем клеточном рецепторе, второй (токсический фрагмент) – проникает внутрь клетки, где блокирует жизненно важные метаболические реакции. Экзотоксины могут быть термолабильны или термостабильны. Известно, что под действием формалина они теряют токсичность, но сохраняют при этом иммуногенные свойства – такие токсины называются анатоксинами.

Вторая группа токсинов – эндотоксины (являются структурными компонентами бактерий, представляя липополисахариды клеточной стенки грамотрицательных бактерий). Эндотоксины менее токсичны, разрушаются при нагревании до температуры 60–80 °С в течении 20 минут. Эндотоксины выходят из клетки бактерий при ее разложении. При введении в организм эндотоксины вызывают иммунный ответ. Получают сыворотку путем иммунизации животных чистым эндотоксином. Однако эндотоксины относительно слабый иммуноген, и сыворотка не может обладать высокой антитоксической активностью.

Получение вакцин:

Живые бактериальные вакцины. Этот тип вакцин получают наиболее просто. В ферментере выращиваются чистые ослабленные культуры. Существует

четыре основных стадии получения живых бактериальных вакцин: выращивание; стабилизация; стандартизация; лиофильное высушивание.

В этих случаях штаммы продуцентов выращиваются на жидкой питательной среде в ферментере вместимостью до 1–2 м³.

Живые вирусные вакцины. В этом случае вакцины получают путем культивирования штамма в курином эмбрионе или в культурах животных клеток.

Молекулярные вакцины. Чтобы иметь представление об этом типе вакцин, нужно знать, что в этом случае из микробной массы выделяют специфический антиген или экзотоксины. Их очищают, концентрируют. Затем токсины обезвреживают и получают анатоксины. Очень важно, что специфический антиген может быть также получен путем химического или биохимического синтеза.

Корпускулярные вакцины. Их можно получить из микробных клеток, которые предварительно культивируют в ферментере. Затем микробные клетки инактивируют температурой, или ультрафиолетовым облучением, или химическими веществами (фенолами или спиртом).

Сыворотки. *Применение сывороток:*

1. Сыворотки широко используются в случаях профилактики и лечения инфекционных заболеваний.

2. Сыворотки также используются при отравлении ядами микробов или животных – при столбняке, ботулизме, дифтерии (для инактивации экзотоксинов); применяются сыворотки и от яда кобры, гадюки и др.

3. Сыворотки могут быть использованы и для диагностических целей, для создания различных диагностических наборов. В этом случае антитела используются в реакциях образования комплексов с антигенами (антиген (АГ) – антитело (АТ)), когда происходит подтверждение наличия соответствующих антигенов, что может быть использовано в различных реакциях. Профилактическое или лечебное действие сывороток основано на содержащихся в сыворотке антителах.

Для массового получения сыворотки вакцинируют ослон, лошадей. Введение такой сыворотки дает образование пассивного иммунитета, то есть организм получает готовые антитела. Сыворотки, которые получают путем иммунизации животных должны быть на контроле по такому показателю, как титр антител у животных, чтобы брать у них кровь в период максимального содержания антител. Из крови животных выделяют плазму крови, затем из плазмы удаляют фибрин и получают сыворотку.

Другой способ получения сыворотки – из культивируемых животных клеток. Однако главной проблемой в этом случае является обеспечение стабильного роста животных клеток. Дело в том, что клетки животных, изолированные из среды организма, часто не делятся *in vitro*. Для получения положительного результата в этом случае при переносе клеток из организма надо иметь в виду следующие условия этого переноса и его последствия:

1. Нужные нам клетки должны: преобладать в культуре; быстро адаптироваться к новым условиям; быстро расти; должна быть полная стерильность при культивировании; питательные среды должны быть стерильными и при их изготовлении должна быть использована только стерильная вода.

2. При росте клеток *in vitro*, с ними происходят перемены, то есть они теряют способность к дифференциации; дегенерируют (перерождаются); трансформируются.

Все эти перемены происходят с клетками животных вследствие их старения, старения самой архитектуры клеток. Если клеточная популяция сможет поддерживаться в гистологической дифференцированной форме, то они сохраняют свою специализацию.

Нормальные живые клетки растут только на поверхности – это так называемые субстрат зависимые клетки, монослойная культура. Клетки могут расти только до полного закрытия поверхности, и если поверхности нет, то клетки не растут. В этом случае появляется проблема создания достаточной

поверхности для роста клеток. Клетки могут выдерживать не более 50 удвоений, затем они умирают от старости. Задача роста клеток (этот процесс еще называют пролиферацией) связана с увеличением биомассы за счет того, что число клеток умножается на среднюю массу клеток. *Рост клеток может быть достигнут двумя путями:*

- 1) за счет увеличения средней массы – гипертрофия;*
- 2) за счет увеличения числа клеток – гиперплазия.*

Клетки животных обычно в своей массе не увеличиваются, так как их масса удерживается в определенных пределах за счет регуляторных процессов, поэтому, когда говорят о росте животных клеток, то при этом подразумевают только увеличение их числа.

В организме взрослого человека имеется 10^{14} клеток, и в организме человека каждую секунду происходит 20 делений клеток. В организме человека имеется система регуляции деления клеток, представляющая собой комбинированный импульс, поступающий, как сигнал, от гормонов желез внутренней секреции и продуктов метаболизма. Если эта система контроля над ростом клеток будет нарушена, то развивается опухоль. Одной из особенностей многоклеточных животных является степень специализации функций различных клеток тканей и органов, что определяется понятием дифференциации. Таким образом, клетки животных по мере роста зародыша становятся все более специализированными. Это ведет к образованию индивидуальных тканей с вполне конкретными функциями.

Существуют три проблемы роста животных клеток:

- 1. Генетическая нестабильность.*
- 2. Непостоянство генетических экспрессий.*
- 3. Старение.*

При выращивании животных клеток приходится постоянно отбирать клетки для консервирования.

В процессе развития клеток можно проводить *трансформацию* – это изменение ростовых свойств культивируемых клеток, что является процессом необратимым и включает генетические изменения этих клеток. Изменение ростовых свойств клеток является одним из адаптационных процессов, который позволяет размножаться им в неблагоприятных условиях. Благодаря трансформации, клетки получают возможность расти *in vitro* в виде суспензии до высокой плотности популяции этих клеток, что связано с понижением потребности в факторах роста. Трансформация позволяет расти клеткам в условиях, где отношение площади и объема менее благоприятно, чем у нормальных клеток, потому что у трансформированных клеток уже нет субстратной зависимости и геометрический фактор роста не имеет значения. Что касается старения клетки, то этот показатель является ограничением потенциала деления (всего 50 делений). Если добиться повышенной способности к росту клетки, то это значит, что трансформация преобладает над старением.

Причины старения сводятся к двум моментам:

1. Постепенное накопление трансформационных ошибок вследствие вредных влияний мутаций, когда происходит старение и гибель клетки.
2. Генетическая запрограммированность смерти.

В самом процессе биотехнологического культивирования используют, получая после неоднократных пересевов, клеточную линию диплоидных клеток, соблюдая определенную плотность популяции (часть клеток консервируют).

В качестве материала для культивирования можно использовать почки обезьян, собак, кроликов, куриный эмбрион (возраст – 14 дней), клетки легких эмбриона человека (возраст – 16 недель). Понятно, что чем моложе материал, тем дольше культивируется клетка. Весьма важным является и процесс консервирования, как средство сохранения нужного генома и посевного матери-

ала клеток с определенным временем роста (сохраняют молодые клетки, являющиеся резервным фондом популяции).

Особенностью животных клеток является то, что они не способны выдерживать лиофилизации и их консервируют только в жидком азоте при температуре минус 196 °С. При такой температуре клетки полностью стабильны. Для замораживания используют стеклянные ампулы определенных размеров, например, на один миллилитр.

Однако в процессе замораживания могут происходить вредные процессы:

1. Образование кристаллического льда в клетке.
2. Обезвоживание.
3. Повышение концентрации растворенных веществ.

Возникновение этих вредных процессов во многом зависит от скорости замораживания. Существуют определенные правила замораживания, которые сводятся к следующему: нужно использовать ампулы только небольших размеров (на 1 мл); необходимо внесение криопротекторов (таких, как полиэтиленгликоль, поливинилпропил, диметилсульфацил); скорость замораживания должна быть одинаковой внутри ампулы и около ее стенки (например, лейкоциты охлаждают со скоростью 0,5–2 °С в минуту, фибробласты – 1–3 °С в минуту, клетки эпителия – 2–10 °С в минуту).

Восстановление жизненных функций также проводится с определенной скоростью.

Очень важным является и представление о составе питательной среды для культивирования животных клеток. Прежде всего, это 13 незаменимых L-аминокислот с определенной концентрацией их содержания в среде (например, аргинин – 0,6; цистеин – 0,1; изолейцин – 0,4; глутамин – 2,0 ммоль/л и т. д.).

Обязательным является присутствие белков, липидов (из сыворотки), углеводов, витаминов (всего восемь), источников углерода (глюкоза 5,5 ммоль/л), сыворотки крови (5–10 % по объему), незаменимых жирных кислот (линолевая,

арахидоновая, линоленовая), предшественников простагландинов, неорганических ионов (натрия хлорид (NaCl), калия хлорид (KCl), кальция хлорид (CaCl₂)), микроэлементов (железо, медь, кобальт, цинк, селен и т. д. – всего 15).

Стерилизация среды осуществляется мембранным фильтрованием. Среду готовят на дистиллированной, стерилизованной воде. Стерилизация оборудования происходит острым паром или химическим способом (если это пластмассовые детали). Режим культивирования осуществляется при определенной температуре, обычно при 37 °С.

Контрольные вопросы

1. Представьте классификацию вакцин.
2. Как получают вакцины?
3. Как получают сыворотки?

ТЕМА 16. РЕШЕНИЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЗАДАЧ

Цель занятия – развить у студентов знания методов диагностики вирусных болезней животных и привить первичные навыки диагностической работы, а также практического использования в совокупности ранее изученных общих методов работы с вирусами.

Задания:

- 1) изучить краткие теоретические сведения;
- 2) в соответствии с примером решить поставленные диагностические задачи.

Краткие теоретические сведения

Процесс постановки диагноза называется диагностикой. Диагностика складывается из наблюдений и исследований больных животных, исследований патологического материала от больных животных, анализа и оценки результатов исследований, выводов и заключений о причинах и форме болезни, о состоянии больного организма.

Если не разработаны эффективные методы специфической терапии вирусных болезней, то борьба с ними сводится в основном к действиям профилактического и диагностического характера. Поэтому диагностика играет одну из решающих ролей в системе мероприятий по борьбе с болезнями животных вирусной этиологии.

Быстро и правильно поставленный диагноз обеспечивает успех ликвидации вспышки (эпизоотии) вирусной болезни, так как позволяет четко уяснить конкретную эпизоотологическую ситуацию и своевременно принять целенаправленные меры по оздоровлению. Ошибочный же диагноз или задержка его постановки могут повлечь за собой распространение вспыхнувшей болезни, усложнение мероприятий по ее ликвидации и, как результат, значительные

экономические потери, особенно при вспышках быстро распространяющихся (например, ящура) или тяжело протекающих (например, чумы свиней) инфекций. Поэтому диагноз на вирусное заболевание должен быть поставлен как можно быстрее и точнее.

В подавляющем большинстве случаев для постановки диагноза требуются сбор, изучение, анализ и сопоставление целого комплекса различных данных. Поэтому диагноз – это результат длительной, кропотливой и вдумчивой работы. *Обычно в комплекс изучаемых сведений входят следующие: эпизоотологические данные о вспышке болезни; клинические симптомы болезни; патологоанатомические изменения органов и тканей; результаты лабораторных исследований патологического материала от животных.*

Как правило, постановка диагноза на вирусные инфекции состоит из двух этапов: **клинико-эпизоотологической (долабораторной) диагностики, производимой непосредственно в хозяйстве и большей частью, позволяющей поставить лишь предварительный диагноз; и лабораторной диагностики, производимой обычно в специализированной лаборатории (или отделе лаборатории) и позволяющей поставить окончательный диагноз.**

На первом этапе диагностики используются данные, которые можно быстро собрать непосредственно в хозяйстве. К таковым относятся клинические симптомы болезни и эпизоотологические сведения с привлечением результатов вскрытия (патологоанатомические изменения).

Эпизоотологические данные включают сведения об охвате болезнью данного поголовья животных, о скорости и территориальном распространении болезни, видах заболевших животных, динамике выявления больных и т. д.

Симптомами болезни называются ее признаки, обнаруживаемые при клиническом исследовании больного. Они включают изменения (по сравнению с

нормой) температуры тела, частоты и формы дыхания, частоты пульса, нарушения аппетита, поведения, состояния кожных покровов и слизистых оболочек, состояния и функционирования органов пищеварения, выделения и т. д.

Патологоанатомические изменения обычно устанавливают при вскрытии павших или вынужденно убитых животных. Различают *макроскопические наблюдаемые изменения* (по сравнению с нормой) формы, размера, цвета, консистенции, положения органов животного, появление узелков, кровоизлияний, везикул и других образований, не встречающихся в норме; а также *микроскопические изменения в клетках и тканях*, обнаруживаемые гистологическими методами.

Полученных данных обычно бывает достаточно, чтобы решить вопрос: инфекционная или неинфекционная та или иная болезнь. При инфекционной болезни внимательный анализ и сопоставление собранных сведений позволяют предположить, с какой болезнью мы имеем дело. При этом ориентируются на то, что каждая из них (вирусной и невирусной этиологии) сопровождается определенным комплексом характерных клинических симптомов, своими эпизоотологическими особенностями и патологоанатомическими изменениями. В таком клинико-эпизоотологическом диагнозе в редких случаях можно быть полностью уверенным. Чаще всего он является лишь предварительным, ориентировочным, особенно при инфекционных болезнях вирусной этиологии, в случае которых сходные эпизоотологические данные, клинические симптомы и патологоанатомические изменения обычно наблюдаются при нескольких заболеваниях, и это обстоятельство не позволяет с абсолютной уверенностью распознать болезнь. Положение еще больше осложняется, если болезнь вызвана не одним, а двумя и более этиологическими факторами (например, двумя вирусами или вирусом и бактерией), что встречается не так уж редко. Все же бывают случаи, когда по клиническим, эпизоотологическим

и патологоанатомическим данным можно уверенно поставить диагноз. Например, если болезнь поражает крупный рогатый скот и свиней, очень быстро распространяется, поражая сразу целые стада, характеризуется появлением афт во рту и слюнотечением, а также поражением межкопытной щели, заканчивается в основном выздоровлением и не поражает лошадей, можно уверенно говорить о том, что это вспышка ящура (остается выяснить тип и вариант возбудителя).

Несмотря на сугубо ориентировочный характер предварительного диагноза, он играет весьма важную роль, так как может быть поставлен в короткий срок и сразу же ориентирует ветеринарных специалистов только на несколько болезней из многих возможных. Окончательный диагноз на вирусную болезнь в большинстве случаев может быть поставлен только с учетом результатов лабораторных исследований. Обычно лабораторным исследованиям подвергают патологический материал, собранный от больных или павших животных. Задача исследования патматериала сводится к обнаружению в нем вирусных агентов и установлению их вида. Активные формы вирусов удается обнаружить путем биопробы на чувствительных к данному вирусу лабораторных объектах и в очень редких случаях – в реакции гемагглютинации. О нахождении вируса в организме животного могут свидетельствовать противовирусные антитела в сыворотке крови и вирусные антигены в патологическом материале. Их обнаружение и идентификация осуществляются с помощью серологических реакций. В ряде случаев о наличии в организме вирусов удается судить по обнаружению в патологическом материале вирусных телец-включений или вирионов. Те и другие обнаруживаются с помощью микроскопических методов.

Все методы лабораторной диагностики вирусных инфекций можно разделить на три группы:

1. Экспресс-методы. Основаны главным образом на обнаружении в патологическом материале следов пребывания вирусов. Позволяют относительно быстро установить наличие вируса, но высокой достоверностью они отличаются.

2. Вирусологические методы. Основаны на изоляции активных форм вирусов из патологического материала и их идентификации в серологических реакциях. Отличаются длительными и трудоемкими исследованиями, но дают точный ответ о возбудителе болезни, хотя и ретроспективно.

3. Серологические методы диагностики. Основаны на установлении динамики титра антител в парных сыворотках больных животных. Дают результаты с высокой достоверностью, но тоже ретроспективно.

От больных животных берут тот патологический материал, в котором предполагается наибольшая концентрация вируса. От трупов (павших или вынужденно убитых животных) патологический материал необходимо брать не позднее одного – двух часов после клинической смерти или убоя (позже начинается бактериальное обсеменение, и взять материал стерильно невозможно). В качестве патологического материала чаще всего берут кусочки тех органов (размером в несколько кубических сантиметров), которые:

- 1) имеют видимые отклонения от нормы (по форме, размеру, цвету, консистенции, наличию необычных образований);
- 2) могут быть поражены и содержать вирус, о чем судят по клинической картине перед смертью;
- 3) наиболее часто содержат вирус (печень, селезенка, легкие, головной мозг, лимфатические узлы, почки).

В лаборатории полученный патологический материал освобождают от консерванта, взвешивают или измеряют, и делят не менее чем на 2–3 порции. Затем, приняв во внимание содержание сопроводительного письма, количество материала, его состояние и качество, составляют план исследований.

Предусматривают изучение материала не менее чем двумя методами с таким расчетом, чтобы получить по возможности быстрый ответ и затем подтвердить его более надежными методами, что дает высокую степень уверенности в правильности результата. Для этого и необходимо деление материала на порции (одну порцию оставляют в резерв).

В зависимости от предполагаемых методов исследования из патологического материала готовят срезы, отпечатки, мазки или суспензию.

Экспресс-методы. Наиболее быстро удастся найти в патологическом материале вирусные антигены (белки вирусов), тельца-включения и вирионы. Методы их обнаружения объединяются в группу экспресс-методов, а постановка диагноза с их помощью называется экспресс-диагностикой.

Обнаружение вирусных антигенов. Для обнаружения в патматериале вирусных антигенов можно воспользоваться любой серологической реакцией, используя в качестве антигена патологический материал (непосредственно или после соответствующей обработки), а в качестве антител – гипериммунные сыворотки с заведомо известными антителами (готовятся заблаговременно). Лучше всего это делать с помощью реакций иммунофлуоресценции, связывания комплемента или диффузионной преципитации в агаровом геле, а также методом иммуноферментного анализа.

Метод иммунофлуоресценции позволяет уже через 2–4 часа получить ответ на вопрос, имеется ли в патматериале антиген определенного вида вируса. Достоинства метода, кроме быстроты получения ответа: простота техники, минимальная потребность в компонентах, нетребовательность к чистоте исследуемого материала, высокая чувствительность, универсальность. Недостатками являются возможность случаев неспецифического свечения и перекрестных реакций между родственными антигенами.

Вирусный антиген в патологическом материале может быть обнаружен и

с помощью реакции связывания комплемента. Однако эта реакция менее чувствительна. Для ее постановки необходимо иметь определенный минимум патологического материала с достаточной концентрацией (титром) в нем вирусного антигена. Кроме того, из патологического материала необходимо получить суспензию, осветлить ее и подвергнуть обработке по освобождению от антикомплемментарности. Реакция связывания комплемента – довольно трудоемкая и требует точного предварительного титрования компонентов. Несмотря на это, она находит довольно широкое применение в практике.

Серологические реакции позволяют относительно быстро (не более чем за 2–3 дня) обнаружить в патологическом материале антигены вирусов и одновременно установить их видовую принадлежность. Лучшей следует признать реакцию иммунофлуоресценции.

Обнаружение телец-включений. О присутствии некоторых вирусов в организме животного можно судить по обнаружению в патологическом материале вирусных телец-включений. Последние представляют собой скопления (колонии) зрелых вирионов в клетках, где шла их репродукция, или массы клеточного материала, измененного под влиянием репродукции вируса. Часто тельца-включения представляют собой комбинацию того и другого. Тельца-включения, образуемые разными вирусами, различаются между собой, и это позволяет по их обнаружению судить о присутствии определенного вируса. Известно около 100 видов вирусов, которые при репродукции в клетках образуют тельца-включения, но практическое значение имеют весьма немногие из них. Наибольшее диагностическое значение имеют тельца-включения, образуемые вирусом бешенства в цитоплазме нервных клеток млекопитающих и называемые тельцами Бабеша-Негри.

Тельца-включения образуются вирусами оспы овец (тельца Борреля), оспы птиц (тельца Боллингера), чумы собак (тельца Ленца), инфекционного ларинготрахеита кур (тельца Зейфрида) и многими другими вирусами. Однако

вследствие непостоянства их нахождения и отсутствия специфических методов выявления (применяют общие обзорные окраски) тельца-включения практически имеют лишь вспомогательное диагностическое значение (за исключением телец Бабеша-Негри).

Обнаружение вирионов (элементарных телец вирусов). Вирионы можно обнаружить в патологическом материале с помощью электронной микроскопии. Только вирусы оспы млекопитающих и птиц, имеющие вирионы размером более 250 нм, могут быть обнаружены с помощью световой микроскопии. Этот метод, получивший название вирусоскопии, сводится к тому, что у больного животного срезают папулу (или везикулу), и делают мазки на предметном стекле. Высохшие мазки окрашивают аммиачным серебром по Морозову и исследуют под микроскопом с масляной иммерсией. Метод вирусоскопии на оспу очень прост, но требует значительного опыта по распознаванию элементарных телец. Положительная вирусоскопия в сочетании с положительной биопробой достаточны для постановки диагноза на оспу.

Биопроба и иммунологическая проба. К методам экспресс-диагностики примыкает и биопроба, хотя отнести ее к экспресс-методам можно только условно (тоже иммунологическая проба). Биопроба – это экспериментальное заражение материалом от больных животных лабораторных или естественно восприимчивых животных (хотя в более широком толковании это заражение любых живых объектов). Ставить биопробу имеет смысл только в тех случаях, когда можно надеяться на получение характерной клинической картины болезни или характерных патологоанатомических изменений. Таких болезней совсем немного. В частности, при подозрении на болезнь Ауески ставят биопробу на кроликах; на бешенство – на мышатах, реже на кроликах; на везикулярный стоматит – на морских свинках или белых мышах; на ящур – на морских свинках; на чуму крупного рогатого скота – на телятах; на контагиозную

эктиму и оспе овец – на ягнятах; на инфекционный ларинготрахеит и инфекционный бронхит – на цыплятах.

Иммунологическая проба включает биопробу на иммунных и неиммунных животных, что позволяет идентифицировать и дифференцировать болезнь. Так, на чуму крупного рогатого скота иммунологическую пробу ставят на телятах, на африканскую чуму свиней – на подсвинках. Биопроба и особенно иммунологическая проба на естественно восприимчивых животных дорогостоящие и часто трудно выполнимые мероприятия, поэтому их ставят редко. Биопробу на лабораторных животных применяют чаще, но и она не всегда гарантирует точный ответ.

Оценивая методы экспресс-диагностики в целом, следует отметить, что все они позволяют сравнительно быстро получить ответ на вопрос о наличии и виде вируса в патологическом материале, а значит, и в организме животного, от которого взят материал. В этом и состоит их главное достоинство. Однако степень достоверности полученного ответа, как правило, не очень высока, поэтому экспресс-диагноз нуждается в подтверждении другими методами. В этой связи полученный на исследование патологический материал только частично расходуют на исследование экспресс-методами с тем, чтобы другую его часть исследовать иными, в основном вирусологическими методами. Практически оба направления исследования начинают одновременно, но ответ получают вначале от экспресс-методов, а затем от других методов, которые должны подтвердить правильность экспресс диагноза или уточнить его.

Вирусологические методы. Включают методы, предполагающие обнаружение (индикацию) в патологическом материале активных форм вирусов и последующую их идентификацию. Индикация вирусов обычно осуществляется путем биопробы на чувствительных живых лабораторных объектах, а идентификация – в серологических реакциях. Вирусологическими эти методы можно назвать только условно в связи с поисками активного вируса (истинно

вирусологическая задача), так как другие методы лабораторной диагностики имеют задачей также обнаружение и идентификацию вирусов, но в неактивной форме, или только *следов* их пребывания в организме.

Для исследования вирусологическими методами патологический материал должен быть взят стерильно, а вирус в нем хорошо законсервирован. В лаборатории из него готовят взвесь (суспензию), которую последовательно освобождают от частиц материала (центрифугированием), а также от бактерий и грибков (антибиотиками или фильтрацией).

Обнаружение вируса. Полученной суспензией, которая предположительно должна содержать вирус, заражают чувствительные лабораторные объекты, в качестве которых используют лабораторных животных, куриные эмбрионы, культуры клеток. Пути и методы заражения определяются тропизмом предполагаемого вируса (или вирусов). Выбор объекта зависит от происхождения патологического материала и чувствительности объектов к предположительно находящемуся в материале вирусу.

При выборе лабораторного объекта, на котором предполагается произвести индикацию вируса, руководствуются данными клинико-эпизоотологического диагноза, видом животного, от которого получен патологический материал, и видом самого материала. Совокупность этих данных в огромном большинстве случаев позволяет выбрать необходимую лабораторную систему и метод ее заражения. Так, в патологическом материале, полученном от больных птиц, целесообразно искать вирус путем заражения куриных эмбрионов. При этом исходят из того, что коль скоро вирус размножался в организме взрослой курицы, то в менее защищенном курином эмбрионе он должен безусловно размножаться (бывают и исключения). Если патологический материал получен от млекопитающих, то имеет смысл пытаться обнаружить в нем вирус путем заражения культур клеток, полученных из органов того же вида животного, от которого был взят патологический материал. При этом исходят из того же

предположения, что вирус в патологическом материале уже адаптирован к клеткам определенного вида животных и можно надеяться получить цитопатическое действие вируса относительно быстро.

Наиболее трудно подобрать вид лабораторных животных для индикации вируса в патологическом материале. Здесь остается ориентироваться только на предварительный диагноз, который должен определять наиболее вероятный вид (или виды) возбудителя инфекции и, основываясь на свойствах таковых, подобрать чувствительный к возбудителю вид лабораторных животных. Что касается пути экспериментального заражения лабораторных животных, то надо стремиться, чтобы вирус попадал в тот же тип клеток, в каком он присутствовал в патматериале (то есть суспензией мозга нужно заражать в мозг, суспензией печени – внутрибрюшинно, суспензией легких или смывом верхних дыхательных путей – в нос и т. д.), учитывая тропизм вирусов.

Все же, несмотря на вышесказанное, при обнаружении вирусов в патологическом материале довольно часто случается, что в первом пассаже лабораторные системы не дают видимой реакции на вирус. Это происходит потому, что вирус оказался недостаточно адаптированным к лабораторной системе или его количество недостаточно для проявления специфической реакции. В таком случае первый пассаж считают *слепым*; из зараженных лабораторных систем собирают вируссодержащий материал и им заражают новую партию тех же лабораторных систем, то есть производят второй пассаж вируса. Если и второй пассаж не покажет реакции на вирус, его тоже считают *слепым* и проводят третий. Иногда только на десятом пассаже вирус начинает проявлять специфическое действие, так как он к этому моменту уже достаточно адаптировался к лабораторной системе и накопился в количестве, обеспечивающем характерную для данной системы реакцию на вирус. Обычно же ведут 3–4 *слепых* пассажа.

Идентификация вируса. Итак, тем или иным путем активный вирус в патологическом материале обнаружен. Теперь надо установить, какой это вирус, идентифицировать его. В ряде случаев уже в процессе индикации удастся составить представление, с каким вирусом имеют дело. Этому помогают учет вида животного, от которого получен патологический материал, вид чувствительной лабораторной системы, характер проявления действия вируса на лабораторный объект и др.

Еще точнее и надежнее установить вид вируса можно после изучения таких его свойств, как способность вызывать гемагглютинацию и гемадсорбцию, чувствительность к эфиру. Но окончательную идентификацию обнаруженного вируса можно произвести только с помощью одной из подходящих серологических реакций. Изучаемый вирус в этом случае служит антигеном, а в качестве специфических сывороток используются заранее подготовленные и хранимые в лаборатории (в законсервированном виде) антисыворотки к различным, но часто встречающимся вирусам.

Естественно, что для изучения свойств обнаруженного вируса и использования его в качестве антигена необходимо получить достаточное количество суспензии этого вируса. Поэтому перед идентификацией обнаруженный вирус размножают путем нескольких пассажей на той же лабораторной системе, на которой он был обнаружен.

Выбор серологической реакции для окончательной идентификации вируса определяется в основном свойствами самого вируса, и в меньшей степени наличием возможностей поставить ту или иную серологическую реакцию. Так, если вирус проявил гемагглютинирующие свойства, его идентификацию проще всего и вполне надежно можно осуществить в реакции торможения гемагглютинации. Если вирус выделяли на культуре клеток, и он проявил гемадсорбирующие свойства, есть полный смысл идентифицировать его в реакции торможения гемадсорбции.

При отсутствии же названных свойств у выделенного вируса надежно идентифицировать его можно в реакции нейтрализации на том лабораторном объекте, на котором он был обнаружен. Однако при этом учитывается, что реакция нейтрализации довольно трудоемкая, длительная и подчас дорогостоящая. Поэтому можно воспользоваться реакцией диффузионной преципитации в агаровом геле. Эта реакция проста по технике, быстро дает ответ, требует крайне малого количества ингредиентов, но отличается низкой чувствительностью, и поэтому может быть использована только в том случае, когда и антиген, и сыворотка в высоких титрах (а это не часто удается получить).

Можно также воспользоваться реакцией связывания комплемента. Однако реакция достаточно трудоемка и требовательна к компонентам; для нее пригодны только растворимые антигены и к тому же свободные (или освобожденные) от антикомплементарных свойств.

Доказательство этиологической роли вируса. Если серологическая реакция подобрана и обнаруженный вирус идентифицирован, то еще остается доказать его этиологическую роль в заболевании животного (животных). Такая роль может считаться доказанной, если будет установлено нарастание титра антител к выделенному вирусу в парных сыворотках от животных, послуживших источником получения патологического материала. А это требует дополнительных исследований. Иногда для доказательства этиологической роли выделенного вируса в заболевании животных пытаются воспроизвести это заболевание на здоровых животных (обычно на молодняке) того же вида путем заражения их выделенным вирусом. Однако этот метод, кроме дороговизны, имеет и тот недостаток, что далеко не всегда гарантирует возможность воспроизведения болезни. В целом диагноз на основании вирусологических исследований патологического материала может считаться достаточно уверенным. Однако он сопряжен с длительными и трудоемкими исследованиями.

Методы серологической диагностики. Серологическим исследованиям подлежат сыворотки крови больных животных. Обычно используют парные сыворотки, для получения которых от каждого животного кровь берут дважды с интервалом в 2–3 недели. Для получения парных сывороток кровь необходимо брать в начале и в конце болезни, но практически уловить эти сроки удастся редко. Брать кровь и получать из нее сыворотки необходимо в асептических условиях, чтобы сыворотки были стерильными. Хранить их до исследования необходимо под пробками в холодильнике или в замороженном (при температуре минус 25 °С и ниже) состоянии.

Задача сводится к установлению в парных сыворотках титра антител к вирусам, которые предположительно могли быть возбудителями болезней животных, от которых получены сыворотки. Основанием для предположения, к каким вирусам искать антитела, служит предварительный диагноз, поставленный по данным эпизоотологических наблюдений, клинических симптомов и патологоанатомических изменений. Наличие в сыворотках антител и их титры определяют в серологических реакциях с использованием антигенов предполагаемых вирусов (таковые должны быть в лаборатории, их готовят заблаговременно). Выбор серологической реакции определяется тем, какая из них наиболее пригодна для работы с данным вирусом, а также возможностями лаборатории и квалификацией персонала. При этом также учитывается быстрота получения ответа и трудоемкость работы. Проще всего задача решается, если вирус к которому ищут в сыворотках антитела, обладает гемагглютинирующими свойствами. В этом случае поиск и титрование антител имеет смысл производить в *реакции торможения гемагглютинации* как наиболее простой по технике и быстро дающей ответ.

Простотой техники исполнения и быстротой отличается также *реакция диффузионной преципитации* в агаровом геле. Но она требует, чтобы антиген

и антитело были в высоком титре, так как в противном случае полосы преципитации получаются неяркие или совсем не получаются. К тому же в этой реакции затруднительно произвести уверенное титрование антител. Все это заставляет использовать реакцию диффузионной преципитации только в случаях, когда необходимо получить быстрый ответ о наличии антител к неагглютинирующему вирусу, и не требуется точное определение титра антител в сыворотках, то есть только для предварительной ориентировки.

Реакция непрямой гемагглютинации является высокочувствительным и универсальным тестом для определения титра антител к различным вирусам в сыворотках крови. Ответ она дает быстро. Но для ее постановки необходимо иметь резерв консервированных эритроцитов, сенсibilизированных разными вирусами, что само по себе является проблемой для многих лабораторий. К тому же эта реакция требует чистоты компонентов. Поэтому ее практическое использование ограничено.

Реакция связывания комплемента может быть использована для определения титра антител ко многим вирусам, если этап связывания комплемента вести длительно на холоде. Однако реакция требует наличия соответствующим образом подготовленных антигенов, отличается трудоемкостью и требовательностью к точности дозировки компонентов. Тем не менее подавляющее большинство практических работников владеет техникой постановки реакции связывания комплемента и широко ее использует в диагностической работе.

Наиболее достоверные результаты по титрованию антител практически к любым вирусам (кроме бешенства и чумы свиней) дает *реакция нейтрализации*. К тому же она позволяет обнаруживать нейтрализующие вирус антитела, которые непосредственно создают в организме защиту против вирусов. Но эта реакция требует для постановки значительного времени в случае использования в ней животных как индикатора вируса. Время на постановку реакции нейтрализации уменьшается до 1–2 недели и менее в случаях использования

для индикации вируса куриных эмбрионов или культур клеток. Однако и в последних случаях реакция относительно трудоемка. Благодаря своим достоинствам, реакция нейтрализации весьма пригодна для определения титра антител в сыворотках. После установления титра антител в парных сыворотках результаты интерпретируют, исходя из динамики титра. Считается, что нарастание в четыре раза и более титра антител во второй сыворотке по сравнению с первой, уверенно свидетельствует об активном инфекционном процессе, протекающем в организме животного в период взятия у него крови. При этом болезнь была вызвана тем возбудителем, к которому было найдено повышение титра антител в парных сыворотках. Недостатком метода серологической диагностики является его ретроспективность, так как к моменту постановки диагноза животное, от которого получены парные сыворотки, уже выздоровело или пало.

Однако поставленный серологическими методами диагноз дает уверенные представления о болезни и имеет важное значение для мероприятий по ликвидации вспышки вирусной болезни или ее эпизоотии (хотя для самих животных, от которых получены парные сыворотки, диагноз уже и потерял значение).

Задача

На птицефабрике болеют цыплята. Клинические симптомы: затрудненное дыхание, хрипы, кашель, серозные истечения из носа. На вскрытии павших птиц отмечаются отеки и гиперемия слизистых оболочек трахеи, бронхов, гортани. Смертность достигает 20 %. Необходимо: поставить предварительный диагноз; решить, какой патологический материал и как доставить в лабораторию и составить примерный план исследований патологического материала.

ТЕСТОВЫЕ ЗАДАНИЯ

1. Уникальные свойства вируса, открытые Д. И. Ивановским:

- а) фильтруемость через бактериальные фильтры;
- б) способность расти на питательных средах;
- в) неспособность расти на питательных средах;
- г) строгий внутриклеточный паразитизм;
- д) не является живым организмом.

2. Свойства, характеризующие вирус как организм:

- а) наследственность;
- б) изменчивость;
- в) способность к размножению;
- г) понятие роста;
- д) экологическая ниша в природе.

3. Убиквитарность вируса это...

Ответ:

4. Размеры вирусных частиц в процессе жизненного цикла...

- а) не увеличиваются;
- б) увеличиваются вдвое;
- в) уменьшаются вдвое;
- г) увеличиваются в пять раз;
- д) увеличиваются в три раза.

5. Капсид это...

Ответ:

6. Вирус, состоящий из нуклеиновой кислоты и капсида называется...

Ответ:

7. Биосистемы, используемые для выделения вируса...

Ответ:

8. Методы консервирования вирусосодержащего материала...

- a) с помощью химических консервантов;
- b) замораживанием;
- c) высушиванием;
- d) с помощью дезинфицирующих средств;
- e) с помощью антибиотиков.

9. Для консервирования вирусосодержащих жидкостей используют...

- a) 10 % раствор глицерина;
- b) 5 % раствор глюкозы;
- c) 5 % раствор натрия хлорида;
- d) 10 % раствор мальтозы;
- e) 1 % раствор желатина.

10. «Минус»-нитевые вирусы, характеризуются...

- a) РНК-содержащим геномом;
- b) ДНК-содержащим геномом;
- c) фрагментированным геномом;
- d) геном обладает функциями иРНК;
- e) геном не обладает функциями иРНК;
- f) геном способен вызвать инфекционный процесс самостоятельно.

11. Сложный капсид...

- a) состоит из капсомеров разной величины;
- b) состоит из капсомеров разной формы: пентоны и гексоны;
- c) состоит из капсомеров одной формы – пентоны;
- d) построен по двум типам симметрии.

12. Дайте определение «вирус – это...»

Ответ:

13. В роли антигена при производстве вакцин можно использовать...

- a) живые ослабленные вирусные частицы;
- b) неживые, убитые вирусные частицы;
- c) антигенные структуры вирусной частицы;
- d) продукты жизнедеятельности микроорганизмов;
- e) все ответы верны.

14. Верно ли утверждение? «Живая (аттенуированная) вакцина изготовлена из убитых фенолом вирусных частиц».

Ответ:

15. Рекомбинантные противовирусные вакцины созданы...

- a) методом генной инженерии;
- b) методом молекулярной биологии;
- c) с помощью полимеразной цепной реакции;
- d) биохимическим методом;
- e) культуральным методом.

16. Проверка вакцины на безвредность – это проверка на лабораторных животных...

- a) токсичности;
- b) пирогенности;
- c) стерильности;
- d) аллергенности;
- e) тератогенности;
- f) мутагенности;
- g) все ответы верны.

17. Сыворотки в своем составе содержат...

- a) антигены;
- b) антитела;
- c) вирусы;

d) бактерии;

e) токсины.

18. На основе биологической системы для культивирования вируса выделяют вакцины...

a) тканевые;

b) авинизированные;

c) культуральные;

d) цельновирионные;

e) поливалентные;

f) инаktivированные.

19. На основе видовой принадлежности вакцинного штамма различают вакцины...

a) гомологичные;

b) гетерологичные;

c) авинизированные;

d) живые;

e) моновалентные.

20. Тропизм вирусов – это...

a) способность вируса заражать определенные типы клеток;

b) когда клетка, в которой автономно размножается вирус, сохраняет свою жизнеспособность;

c) когда геном вируса содержит две нуклеиновые кислоты;

d) бессимптомная циркуляция вируса в организме;

e) способность вирусов вызывать развитие опухолей в организме.

21. Типы взаимодействия вирусной частицы и клетки...

a) интегративный;

b) абортивный;

c) продуктивный;

- d) инаппарантный;
- e) персистирующий.

22. Продуктивная вирусная инфекция заканчивается...

- a) образованием вирусного потомства;
- b) бессимптомным течением вирусной болезни;
- c) трансформацией клеток;
- d) гибелью вирусов;
- e) длительной персистенцией вирусов в организме.

23. Адсорбция вирусов – это...

- a) прикрепление вируса к поверхности клетки-хозяина;
- b) синтез нуклеиновых кислот;
- c) синтез белка;
- d) сборка вирионов и выход из клетки;
- e) проникновение вируса в клетку.

24. Депротеинизация вируса – это...

- a) удаление вирусных оболочек;
- b) освобождение внутреннего компонента вируса;
- c) синтез нуклеиновых кислот;
- d) синтез белков;
- e) переписывание информации.

25. К естественной видовой резистентности относится...

- a) невосприимчивость, обусловленная врожденными биологическими особенностями;
- b) отсутствие чувствительных клеток для репродукции вирусов;
- c) повышение температуры тела;
- d) кожа и слизистые оболочки;
- e) интерферон.

26. Свойства, характеризующие вирус как организм:

- a) наследственность;
- b) изменчивость;
- c) способность к размножению;
- d) понятие роста;
- e) экологическая ниша в природе.

27. Специфическая профилактика включает...

- a) санитарно-гигиенические мероприятия;
- b) зоогигиенические мероприятия;
- c) применение вакцин;
- d) применение гипериммунных сывороток;
- e) применение специфических иммуноглобулинов.

28. Основоположником вакцинации считают...

- a) Дженнер;
- b) Левенгук;
- c) Пастер;
- d) Мечников;
- e) Кох.

29. Какие группы лечения вирусных болезней различают?

- a) лечение запрещено;
- b) лечение нецелесообразно;
- c) лечение проводится;
- d) все ответы верны.

30. К неспецифической терапии будут относить...

- a) премиксы к кормам;
- b) вакцины;
- c) сыворотки;
- d) иммуностимуляторы;

е) гистолизаты.

31. Механизм противовирусного действия интерферона сводится к...

- а) подавлению трансляции вирусных белков в клетке;
- б) мобилизации иммунной системы и увеличению иммунорезистентности;
- в) препятствию адсорбции вирионов на клетках-мишенях;
- г) подавлению репродукции вирионов в ядре клетки;
- е) подавлению выхода дочерних вирусных частиц из клетки.

32. К мерам борьбы с африканской чумой свиней относится...

- а) изоляция и лечение больных животных;
- б) специфическая профилактика;
- в) отчуждение и уничтожение животных;
- г) дезинфекция;
- е) дезинсекция.

33. К мерам борьбы с бешенством относится...

- а) лечение больных восприимчивых животных;
- б) вакцинация всех восприимчивых животных;
- в) изъятие и убой всех восприимчивых животных;
- г) дезинфекция;
- е) дератизация.

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышников, П. И. Лабораторная диагностика вирусных болезней животных : учебное пособие / П. И. Барышников, В. В. Разумовская. – Санкт-Петербург : Лань, 2021. – 672 с. // ЭБС Лань : [сайт]. – URL: <https://e.lanbook.com/book/168804>.
2. Биотехнология. В 2 ч. Часть 1 : учебник и практикум / под общей редакцией Н. В. Загоскиной, Л. В. Назаренко. – Москва : Юрайт, 2020. – 170 с. // ЭБС Юрайт : [сайт]. – URL: <https://urait.ru/bcode/452655>.
3. Биотехнология. В 2 ч. Часть 2 : учебник и практикум / под общей редакцией Н. В. Загоскиной, Л. В. Назаренко. – Москва : Юрайт, 2020. – 219 с. // ЭБС Юрайт : [сайт]. – URL: <https://urait.ru/bcode/452776>.
4. Вирусология и биотехнология : учебник / Р. В. Белоусова, Е. И. Ярыгина, И. В. Третьякова [и др.]. – Санкт-Петербург : Лань, 2018. – 220 с. // ЭБС Лань : [сайт]. – URL: <https://e.lanbook.com/book/103898>.
5. Госманов, Р. Г. Ветеринарная вирусология : учебник / Р. Г. Госманов, Н. М. Колычев, В. И. Плешакова. – Санкт-Петербург : Лань, 2018. – 500 с. // ЭБС Лань : [сайт]. – URL: <https://e.lanbook.com/book/105990>.
6. Колычев, Н. М. Ветеринарная микробиология и микология : учебник / Н. М. Колычев, Р. Г. Госманов. – Санкт-Петербург : Лань, 2019. – 624 с. // ЭБС Лань : [сайт]. – URL: <https://e.lanbook.com/book/125742>.
7. Основы общей микробиологии, вирусологии и болезни зверей и птиц : учебное пособие / Н. М. Мандро, Н. И. Землянская, В. В. Бондаренко, В. В. Бурик. – Благовещенск : Дальневосточный ГАУ, 2007. – 138 с.
8. Федоренко, Т. В. Вирусология и биотехнология : учебное пособие / Т. В. Федоренко. – Благовещенск : Дальневосточный ГАУ, 2018. – 131 с. – URL: https://irbis.dalga.ru/DigitalLibrary/UMM_vo/255.pdf.
9. Частная ветеринарно-санитарная микробиология и вирусология : учебное пособие / Р. Г. Госманов, Р. Х. Равилов, А. К. Галиуллин [и др.]. – Санкт-Петербург : Лань, 2019. – 316 с. // ЭБС Лань : [сайт]. – URL:

ПРИЛОЖЕНИЕ А

ОТБОР ПАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НЕКОТОРЫХ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Таблица А.1 – Отбор патологического материала для диагностики некоторых вирусных болезней

Материал	Болезнь												
	бешенство	везикулярный стоматит	ящур	болезнь Ауески	классическая чума свиней	африканская чума свиней	болезнь Тешена	оспа овец	лейкоз птиц	болезнь Марека	парвовирусная инфекция	вирусная диарея крупного рогатого скота	парагрипп крупного рогатого скота
Носовые выделения	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+	+
Содержимое везикул, пу- стул, афт	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Слюна	–	+	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Кровь	–	–	–	–	+	+	–	–	+	+	–	+	–
Фекалии	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	+	+	+
Поражения конъюнк- тивы	–	–	–	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
Кожные поражения	–	+	+	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–
Мозг	+	–	–	+	+	–	+	–	–	–	–	–	–
Легкие	–	–	–	+	+	+	–	–	–	–	–	+	+
Печень	–	–	–	+	+	+	–	–	+	+	–	+	–
Лимфоузлы	–	–	–	–	+	+	–	–	+	+	–	+	+
Спинномоз- говая жид- кость	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	–
Селезенка	–	–	–	+	+	+	–	–	+	+	–	+	–
Почки	–	–	–	+	+	+	–	–	+	+	–	–	–
Слизистая оболочка кишечника	–	–	–	–	+	–	+	–	–	–	+	+	–
Кусочки новообразо- ваний	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	–	–	–
Кусочки бронхов, трахеи	–	–	–	–	+	–	–	–	–	–	–	–	+

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ВАКЦИНЫ



Рисунок Б.1 – Схема получения вакцины

ПРИЛОЖЕНИЕ В

СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ СЫВОРОТОК

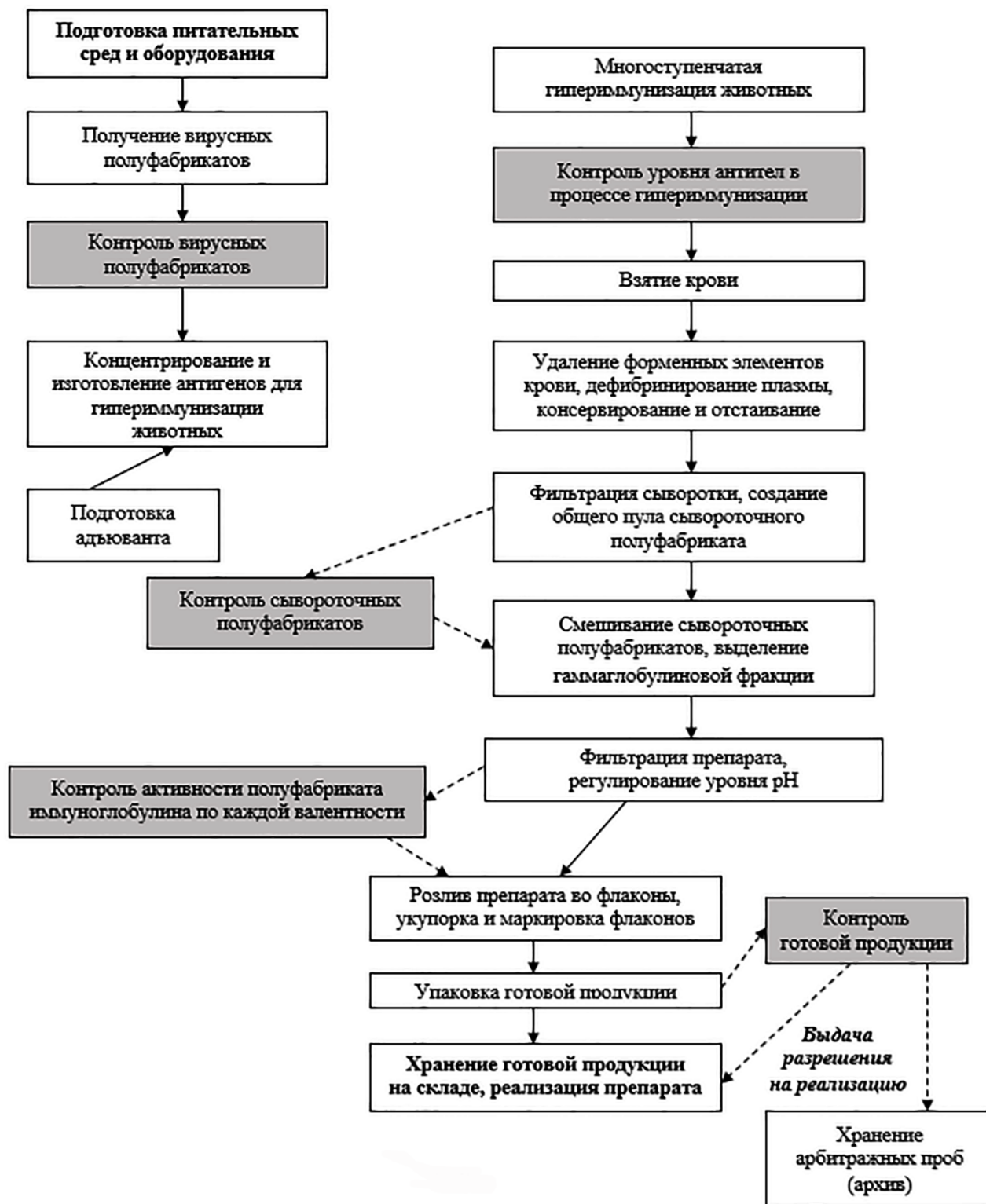


Рисунок В.1 – Схема получения сывороток

Учебное издание

Федоренко Татьяна Валериевна, кандидат ветеринарных наук

ВИРУСОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Лабораторный практикум

Подписано в печать 01.11.2022 г.
Формат 60х90/16. Уч.-изд. л – 4,84. Усл. печ. л. – 15,71.
Тираж по требованию. Заказ 46.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Дальневосточный государственный аграрный университет»

Отпечатано в отделе оперативной полиграфии
Дальневосточного государственного
аграрного университета
675005, г. Благовещенск, ул. Политехническая, 86