

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

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

Бовкун Г.Ф.

***ВИРУСОЛОГИЯ
И БИОТЕХНОЛОГИЯ***

*Учебно-методическое пособие
для студентов очного обучения
по специальности 36.05.01 «Ветеринария»*

Брянская область 2016

УДК 578:631.461.5(07)

ББК 28.3:30.16

Б 72

Бовкун, Г.Ф. Вирусология и биотехнология:
Учебно-методическое пособие/ Г.Ф. Бовкун.- Брянск:
Брянский ГАУ, 2016. – 101 с.

Пособие содержит современные методики вирусологических, серологических исследований, методы лабораторной диагностики, биопрепараты для профилактики, средства химиотерапии ведущих вирусных заболеваний, биотехнологию производства противовирусных препаратов в соответствии с программой по вирусологии и биотехнологии, на основе требований Приказа ФГОС ВО №962 от 02.10.2015г. по направлению подготовки 36.05.01 – «Ветеринария», квалификации «Ветеринарный врач» и соответствует содержанию компетенций: ОК-2, ОК-3, ПК-2, ПК-3

Рецензент: профессор кафедры радиобиологии и вирусологии имени академиков А.Д. Белова и В.Н. Сюрин ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина, доктор биологических наук Е.И. Ярыгина;

доцент кафедры нормальной и патологической морфологии и физиологии животных ФГБОУ «Брянский ГАУ» кандидат биологических наук. Ю.В. Овсеенко.

Рекомендовано методической комиссией института ветеринарной медицины и биотехнологии Брянского ГАУ от 18.10.2016, протокол №2.

© Бовкун, Г.Ф., 2016:

© Брянский ГАУ, 2016

ТЕМА №1

Отбор вирусосодержащего материала, транспортировка. Подготовка вирусосодержащего материала. Методы заражения и вскрытия лабораторных животных

Цель занятия. Познакомиться с методами отбора, транспортировки, подготовки вирусосодержащего материала для исследований. Познакомиться с методами заражения и вскрытия лабораторных животных.

Оборудование и материалы Среды для культивирования культур клеток и защиты вирусов, пробирки для взятия крови, пробирки с тампонами, белые мыши, шприцы, иглы.

Задание для самостоятельной работы студентов. Освоить методику заражения и вскрытия лабораторных животных.

Режим, правила работы в лаборатории вирусологии

1. Работают в халате, колпаке, резиновых перчатках, сменной обуви.
2. Запрещено покидать помещение в халате, выполнять другие работы в лаборатории.
3. В боксе работают в стерильном халате, колпаке, маске, резиновых перчатках.
4. Поступивший материал, считают инфицированным, помещают на кювет, банки обтирают дезраствором. Работают над кюветом, используют пипетки с грушами. Всю посуду после работы погружают в дезраствор. Стерильную посуду открывают над факелом.
5. После работы рабочее место дезинфицируют 5% хлорамином, 2-10% NaOH, 3% формальдегидом или 96⁰ спиртом.
6. Хранят вирусосодержащий материал в морозильной камере холодильника, с обязательными надписями.

Холодильники под замком с пломбой и печатями.

7. При работе не допускать распространения вирусов, не допускать загрязнение материала микрофлорой, обеспечивать личную безопасность.

*Отбор вируссодержащего материала,
транспортировка*

Правильное взятие материала и транспортировка, высокое качество приготовления материала обеспечивают успех вирусологического и серологического исследований.

Для исследований берут патологический материал от погибших, вынужденно убитых животных в период четких клинических признаков, не позднее 2-3 ч после смерти или убоя.

Берут чаще всего кусочки 10-20 г печени, селезенки, легкого, лимфоузлы целиком, почку, головной мозг, не вскрывая черепа..

Если материал с признаками гниения, выделить вирус, провести его идентификацию, не возможно. Затруднено серологическое исследование.

Проводят исследования с клиническим материалом:

- смывами из носа, конъюнктивы, которые берут стерильным тампоном в стерильные пробирки с раствором Хенкса, средой 199, Игла, добавляют антибиотики (пенициллин и стрептомицин по 500 ед на 3,5 мл, 20 ед нистатина), а также белковый стабилизатор 0,5-1% желатина или альбумина, чтобы не произошла гибель вирусов;

- дефибринированной или лаковой кровью, когда к 1 объему крови добавляют 1 объем стерильной дистиллированной воды;

- фекалием;

- папулами, корочками, пустулами при поражении кожи.

Для серологических исследований берут кровь дважды (т.е. исследуют парные сыворотки) с интервалом 2-3 недели в объеме 5 мл.

Взятые пробы как можно скорее следует охладить и транспортировать:

- в термосе с охлаждающей смесью (сухой лед и этиловый спирт в равных частях) температура - 71°C держится несколько дней;

- в смеси из 3 частей льда, снега и 1 части хлорида натрия, охлаждение до - 15-20°C держится несколько часов;

- в смесь из равных объемов глицерина и физраствора (0,85% NaCl) или в 50%-ном глицерине, если использовать глицерин, то материал нельзя вводить лабораторным животным, эмбрионам, культурам клеток, использовать для флюоресцирующей микроскопии.

Тара, где находится материал, должна быть подписана, термос опечатан, материал снабжен сопроводительной запиской.

После транспортировки хранят исследуемый материал в лаборатории -40-70°C.

Подготовка вируссодержащего материала для исследований

В лаборатории материал оттаивают, отмывают от глицерина, берут для исследований только часть, остальную хранят при -40-70°C (архив).

Ткани и органы измельчают стерильными ножницами, растирают в ступке со стерильным кварцевым песком. Из растертого материала готовят 10%-ную суспензию на фосфатном буфере или растворе Хенкса. Центрифугируют 1,5 -3 тыс об/мин, надосадочную жидкость отсасывают в стерильный флакон, освобождают от микрофлоры, добавляя пенициллин, стрептомицин, нистатин

по 100 тыс ЕД на 1 мл), контакт 30-60 мин, сеют на ПА, ПБ, МППБ, среда Сабуро или Чапека. Если в суспензии роста нет, то ее можно использовать для вирусологических исследований и хранить -20-70°С.

Смывы из носа, глаз встряхивают с тампонами 10-15 мин, отжимают, центрифугируют 2-3 тыс об/мин – 20 мин, надосадочную жидкость сливают, добавляют пенициллин и стрептомицин по 100 тыс ЕД, выдерживают, делают посев, остальной материал замораживают.

К 1 г фекалий добавляют 10 мл раствора Хенкса, стерильные бусы, встряхивают, центрифугируют 2-3 тыс об/мин, добавляют пенициллин, стрептомицин, нистатин по 300 тыс. ЕД , а также 200 мкг тетрациклина на 1 мл экстракта, делают посев, если роста нет, экстракт замораживают.

В мочу добавляют антибиотики, затем делают посев, при отрицательном результате замораживают.

Содержимое папул и пузырьков разводят физраствором 1:5, корки растирают в ступке разводят физраствором 1:5- 1:10, центрифугируют 2-3 тыс об/мин в течение 10-15 мин, добавляют антибиотики 200-500 тыс ЕД на 1 мл, используют для заражения.

Кровь оттаивают, центрифугируют, добавляют антибиотики 100-200 тыс ЕД на мл, используют после контроля на стерильность. Свернувшуюся кровь растирают в ступке с раствором Хенкса 1:1.

Методы заражения лабораторных животных

К лабораторным животным относят белых мышей, белых крыс, морских свинок, кроликов.

Лабораторных животных используют для:

- биопробы с целью обнаружения вируса в материале, (развивается заболевание с характерными признаками);
- первичного выделения вируса; органы и ткани по-

гибших содержат биомассу вируса;

- накопления вируса;
- поддержания вируса в активном состоянии;
- титровании вируса;
- получения гипериммунных сывороток.

Вирусосодержащий материал может быть введен разными методами: подкожно, внутрикожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, внутривенно, интраназально, интрацеребрально.

Способ введения обусловлен тропизмом вируса - способностью репродуцироваться в определенных типах клеток. Если вирусы репродуцируются:

- в нервных клетках их называют – нейротропные (вирус бешенства);

- в клетках кожи- дермотропные (вирус оспы);

- в легких – пневмотропные (грипп);

- в разных клетках могут репродуцироваться – политропные (вирус ИРТ);

во всех типах клеток – пантропные (возбудитель чума собак).

Таблица 1 - Максимальные объемы вводимого материала для лабораторных животных, мл

Метод заражения	Кролики	Морск. свинки	Белые крысы	Белые мыши
Внутрикожный	0,1	0,1	0,05	0,02
Подкожный	5,0	3,0	3,0	0,5
Внутримышечный	5,0	2,0	1,0	0,3
Внутрибрюшинный	10,0	5,0	2,0	1,0
Внутривенный	5,0	2,0	2,0	1,0
Интраназальный	1,0	0,3	0,1	0,03
Интрацеребральн	0,3	0,05	0,03	0,02

Вскрытие лабораторных животных

Для изучения патологоанатомических изменений и получения вирусосодержащего материала экспериментально зараженных животных вскрывают сразу после гибели.

Труп фиксируют на вскрывочном столике или на доске. Брюшную и грудную полости вскрывают при фиксации животных в спинном положении.

Шерсть обрабатывают дезинфицирующим раствором, используют стерильные ножницы и пинцеты. После вскрытия кожи инструменты меняют.

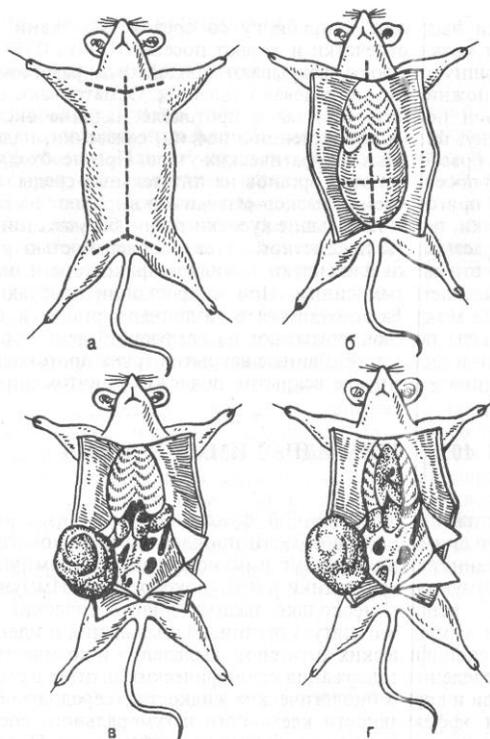


Рис. 1. Вскрытие мыши
а - г – этапы вскрытия

Череп вскрывают, укрепив погибшее животное в брюшном положении, в последовательности, представленной на рис. 2.

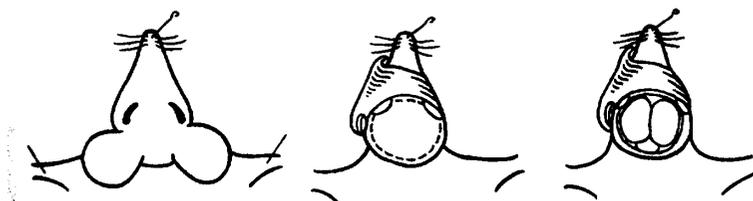


Рис. 2. Порядок вскрытия черепа у белой мыши

Контрольные вопросы и задание для самостоятельной работы

1. Определение «вирус», «вирусная частица», «вирион».
2. Классификация вирусов (заполнить таблицу).

Таблица 2 - Семейства и роды ДНК-, РНК-содержащих вирусов

Название семейств	Роды семейства	Возбудители
ДНК-содержащие вирусы		

ТЕМА №2

Строение куриного эмбриона. Способы заражения, вскрытия

Цель занятия. Познакомиться со строением КЭ, методами заражения, вскрытия, признаками размножения вирусов в КЭ

Оборудование и материалы. КЭ, таблицы, овоскоп, шприцы, иглы, «вируссодержащий материал», спиртовки, погибшие КЭ, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Освоить методику заражения и вскрытия КЭ. Диагностику вирусных заболеваний КЭ по патологоанатомическим признакам.

Строение куриного эмбриона

Куриные эмбрионы (КЭ) стали использовать для вирусологических исследований с 30-х годов прошлого века. Они чувствительны ко всем вирусам птиц, ко многим млекопитающих. КЭ стерильные, гарантировано стерильные в СПЭВ- хозяйствах, свободных от инфекционных болезней. Используют КЭ в возрасте 5-12 дн с целью:

- выделения и накопления вируса;
- титрования вируса;
- идентификации вируса в реакции нейтрализации.

В составе КЭ оболочки и структуры:

▪ *скорлупа* пористая оболочка проницаема для воздуха и микробов, выполняет функцию защиты, а Ca^{++} источник для питания КЭ;

▪ *подскорлупная оболочка*, служит фильтром для механических частиц;

▪ *воздушная камера*, образуется между листками подскорлупной оболочки, содержит воздух;

▪ *хорионаллантоисная оболочка (ХАО)*, выполняет

дыхательную функцию;

- *аллантаисная полость с жидкостью, для сбора продуктов обмена;*

- *зародыш, располагается головой к воздушной камере, погружен в амниотическую жидкость;*

- *амнион, содержит 1 мл жидкости, (буферной среды для развития зародыша);*

- *желточный мешок* пуповиной связан с зародышем и является источником питания для зародыша;

- *остаток белка, на ранних стадиях развития формирует белковую оболочку – источник воды, органических соединений для питания, содержит лизоцим.*

Способы заражения куриных эмбрионов

Способ заражения зависит от возможности размножения вирусов и размеров зародышевых структур. Доставленные эмбрионы помещают в термостат при температуре 37°C, влажность 60-70%, воздушной камерой вверх, сутки они должны адаптироваться.

Перед заражением эмбрионы овоскопируют, отмечают границы воздушной камеры, место зародыша, желточного мешка (зона без сосудов), белок. Доза для заражения 0,2 мл.

Заражение в боксе, скорлупу обрабатывают иодированным спиртом, фиксируют в специальной подставке, используют стерильные иглы и шприцы.

Существуют способы:

- *в желточный мешок с 5 по 7 день инкубации для размножения вируса болезни Марека, ринопневмонии лошадей, катаральной лихорадки овец. Возможны два варианта заражения в вертикальном положении в центре под углом на глубину 3,5-4 см и горизонтальном положении, отступив 1 см от центра вниз, на глубину 3,5 – 4 см;.*

- *в амниотическую полость в возрасте 6-10 дней 1 мл жидкости. Для культивирования вируса гриппа, нью-*

каслской болезни, ринопневмонии лошадей. *Первый вариант* – *закрытый*, под контролем овоскопа, яйцо горизонтально зародышем вверх, тупой иглой по направлению к зародышу, движение эмбриона доказывает, что в амнионе. *Второй вариант* – *открытый*, срезают скорлупу, подскорлупную оболочку, окно 1,5х2,5см, захватывают ХАО + амниотическую оболочку, вводят вирусосодержащий материал, запаивают покровным стеклом или лейкопластырем, инкубируют в вертикальном положении.

- *в аллантаоисную полость* в 9-11 дней (вирусы гриппа, ньюкаслская болезнь, ринопневмония лошадей, везикулярный стоматит и др). *Первый вариант* – сбоку выше воздушной камеры на 5-6 мм на глубину 1-1,2 мм, *второй вариант* – горизонтально в центр на глубину 2-3 мм.

- *на хорионаллантаоисную оболочку* на 10-12 день инкубации (вирус оспы, ларинготрахеита, чумы плотоядных, болезни Ауески, катаральной лихорадки овец). КЭ заражают через естественную воздушную камеру, вырезают окно 1,5х2 см, снимают подскорлупную оболочку, на обнажившийся участок ХАО наносят вирусосодержащий материал, отверстие закрывают пластырем или покровным стеклом.

После прокола скорлупу запаивают парафином.

Вскрытие куриного эмбриона

Погибших и живых вскрывают с целью обнаружения вируса и получения вирусосодержащего материала. Вирус может накапливаться на ХАО, в желточном мешке, в аллантаоисной и амниотической жидкости

КЭ вскрывают в стерильном боксе. Скорлупу обрабатывают иодированным спиртом. Вскрывают воздушную камеру, отсасывают аллантаоисную жидкость, амниотическую, выливают в стерильные флаконы. Срезают ХАО, помещают в стерильную чашку с физраствором,

затем расправляют в другой чашке. Извлекают эмбрион с желточным мешком, затем желточный мешок отрезают, помещают в стерильные чашки Петри.

Признаки размножения вирусов в курином эмбрионе

- Гибель в характерные для вируса сроки без патологоанатомических изменений.

- Патологоанатомические изменения в различных структурах КЭ:

- *кровоизлияния, узелки на ХАО* вызывают вирусы оспы, ИЛТ, болезни Ауески и др.).

- *обезвоживание и мумифицирование КЭ* под действием вируса ИБК;

- *прилипание лапок к голове под действием вируса ИБК*

- *перекручивание шеи* (признак размножения вируса ИБК);

- *дистрофия печени* – признак размножения вируса гепатита утят;

- *накопление уратов* (соли мочевой кислоты), фиброзные пленки обнаруживают при поражении почек вирусом ИБК;

- *акрания и отеки шеи* при пикорнавирусной инфекции, наличие кровоизлияния в мозг и акронии признак перегрева в первые дни инкубирования;

- гемагглютинирующие свойства аллантоисной и амниотической жидкости, установленные помощью капельной РГА, когда к капле аллантоисной жидкости добавляют взвесь эритроцитов, через 5-10 мин учет по образованию хлопьев, свидетельствуют о наличие гемагглютинирующих вирусов;

- Иногда не удается обнаружить ни один из признаков, такой пассаж называют «слепым»

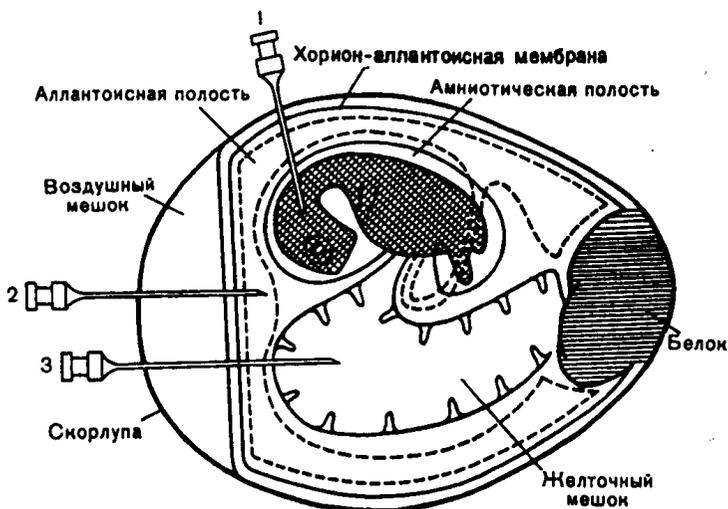


Рис. 3. Способы заражения куриного эмбриона.

- 1 — в амниотическую полость и зародыш; 2 — в аллантоисную полость; 3 — в желточный мешок

Контрольные вопросы

1. Характеристика прионов и вириодов
2. Репродукция вирусов.
3. Строение КЭ.
4. Способы заражения КЭ.
5. Признаки размножения вирусов в КЭ.

Задание для самостоятельной работы

1. Определить патологию у КЭ, представленную на рис.
- 4, результаты внести в таблицу 3.



Рис. 4. Разные виды патологии у КЭ

Таблица 3 - Виды патологии у КЭ

№ п.п.	Тип патологии
1.	
2.	
3.	
4.	
5.	
6.	
7.	

Контрольные вопросы

1. Репродукция вирусов
2. Вирогения.
3. Способы заражения КЭ
4. Характеристика прионов и вириодов.
5. Способы культивирования вирусов.

ТЕМА № 3

Приготовление первично-трипсинизированной культуры клеток из кожно-мышечной ткани КЭ (культуры куриных фибробластов). Титрование вирусов по БОЕ

Цель занятия. Познакомиться со, методикой приготовления КФ, титрования вирусов по БОЕ

Оборудование и материалы. Стерильные инструменты для вскрытия , КЭ, таблицы, овоскоп, шприцы, иглы, спиртовки, центрифуга, центрифужные пробирки, пипетки, раствор Хенкса, раствор 0,15%-ного трипсина, среда 199, Игла, электронный ресурс «Культуры клеток».

Задание для самостоятельной работы студентов. Освоить методику приготовления культур клеток и титрования вирусов по БОЕ.

Для приготовления культуры клеток куриных фибробластов (КФ) – популяции клеток эпителия, мышц КЭ, прикрепленных к стенке пробирки, используют 9 – 11-дневные куриные эмбрионы.

Приготовление КФ

Приготовление культуры клеток включает этапы:

- 9-11 - дневные эмбрионы *овоскопируют*, отмечают воздушную камеру, тело.
- *Вскрывают*, извлекают зародыш в стерильную чашку Петри. Отрезают лапы, крылья, голову, извлекают внутренние органы, кожно-мышечный мешок помещают в стерильную чашку Петри, измельчают.
- *Отмывают* раствором Хенкса, центрифугируя при 1 тыс. об/мин.- 10 мин 3 раза.
- Осадок *заливают 0,15%-ным подогретым трипсином* 1:3, ставят на магнитную мешалку, через 3-5 мин сливают в колбу, которая стоит на льду, после

охлаждения, фильтруют через стерильный марлевый фильтр.

- Суспензию клеток *центрифугируют, осадок ресуспендируют* в 10 мл теплой +37⁰С среде 199.
- *Определяют количество клеток в 1 мл суспензии* в камере Горяева, добавляя к суспензии 0,1%- ный раствор кристаллвиолета и 0,1н. раствор лимонной кислоты.
- К суспензии *добавляют ростовую питательную среду* из расчета 1 мл на 700 тыс.клеток и ставят в термостат на 48 часов.

Культуры куриных фибробластов используют при работе с вирусом болезни Ауески, оспы птиц, Ньюкаслской болезни, гриппа птиц, саркомы Рауса.

Титрование вирусов

При работе с вирусами возникает необходимость определения их количества с целью:

- *определения дозы для заражения КЭ, лабораторных животных, культур клеток;*
- *активности противовирусной вакцины, диагностикума;*
- *идентификации полевого или вакцинного штамма вируса.*

Титр вируса (Т) – это количество вируса, содержащегося в единице объема материала. Измеряют Т в единицах его активности по инфекционному или гемагглютинирующему действию.

Инфекционное действие вируса определяют :

- *в оснообразующих единицах Т по ООЕ;*
- *в бляшкообразующих единицах Т по БОЕ;*
- *по ЛД₅₀ – доза вируса, способная убивать 50% опытных животных, ИД₅₀ – доза, вызывающая клинические признаки или патоморфологические изменения у 50% лабораторных животных, ЭЛД₅₀*

- гибель 50% КЭ, ЭИД₅₀- изменения у 50% КЭ;
- по ЦПД₅₀- доза, вызывающая ЦПД (ЦПЭ) у 50% зараженных культур клеток;
- по ГАЕ ,1 ГАЕ вызывает агглютинацию вируса интенсивностью на ++

Определение титра по БОЕ

Вирусодержащий материал разводят 1:10, 1:100, 1:1000 в пробирках и заражают выращенную культуру клеток в колбах – матрацах, доза для заражения культур клеток 0,2 мл. Культуру клеток покрывают тонким слоем агара и ставят на инкубирование. Через 48 часов подсчитываем бляшки – участки погибших клеток в сплошном монослое культуры, от чего образуются просветленные участки. Каждая бляшка образуется при репродукции одной вирусной частицы. Бляшки подсчитывают и выполняют расчет титра по формуле:

$$T = n : (V \times a),$$

где n- среднее арифметическое бляшек, V – объем дозы (0,2), a- разведение.

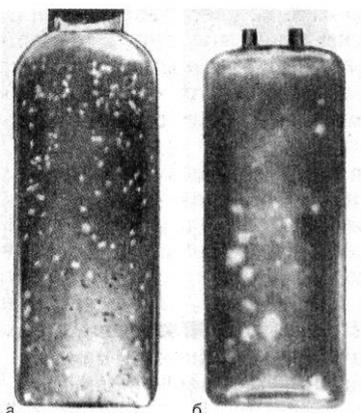


Рис.5. Бляшки вирусов в культуре клеток: а – бляшки вируса ньюкаслской болезни; б – бляшки вируса Коксаки

Пример: после заражения матрасцев с культурами клеток обнаружены бляшки: : 134,28,5.

Определяют $n = (134 + 28 + 5) : 3 = 55,6$

$T = 55,6 : (0,2 \times (0,1 + 0,01 + 0,001)) = 55,6 : 0,0222 = 2504$, т.е. в 1 мл суспензии вирусосодержащего материала содержится 2504 доз вируса, 1 доза которого способна вызвать образование 1 бляшки.

Контрольные вопросы

1. Характеристика культур клеток.
2. Типы питательных сред для культур клеток.
3. Типы взаимодействия вируса с клеткой.
4. Приготовление КФ.

ТЕМА № 4

Титрование вирусов по ГАЕ, ООЕ, ЦПД₅₀, LD₅₀

Цель занятия. Познакомиться с методикой титрования вирусов по ГАЕ, ООЕ, LD₅₀, ЦПД₅₀

Оборудование и материалы. Плексигласовые пластины, компоненты для РГА, пипетки автоматы, электронный ресурс «Культуры клеток», таблицы.

Задание для самостоятельной работы студентов. Освоить методику приготовления культур клеток и титрования вирусов по ГАЕ, ООЕ, LD₅₀, ЦПД₅₀ Выполнить расчеты результатов титрования.

Если вирусы не образуют бляшек, их Т определяют по ГАЕ, ООЕ, ЛД₅₀, ЭЛД₅₀, ЦПД₅₀

Титрование вирусов

по гемагглютинирующей активности (ГАЕ)

В основе реакции гемагглютинации (РГА) лежит способность некоторых вирусов, содержащих в супер-

капсиде гемагглютинин агглютинировать (склеивать) эритроциты определенного вида животных, человека. Агглютинация осуществляется прикреплением вириона к двум эритроцитам.

Гемагглютинирующую активность вируса оценивают по ГАЕ, за 1 ГАЕ принимают дозу вируса, способную агглютинировать 50% эритроцитов. Разведение, при котором оценка не менее 2++ и будет 1 ГАЕ (гемагглютинирующая единица).

Титруют вирусы по гемагглютинирующей активности в реакции гемагглютинации (РГА), которую ставят двумя способами:

- по типу капельной РГА на предметном стекле, когда каплю взвеси эритроцитов и вирусосодержащего материала смешивают, положительный результат характеризуется склеиванием эритроцитов, интенсивностью 2++ и 4++++. Капельную РГА используют только для обнаружения гемагглютинирующих вирусов;

- по типу луночной РГА, в лунках плексигласовых пластин, где готовят разведения вируса, затем добавляют взвесь эритроцитов по схеме, представленной в таблице 4.

Таблица 4 - Схема титрование вируса в РГА

Компоненты/№ лунок	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Физраствор	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Вирусный материал	0,5	Готовим разведения								
1% суспен эритроцитов	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Учет 30-40 мин при комнатной температуре									
Результат T=128ГАЕ	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-
Разведение	1:2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024

После добавления компонентов, содержимое лунок перемешивают, выдерживают 30 – 60 мин при комнатной температуре. Реакцию учитывают в крестах ++++ - сплошной зонттик с кружевными краями; ++ округлый зонттик, а в центре осадок пунктик; - (отрицательная)- осадок пунктик. Контролем реакции служит лунка с 0,5 мл физраствора и 0,5 взвеси эритроцитов.

Титрование вирусов по ООЕ (оспообразующим единицам)

Титр вирусов, вызывающих образование на ХАО КЭ оспины (папулы, некротические фокусы, некротические узелки), определяют по ООЕ (оспообразующим единицам).

Для этого заражают 5 куриных эмбрионов на ХАО известным разведением вирусосодержащего материала в дозе 0,2. Погибших и охлажденных КЭ вскрывают, извлекают ХАО, подсчитывают оспины. Определяют титр по формуле:

$$T = \frac{\Sigma}{V \times A}, \text{ где}$$

Σ – среднее арифметическое оспин;

V – объем дозы (0,2);

A – разведение.

Пример: после заражения 5 КЭ вирусосодержащим материалом разведением 1:10, дозой 0,2, количество оспин 10,11,13,18,8. Определяют:

$$\Sigma = (10+11+13+18+8) : 5 = 12;$$

$$T = 12 : (0,2 \times 0,1) = 600 \text{ ООЕ, т.е.}$$

В 1мл вирусосодержащего материала содержится 600 доз вируса, каждая доза способна образовывать 1 оспину на ХАО.

Определения титра вируса по ЦПД (ТЦПД)

Титр вирусов, способных к цитопатогенному действию, определяют по ЦПД.

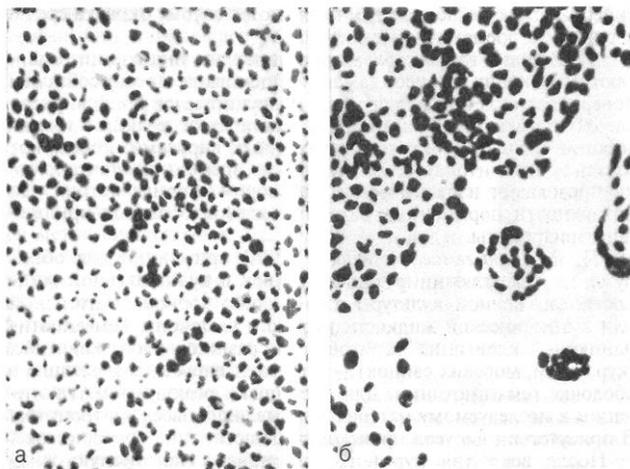


Рис. 6. Культура клеток: а – неизмененные клетки; б - цитопатические изменения в клетках.

В пробирки с выросшей культурой клеток (по 6 пробирок для каждого разведения вируса) вносят разные разведения вируса 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} по 0,2 мл, равномерно распределяют по монослою, затем зараженные культуры оставляют на 1-2 часа при комнатной температуре и вносят по 0,9 мл поддерживающей питательной среды, инкубируют при 37°C . Ежедневно просматривают пробирки под малым увеличением микроскопа. Отмечают ЦПД:

- появление округлых клеток;
- образование бляшек;
- образование включений;-
- формирование симпластов
- образование синтициев.

Расчет Т по формуле Кербера:

$Lg TЦПД_{50} = [lgB - (B-50) \times LgD] : (B-a)$, где

B- разведение, при котором ЦПД > 50%;

b - % культур клеток, имеющих поражение соответствующего B;

a – процент соответствующего разведения, при котором поражение клеток менее 50%;

D- коэффициент разведения = 10.

Пример: при заражении вирусом парагриппа (ПГ-3) по 6 культур клеток ЦПД обнаружено:

Таблица 5 – Результаты заражения культур клеток вирусом

Разведения вируса	Кол-во пробирок с ЦПД	% ЦПД
10^{-1}	5	83,3
10^{-2}	4	66,6
10^{-3}	4	66,6
10^{-4}	4	66,6
10^{-5}	2	33,3
10^{-6}	0	0

$Lg T ЦПД_{50} = [Lg 10^{-4} - (66,6 - 50 \times Lg 10)] : (66,6 - 33,3) = [(-4 - 11,6) \times 10] : 33,3 = -156 : 33,3 = -4,68$, т.е T Lg ЦПД₅₀ == -4,68, это означает, что ЦПД₅₀ клеток вызывает разведение вируса $10^{-4,68}$ (T= $10^{-4,68}$)

Если вирусы не образуют оспин, бляшек, ЦПД, их T определяют по ЛД₅₀, ЭЛД₅₀ редко ИД₅₀, ЭИД₅₀.

Титрование вирусов по ЛД₅₀, ЭЛД₅₀, ЦПД₅₀,

Готовят разведения вирусосодержащего материала 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , затем заражают лабораторных животных или КЭ, затем учитывают результат, определяя количества павших, % летальности.

Таблица 6. – Методика определения и учета титра вируса по ЛД₅₀, ЭЛД₅₀, ЦПД₅₀

Разведение	Выжило	Пало	% летальности
10 ⁻¹	0	6	100
10 ⁻²	0	6	100
10 ⁻³	1	5	83,3
10 ⁻⁴	4	2	33,3
10 ⁻⁵	6	0	0

Расчет ведут по формуле Кербера:

Lg ТЛД₅₀ = lgB - (в-50) x LgD : (в-а), где

B- разведение, при котором гибель > 50%,

в - % соответствующий гибели разведения B,

а – процент соответствующего разведения, при котором летальность менее 50%,

D- коэффициент разведения = 10.

Lg ТЛД₅₀ = Lg 10⁻³ – (83,3 – 50 x Lg 10) : (83,3 -33,3) = -3 – (33,3 : 50) = -3, 66. LgТЛД₅₀ = -3,66 , т.е. разведение вируса 10^{-3,66} вызывает гибель 50 % лабораторных животных , а T=10^{-3,66} .

Задание для самостоятельной работы

1. Определить титр вируса по ООЕ. При заражении по 0,2 мл каждым разведением 6 куриных эмбрионов количество оспин на ХАО составило:

Таблица 7– Результаты заражения КЭ

Разведения вируса	Количество оспин на ХАО, КЭ					
	1	2	3	4	5	6
10 ⁻¹	120	140	150	100	180	130
10 ⁻²	60	80	80	90	70	50
10 ⁻³	10	8	5	2	10	4
10 ⁻⁴	0	0	0	0	0	0

Расчет:

2. Определить титр по БОЕ вируса болезни Марека. По 0,2 мл каждого разведения вносили в 3 культуры клеток фибробластов. К концу опыта количество бляшек в монослое составило:

Таблица 8– Результаты заражения КФ

Разведение вируса	Количество бляшек в монослое клеток		
	1	2	3
10^{-1}	45	52	61
10^{-2}	40	37	42
10^{-3}	10	12	8
10^{-4}	1	0	2
10^{-5}	0	0	0

Расчет:

3. Определить ТЦПД₅₀ вируса парагриппа. Каждым разведением заражали по 4 культур клеток. Количество культур клеток с ЦПД составило:

Таблица 9– Результаты заражения культур клеток

Разведения вируса	Результат микроскопии культур клеток			
	1	2	3	4
10^{-1}	цпд	цпд	цпд	цпд
10^{-2}	цпд	цпд	цпд	цпд
10^{-3}	нет	цпд	цпд	цпд
10^{-4}	нет	цпд	цпд	цпд
10^{-5}	нет	цпд	нет	нет
10^{-6}	нет	нет	нет	нет

Расчет:

4. Определить Т ЛД₅₀ ротавируса, после заражения разведениями вируса по 6 белых мышей, количество павших и выживших животных животных составило:

Таблица 10 Результаты титрования ротавируса

Разведение	Выжило	Пало	% летальности
10^{-1}	0	6	
10^{-2}	0	6	
10^{-3}	1	5	
10^{-4}	4	2	
10^{-5}	6	0	

Расчет:

Контрольные вопросы

1. Титрование вирусов по ООЕ, БОЕ, ЦПД₅₀
2. Титрование вирусов по ГАЕ, ЛД₅₀.
3. Мутации вирусов.
4. Рекомбинации вирусов.
6. Противовирусное действие показателей ЕР.
7. Механизм противовирусного иммунитета.

Серологические реакции в вирусологии

Цель занятия. Познакомиться с методиками постановки и учета серологических реакций

Оборудование и материалы. Плексигласовые пластины, чашки Петри с агаром, компоненты и диагностикумы для РЗГА, РНГА, РИД, пипетки автоматы, таблицы.

Задание для самостоятельной работы студентов. Освоить методики постановки и учета РЗГА, РНГА, РИД, РН.

Вирусы- хорошие антигены, поэтому вирусы, противовирусные антитела (Ig) можно обнаружить в исследуемом материале с помощью серологических реакций таких как реакция:

- *диффузной преципитации (РДП, РИД);*
- *задержки гемагглютинации (РЗГА),* еще эту реакцию называют *реакцией торможения гемагглютинации (РТГА)* ставят с вирусами, обладающими гемагглютинирующей активностью;

- *непрямой гемагглютинации;*
- реакция связывания комплемента РСК
- *реакции нейтрализации РН;*
- *иммуноферментного анализа ИФА,* современная чувствительная реакция;
- *полимеразной цепной реакции ПЦР* – увеличение числа копий определенных фрагментов ДНК *in vitro* с последующей индикацией электрофорезом, гибридизацией, калориметрически, флуориметрически, радиоизотопно. Метод ПЦР удобен для диагностики наследственных и вирусных заболеваний.

- *реакция иммунофлуоресценции РИФ*

Серологическая диагностика вирусных заболеваний предусматривает выявление антител (Ig) и у переболев-

ших животных (реконвалесцентов). Выявление антител (Ig) у реконвалесцентов называется ретроспективной диагностикой.

Реакция диффузной преципитации в агаровом геле (РДП)

Широкое применение в вирусологии имеет РДП, сущность которой в осаждении антигена антителами с образованием комплекса и полосы преципитации в агаровом геле. Ставят с целью:

- обнаружения вируса, используя заведомо известную сыворотку или иммуноглобулин (вирус бешенства в экстракте мозга, используя антирабический диагностический глобулин);
- обнаружения антител у обследованных, используя заведомо известный антиген.

Реакцию диффузной преципитации в агаровом геле для выявления лейкозных Ig называют РИД (реакция иммунной диффузии).

Методика постановки РИД

Для постановки реакции используют лейкозный диагностикум, в составе которого лейкозный антиген, преципитирующая сыворотка, растворитель антигена, солевая смесь и агар для приготовления геля

● Готовят гель-агар: солевую смесь высыпают в колбу, добавляют 180 мл дистиллированной воды, 20 мл растворителя. Помещают на водяную баню до полного растворения, разливают в чашки, оставляют для застывания, делают лунки.

- Вносят компоненты: разбавленный антиген ВЛ в центральную лунку, в периферические – специфическую преципитирующую сыворотку (2 лунки) и 4 испытуемые сыворотки.

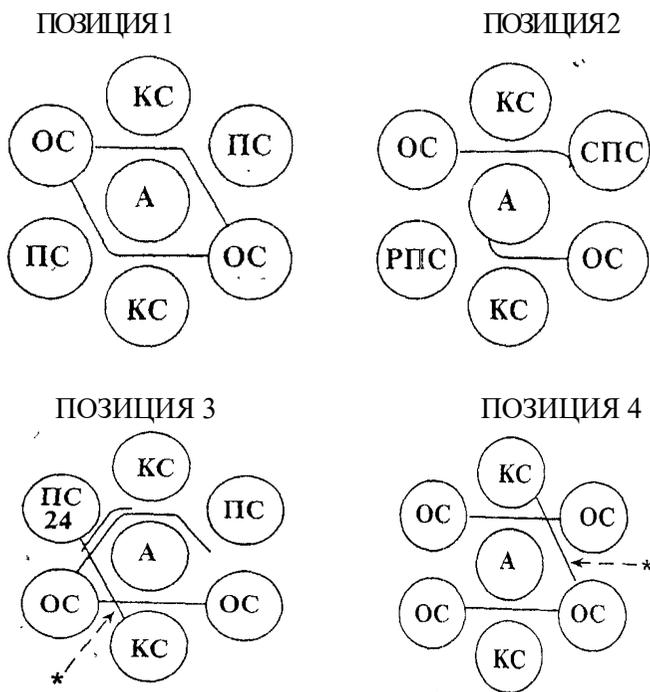


Рис. 7. Результаты реакции антигена ВЛКРС с отрицательной (ОС), положительной (ПС), слабopоложительной (СПС), резко положительной (РПС)

Помещают в эксикатор при комнатной температуре, учет через 48 часов, не позже 96 часов по образованию белых полос преципитации в агаровом геле..

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Сущность РНГА в склеивании эритроцитарного ди- агностикума антителами.

РНГА применяют для:

- обнаружения вируса в исследуемом материале, используя заведомо известный антиглицеринный эритроцитарный антиген (диагностикум), полученный путем адсорбции специфических антител на поверхности формализированных эритроцитов барана, широко применяются для обнаружения вируса классической чумы свиней;

- определения титра антител в сыворотке крови при различных вирусных заболеваниях, используя известный эритроцитарный диагностикум, полученный адсорбцией формализированных эритроцитов барана антигенами вирусов.

РНГА ставят по типу:

- пластинчатой в лунках плексиглазсовых пластинок (макрометод), когда в лунки разливают физраствор, готовят разведение материала, добавляют эритроцитарный диагностикум; определяют титр исследуемого материала, Экспозиция взаимодействия 1-2 часа, выдерживания при комнатной температуре или в термостате 37⁰ С. Учет в крестах:

- кружевной осадок в виде тонкой пленки с зазубренными краями - ++++;

- кружевной осадок с округлыми краями - +++;

- осадок- диск, пунктик – отрицательная;

- капельной на предметном стекле, с целью индикации антител.

Реакция задержки гемагглютинации (РЗГА, РТГА)

Реакция задержки или торможения гемагглютинации (РЗГА, РТГА) – серологический метод, широко используемый для обнаружения вирусного гемагглютинина (гемагглютинирующего вируса) с помощью антигемагглютинирующих антител. При контакте вируса с гомологичными антителами происходит связывание антител с гемагглютинином вируса, образуется комплекс «антиген и антитело» при этом нейтрализуется гемагглютинирующая

щая активность вируса, в результате чего вирус теряет свойство агглютинировать эритроциты. РТГА впервые предложена Херстом в 1941 г. в США для обнаружения вирусов гриппа и его титра.

РЗГА, РТГА также широко применяют для обнаружения гемагглютинирующих антител, когда готовят разведения сыворотки, вносят вирус в дозе 4 ГАЕ, затем эритроциты.

РЗГА, РТГА(реакция торможения гемагглютинации) ставят с целью:

- обнаружения гемагглютинирующих вирусов и установления их титра в испытуемом экстракте;
- определения титра антител против гемагглютинирующих вирусов.

РЗГА ставят в лунках макрометодом и микрометодом в планшетах.

РЗГА ставят в этапа:

- вначале готовят разведения сыворотки в лунках пластин или планшетов, затем добавляют вирус в количестве 4 ГАЕ, экспозиция взаимодействия 30 – 60 мин в зависимости от видов вирусов.

- на втором этапе постановки РЗГА, чтобы выявить нейтрализацию гемагглютинирующей активности вируса добавляет взвесь эритроцитов, перемешивают, оставляют при комнатной температуре на 30 – 60 мин.

Учет в крестах:

- ++++ - полное отсутствие гемагглютинации, осадок в виде пунктика (точки);
- ++ - осадок диск и пунктик;
- кружевной осадок в виде тонкой пленки - отрицательный результат..

Реакция нейтрализации (РН)

Реакция нейтрализации (РН) вирусов основана на

способности специфических антител достаточно прочно соединяться с вирионами и нейтрализовать их.

Сущность РН в контакте равных объемов сыворотки и вируса в течение некоторого времени при определенной температуре с последующим выявлением результатов с помощью биопробы.

РН ставят с целью:

- определить титр вируснейтрализующих антител у обследуемых, используя известный вирус;
- идентификации выделенного неизвестного вируса, испытывая его с заведомо известными сыворотками;
- определения количественного содержания (титр) антител в лечебных, профилактических, диагностических сыворотках.

РН ставят в двух модификациях:

- с постоянным разведением иммунной сыворотки и разными разведениями вируса для идентификации неизвестного вируса;
- с постоянной дозой известного вируса и разными разведениями исследуемых сывороток для обнаружения и титрования неизвестных противовирусных антител в парных сыворотках у больных и при ретроспективной диагностике, установления активности приготовленных лечебно-профилактических сывороток

Для РН используют лабораторных животных, куриные эмбрионы, культуры клеток.

Результаты РН учитывают по отсутствию:

- гибели, развития клинической картины болезни и патологических изменений в органах и тканях лабораторных животных;
- гибели, патологических изменений в оболочках и гемагглютининов в жидкостях полостей куриных эмбрионов;

▪ цитопатического действия (ЦПД) или бляшкообразование в культуре клеток.

Отсутствие гибели биологических моделей это положительный результат (+), гибель биологических моделей отрицательный результат (-).

Методика РН с разведенными сыворотками

Вначале титруем вирус на биологических моделях и определяем его титр 100 ЭД₅₀/мл.

Сыворотки для РН должны быть освобождены от термолабильных неспецифических ингибиторов путем прогревания 56° С – 30 мин, кур - 58°С, кроликов - 60°.

Готовят двукратные разведения сыворотки: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:132, 1:256, 1:512, предварительно прогретой для удаления комплемента.

Смешивают равные объемы каждого разведения сыворотки и вируса 100 ЭД₅₀, смесь оставляют для контакта при 37° С от 30 мин до 18 час в зависимости от вида вируса.

После контакта вируса с разными разведениями сыворотки, смесями заражают лабораторных животных, либо куриные эмбрионы, либо культуры клеток.

Результаты учитывают через некоторое время по отсутствию или гибели биологических моделей, появлению ЦПД в культурах клеток.

Реакцию ставят с положительным и отрицательным контролями

Учитывая результат, определяют разведение сыворотки, при которой она защищает 50% биологических моделей от действия 100 ЭД₅₀.

Расчет по формуле Кербера:

$Lg TЭД_{50} = lгД + (Lгd : 2) - Lгd \times (\sum r : n)$, где

Д- наибольшее разведение, защищающее 100% биологических объектов;

d – коэффициент разведения, равен 2

г- количество, погибших моделей или наличие ЦПД в культурах клеток в каждом разведении,
 п- количество объектов при испытании каждого разведения

Таблица 11 – Схема постановки и учета РН с разведенными сыворотками на КЭ

Разведения сыворотки	Количество зараженных КЭ	Доза для заражения смеси	Кол-во выживших	Кол-во погибших
1:2, $10^{-0,3}$	4	0,2	4	0
1:4, $10^{-0,6}$	4	0,2	4	0
1:8, $10^{-0,9}$	4	0,2	3	1
1:16, $10^{-1,2}$	4	0,2	3	1
1:32, $10^{-1,5}$	4	0,2	3	1
1:64, $10^{-1,8}$	4	0,2	1	3
1:128, $10^{-2,1}$	4	0,2	1	3
1:256, $10^{-2,4}$	4	0,2	0	4

$$\text{Lg ТЭД}_{50} = \text{Lg } 10^{-0,6} + (\text{Lg } 2 : 2) - \text{Lg } 2 \times (0:4 + 0:4 + 1:4 + 1:4 + 1:4 + 3:4 + 3:4 + 4:4) = -0,6 + (0,3 : 2) - (-0,3 \times 3) = -0,6 + (-0,15) + (-0,9) = -1,65$$

Находим по таблице антилогарифмов, что это разведение 1: 48 = ТЭД₅₀ – защищающее 50% КЭ от 100 ЭД₅₀., т.е. вирус соответствует виду испытуемой сыворотке, которая в титре 1:48 нейтрализует его.

Методика РН с разведениями вируса

Шире в лабораторной практике используют методику с разными разведениями вируса.

- Готовят в пробирках десятикратные разведения вируса 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} – 2 ряда.

- Ко всем разведениям первого ряда добавляют тот же объем специфической сыворотки (SS) в неболь-

шом разведении (1:10, 1:20).

- Ко всем разведениям второго ряда добавляют нормальную сыворотку (SN) в таком же разведении.

- Смеси выдерживают установленное время при определенной температуре.

- Заражают тест - объекты (КЭ, лабораторных животных, культуры клеток).

- Ведут наблюдения за зараженными биологическими моделями, отмечают погибших, появление ЦПД в культурах клеток.

- Рассчитывают Т вируса, нейтрализованного специфической сыворотки T_{ss} и титр вируса, нейтрализованный нормальной сывороткой T_{SN} .

- Определяют индекс нейтрализации (ИН) по формуле:

$$ИН = T_{SN} : T_{ss}$$

ИН показывает во сколько раз специфические антитела могут снизить титр вируса путем нейтрализации. Если $ИН \leq 10$, то результат отрицательный, если $ИН \leq 50$ – сомнительный, если $ИН \geq 50$, то результат РН положительный.

Пример: сыворотка против вируса НБ нейтрализовала полевой вирус НБ в титре 10^{-2} , а нормальная - вирус разведенный 10^{-5} . $ИН = 10^{-5} : 10^{-2} = 1000$ раз.

РН с разными разведениями вируса используют для идентификации вируса, используя заведомо известную сыворотку.

Контрольные вопросы

1. Сущность и методика постановки РИД.
2. Сущность и методика постановки РЗГА.
3. Сущность и методика постановки РНГА.
4. Сущность и методика постановки РН

ТЕМА №6

Иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР), реакция иммунофлуоресценции (РИФ)

Цель занятия. Познакомиться с методиками постановки и учета ИФА, ПЦР, РИФ

Оборудование и материалы. Диагностикумы ИФА, ПЦР, люминесцирующие сыворотки, пипетки - автоматы, флуоресцирующие сыворотки, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Учесть результаты РДП, зарисовать, дать заключение. Освоить методику постановки и учета ИФА. Разобрать методику постановки и учета ПЦР на примере идентификации бифидобактерий, РИФ.

Рис.8. Результаты РДП.

Иммуноферментный анализ

ИФА – высокочувствительный метод выявления комплекса антиген - антитело, меченого ферментом, по разложению субстрата и образованию окрашивания или изменению плотности раствора.

ИФА применяют для:

- *обнаружения антигена (возбудителя)* в исследуемом материале;
- *антител у обследуемых (больных, переболевших, вакцинированных).*

ИФА ставят в двух вариантах:

- *гистохимическом*, который называют иммунопероксидазной реакцией, ставят для выявления возбудителя в мазках, гистосрезках, культурах клеток, выращенных на предметных стеклах, используя методы:

- прямой иммунопероксидазный тест, когда мазки-отпечатки или культуру клеток, инфицированную вирусом фиксируют ацетоном, охлажденным до -20° в течение 20 мин, высушивают при комнатной температуре, наносят иммунопероксидазный конъюгат, выдерживают 1-2 (6 часов) при 37° С во влажной камере, промывают физраствором, дистиллированной водой, высушивают; наносят субстрат диаминобензидинтетрахлорид на 5-10 мин, отмывают, высушивают.

- непрямой метод, когда на фиксированные мазки наносят специфическую сыворотку на 1-2 часа при 37° С во влажной камере, промывают 5 мин физраствором, дистиллированной водой, наносят антивидовой иммунопероксидазный конъюгат на 1-6 часов при 37° С, промывают дистиллированной водой, высушивают, наносят субстрат диаминобензидинтетрахлорид, контакт 5-10 мин, отмывают высушивают

Учитывают результаты под световым микроскопом в положительных случаях образуется желто-коричневое окрашивание или гранулы черного цвета, используют редко.

- *твердофазном* – в лунках микропанелей (серологических планшетов).

Твердофазный вариант ИФА (ТФИФА, РЭМА – реакция энзиммеченных антител, ELISA – enzyme –linked immunosorbent assay) широко применяют для диагностики бактериальных и вирусных инфекционных заболеваний.

Для выявления антител лунки планшета сенсibilизируют инактивированным антигеном, а для выявления анти-

гена (возбудителя) в исследуемом материале – антителами.

Ставят ИФА в три этапа.

- В первом этапе взаимодействуют антиген и антитело при 37°C в течение 1 часа, с последующим 5-кратным промыванием промывочным буфером и осушением.

- Во втором этапе в лунки вносят *конъюгат* (антивидовой глобулин, меченный пероксидазой или щелочной фосфатазой), экспозиция взаимодействия 45 мин при 37°C , с последующим 5-кратным промыванием и осушением.

- В третьем этапе добавляют *субстрат* – вещество, разлагающееся под действием фермента с образованием окрашивания или изменения плотности раствора. Применяют субстраты:

- ортофенилдиамин (ОФД);
- 5-аминосалициловую кислоту;
- тетраметилбензидин (ТМБ);
- нитрофенилфосфат (НФФ).

Ортофенилдиамин (ОФД), 5-аминосалициловую кислоту, тетраметилбензидин (ТМБ) применяют, чтобы выявить пероксидазу. Нитрофенилфосфат (НФФ) используют, чтобы выявить щелочную фосфатазу.

Если происходит образование комплекса антигена с антителом, он фиксируется к стенкам лунок и обязательно взаимодействует с конъюгатом - антивидовым глобулином, меченным ферментом, адсорбируя фермент. При добавлении субстрата происходит его разложение под действием фермента, которое проявляется:

- появлением окрашивания: желто-коричневого при разложении ОФД, 5-аминосалициловой кислоты, НФФ и голубого - при разложении ТМБ;

- повышением плотность раствора, устанавливаемого на спектрофотометре.

Появление окрашивания в лунках, увеличение плот-

ности раствора характеризуется положительной реакцией.

Если комплекса антигена с антителом не образуется, конъюгат после контакта не фиксируется и смывается, субстрат не разлагается, окрашивания не образуется, изменения плотности раствора не происходит – отрицательная реакция.

Сущность и методика постановки полимеразной цепной реакции ПЦР

ПЦР – экспресс метод для индикации и идентификации возбудителя, разработан К. Мюллис в 1983 году.

Достоинства ПЦР:

- быстрота анализа;
- высокая чувствительность и специфичность;
- минимальное количество исследуемого материала;
- простота исполнения и возможность полной автоматизации.

Постановка реакции включает этапы:

- получение ДНК-образца (лизата исследуемого материала). Для этого исследуемый материал суспендируют в буфере, добавляют 1 мл 1 М раствора гидроксида натрия, выдерживают при 37⁰ С 6-7 мин, центрифугируют, надосадочная жидкость содержит ДНК и РНК;
- смешивание лизата с амплификационной смесью (ДНК-полимеразой, двумя видами праймеров, хлористым магнием, буфером, деионизированной водой и минеральным маслом);
- *амплификацию проводят в амплификаторе*, где происходит денатурация, отжиг, элонгация, по программе в автоматическом синтезаторе «Виктория» и в пробирках Эппендорфа. *Денатурация ДНК* происходит при 95⁰ С в течение 5 мин, при этом две цепи ДНК расходятся – термическое разделение молекулы ДНК на отдельные цепочки. *Отжиг или присоединение праймеров* – фрагментов ДНК, специфичных для возбудителя, используют синте-

тические праймеры или приготовленные; отжиг проводят при $50 - 65^{\circ}\text{C} - 30$ сек. Элонгация или полимеризация, когда вносят фермент ДНК-полимеразу при температуре $68 - 72^{\circ}\text{C}$ в течение 30 сек. В течение одного цикла происходит удвоение искомого генетического материала. Для индикации возбудителя необходимо получить несколько миллионов фрагментов ДНК, что удается в течение 25 – 40 циклов амплификации в течение 3 часов.

М 1 2 3 4 5 6 М

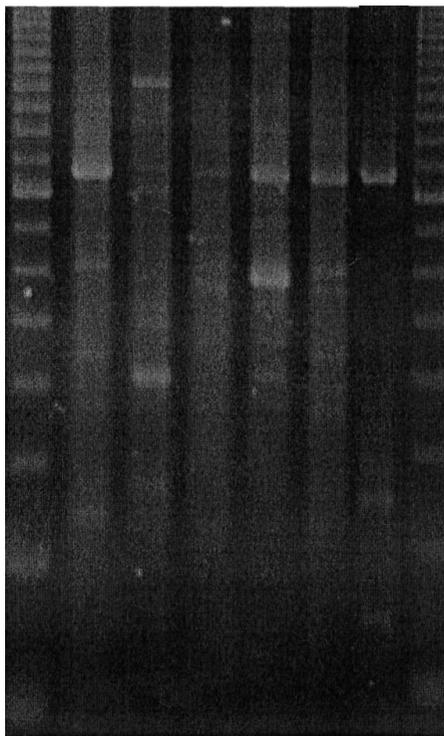


Рис. 9. ЕИС-ПЦР-паттерны исследованных штаммов: 1 — *Bifidobacterium adolescentis*; 2- *Bifidobacterium bifidum*; 3 — *Bifidobacterium breve*; 4 — *Bifidobacterium infantis*; 5 *Bifidobacterium longum*; 6 — *Bifidobacterium sp.* (Брянск); М — Стандарт молекулярных масс.

Реакция иммунофлуоресценции (РИФ) или метод флуоресцирующих антител (МФА)

- идентификация амплификата, т.е. определение вида полученной биомассы ДНК проводят электрофорезом, смешивают амплификат с красителем, затем его вносят в лунки агара камеры для электрофореза, включают камеру 5В/см, через 40-45 мин выключают и сравнивают полосы, по аналогии полос анализируют результаты, можно провести учет на компьютере.

Метод ПЦР применяют:

- для индикации и идентификации возбудителей;
- ДНК – идентификации личности человека, установления родства, выявления генов наследственных болезней.

Основу метода составляет явление люминесценции, сущность которого в поглощении световой энергии с последующим выделением его в виде светового излучения.

В РИФ люминесценция проявляется в виде флуоресценции – свечения веществ флуорохромов, сорбированных на скоплениях вирусов, возникающее в момент облучения возбуждающим светом.

Для возбуждения флуоресценции используют ультрафиолетовую или сине-фиолетовую часть спектра (длина волны 300-400 нм). Для этих целей выпускают люминесцентные микроскопы разных моделей: МЛ-1, МЛ-4, «Люмам».

Метод РИФ заключается в том, что антитела, соединенные с флуорохромом вступают в специфическую связь с гомологичным антигеном и образующийся комплекс обнаруживают по характерному свечению.

Методика постановки РИФ включает:

- *приготовление мазков* на предметных стеклах, можно использовать гистосрезы;

- *подсушивание мазков при комнатной температуре и фиксация охлажденным ацетоном* при комнатной температуре или при минус 15⁰ С от 15 мин до 4-6 часов;
- *окрашивание по прямому или непрямому методу*;
- *учет по интенсивности свечения в крестах*.

Интенсивность свечения оценивают:

- # - очень яркое свечение;
- +++ - яркое свечение;
- ++ - слабое свечение.
- - отрицательная реакция – нет свечения.

Окрашивание прямым методом

На фиксированный мазок наносят флуоресцирующую специфическую сыворотку, выдерживают 30 мин во влажной камере при 37⁰ С. Отмывают мазок физраствором, подсушивают и микроскопируют в люминесцентном микроскопе.

Флуоресцирующие специфические сыворотки еще называют конъюгатом. Для его приготовления используют высокоактивные гипериммунные сыворотки, меченные ФИТЦ - флуоресцизотиоцианатом (зеленое свечение) и РСХ- родомин сульфохлоридом (красное свечение).

Окрашивание непрямым методом

На фиксированный препарат наносят гипериммунную сыворотку, выдерживают 30 мин во влажной камере при 37⁰ С, отмывают и наносят антивидовую сыворотку, меченную флуорохромом, выдерживают 30 мин при 37⁰ С. Затем препарат отмывают, подсушивают и микроскопируют.

РИФ, (МФА) – экспресс – метод идентификации возбудителей характеризуется:

- высокой специфичностью и чувствительностью;
- простотой техники постановки;
- использованием минимального количества компонентов.

Контрольные вопросы

Вопросы коллоквиума №1:

1. Определение «вирус», «вирион», «вирусная частица».
2. Морфология и структура вирусов.
3. Классификация вирусов.
4. Репродукция вирусов
5. Понятие вирогении.
6. Реакция клетки на вирусную инфекцию.
7. Типы ЦПД.
8. Культивирование вирусов.
9. Первичные и диплоидные культуры клеток.
10. Перевиваемые культуры клеток.
11. Питательные среды для культур клеток.
12. Мутации вирусов.
13. Рекомбинации вирусов.
14. Антивирусные факторы естественной резистентности.
15. Противовирусное значение антител, механизм противовирусного иммунитета..
16. Иммунопатологическое действие вирусов.
17. Противовирусные средства.
18. Иммуномодулирующие препараты
19. Отбор и транспортировка противовирусного материала.
20. Строение куриного эмбриона.
21. Способы заражения КЭ.
22. Этапы приготовления куриных фибробластов.
23. Подготовка вирусосодержащего материала для исследования.
24. Признаки размножения вирусов в КЭ.
25. Титрование вирусов по ООЕ, БОЕ, ЦПД.
26. Титрование вирусов по ГАЕ, ЛД₅₀.
27. Сущность РДП (РИД), методика постановки.
28. Сущность, методика постановки РЗГА.
29. Сущность, методика РНГА.
30. Прионы и вироиды.
31. РН
32. ИФА.
33. ПЦР.
34. РИФ

ТЕМА № 7

Биотехнология производства вирусной биомассы. Производство противовирусных вакцин

Цель занятия. Коллоквиум по разделу «Общая вирусология». Познакомиться с биотехнологией производства вирусной биомассы, противовирусных вакцин.

Оборудование и материалы. Образцы противовирусных вакцин, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Определить ИН и специфичность вируса в РН. Определить Т вируса в биомассе по ЦПД. Познакомиться с образцами противовирусных вакцин, методами производства вирусной биомассы.

Таблица 12 Рассчитать ИН вируса, идентифицировать по результатам РН на культурах клеток

Сыворотки	Разведения вируса, наличие ЦПД					
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Сыворотка спец SS	ЦПД	ЦПД	Нет	Нет	Нет	Нет
Сыворотка нормальная SN	ЦПД	ЦПД	ЦПД	ЦПД	Нет	Нет

Расчет и заключение:

Таблица 13– Титр вируса по ЦПД при заражении 5 культур клеток в каждом разведении

Разведения вируса	Количество пробирок с ЦПД	% поражен
10^{-1}	4	
10^{-2}	4	
10^{-3}	3	
10^{-4}	2	
10^{-5}	1	
10^{-6}	Нет	

Расчет, заключение:

Биотехнология производства вирусной биомассы

Для промышленного производства используют культуры клеток. Технология производства вирусной биомассы включает:

- *культивирование* вируса с последующей индикацией, идентификацией и определением его титра;
- *очистку* вирусной биомассы от микрофлоры, фрагментов клеток, культуральной жидкости и концентрирование вирусной суспензии;
- *контроль* степени чистоты и гомогенности.

После завершения культивирования вируса проводят его *индикацию*, используя методы:

- электронной микроскопии;
- определения ЦПД;
- серологические реакции.

Титр вируса – количество вируса в 1 мл биомассы, определяют по биологическим свойствам, возможности вызывать БОЕ, ООЕ, LD₅₀, ИД₅₀, ЦПД₅₀.

Очистка биомассы подтверждает отсутствие микрофлоры, для этого делают посеvy на основные и элективные питательные среды.

Очистка и концентрирование биомассы предусматривает отделение вируса от культуральной жидкости, фрагментов клеток и осуществляется в три стадии:

- осветление клеточного лизата методами седиментации (отстаивания), центрифугированием при 3000 – 5000 об/мин, фильтрацией через фильтры, задерживающие клетки и их конгломераты;
- очистка и концентрирование вирусной суспензии,

которую проводят осаждением белков нейтральными солями или органическими растворителями, с последующим диализом или гель-фильтрацией, адсорбцией - элюированием с использованием геля фосфат кальция, двуокись кремния и др, ультрафильтрацией через мембранные фильтры, проницаемые только для вирусов;

- полная очистка концентрированной суспензии центрифугированием в градиенте плотности или аффинной хроматографией.

Контроль степени чистоты и гомогенности вирусной суспензии проводят по следующим критериям:

- наличие одного компонента на седиментационной диаграмме;

- наличие одного компонента при исследовании методом аналитического электрофореза;

- наличие только вирусных частиц при электронной микроскопии.

Типы противовирусных вакцин

- . *Живые вакцины* – это вирусные взвеси из:

- аттенуированных штаммов возбудителя, полученных из вирулентных штаммов путем аттенуации: пассажами на невосприимчивых животных, культурах клеток, действием УФЛ, химическими мутагенами;

- вирусов, имеющих антигенное родство с возбудителем, но не вызывающих заболевание у животных;

- рекомбинантных штаммов вируса.

- . *Убитые вакцины:*

- *цельновирионные*, инактивированные разными факторами и средствами: формальдегидом, этилендиамином, пропиолактоном, гидроксиломином, кристаллвиолетом, УФЛ, рентгеновским и γ -излучением, тепловым воздействием;

- *сплит- вирусные вакцины* – экстракты поверхностных структур вируса (суперкапсидов, капсидов);

- *субъединичные вакцины* – экстракты вирусного белка, не содержат балластных примесей;
- *молекулярные вакцины* содержат фрагменты протективных антигенов вируса;
- *синтетические вакцины* – протективные антигены вируса, полученные химическим синтезом.

Убитые вакцины сорбируют на адьювантах:

- гидроокиси алюминия (гидрооксале) (выпускает Щелковский биокомбинат);
- масляных эмульсиях, в составе которых ланолин и вазелиновое масло;
- сапонине – экстрагируется из коры мыльного дерева, используют в медицине (в составе столбнячного анатоксина), а для животных совместно с гидрооксалом.

Противовирусные вакцины проходят контроль на:

- *чистоту*, (содержат только вирусные компоненты, устанавливают используя методы электрофореза, электронной микроскопии);
- *безвредность* на морских свинках и кроликах, после вакцинации животные клинически здоровы;
- *иммунную и специфическую активность* биопробой на лабораторных, восприимчивых животных, которые должны выжить после введения смертельной дозы возбудителя или с использованием серологических реакций, вакцина должна обладать протективной активностью;
- *эпизоотологическую безопасность и эффективность* (результаты производственного испытания вакцины);
- *стабильность* при хранении – контроль чистоты, безвредности, активности в течение срока годности.

Контрольные вопросы

1. Биотехнология производства вирусной биомассы.
2. Типы противовирусных вакцин.

ТЕМА №8

Производства лечебно-профилактических и диагностических сывороток

Цель занятия. Познакомиться с технологией приготовления и контроля лечебно-профилактических сывороток

Оборудование и материалы. Образцы лечебно-профилактических и диагностических сывороток для ветеринарного и медицинского применения, фильтры Зейтца, пластины СФ, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать технологию приготовления лечебно-профилактических и диагностических сывороток, познакомиться с образцами биопрепаратов. Рассчитать титр противопастереллезной сыворотки по результатам РН.

Таблица 14 –Результаты РН противопастереллезной сыворотки

Разведения сыворотки	Количество зараженных мышей 100 ЛД ₅₀	Количество выживших	Кол-во погибших	Отношение количества погибших к испытуемым
1:2, 10 ^{-0,3}	4	4	0	0/4
1:4, 10 ^{-0,6}	4	4	0	0/4
1:8, 10 ^{-0,9}	4	4	0	0/4
1:16, 10 ^{-1,2}	4	3	1	1/4
1:32, 10 ^{-1,5}	4	3	1	1/4
1:64, 10 ^{-1,8}	4	1	3	3/4
1:128, 10 ^{-2,1}	4	0	4	4/4
1:256, 10 ^{-2,4}	4	0	4	4/4

Расчет, заключение

Технология производства лечебно-профилактических сывороток

Лечебно-профилактические сыворотки – это сыворотки крови гипериммунных животных, содержат большое количество специфических иммуноглобулинов (Ig), способных нейтрализовать вирионы и резко снизить титр вируса в организме больных, установить циркуляцию специфических Ig у здоровых животных.

Гипериммунизация животных – продуцентов (доноров) включает парэнтеральное введение нарастающих доз соответствующих антигенов с целью получения наивысшей ответной иммунологической реакции организма и максимального накопления в крови специфических иммуноглобулинов (Ig), обеспечивающих лечебный, профилактический, диагностический эффект.

Получение гипериммунных сывороток осуществляют в несколько этапов:

- *подбор животных продуцентов;*
- *грундирование* животных продуцентов;
- *гипериммунизация* животных-продуцентов;
- *приготовление* сыворотки;
- *контроль качества* препаратов.

Для производства гипериммунных сывороток в качестве продуцентов-доноров используют:

- *лошадей* в возрасте от 3 до 12 лет, массой 450 – 500 кг;
- *волов* в возрасте 3-8 лет, массой не менее 350 кг.

После 45 суточного карантина и обследования лошадей на сальмонеллез, трихомоноз, иназ, бруцеллез, туберкулез, пироплазмидозы, лептоспироз, а волов – на туберкулез, бруцеллез, лейкоз, лептоспироз, животных переводят в иммунизационные клиники.

Содержат доноров индивидуально, кормят 3-5 раз в

день, водопой вволю, соль-лизунец- вволю, животные пользуются моционом в выгульных площадках.

Грунди́рование – отбор животных-продуцентов с высокой реактивностью организма. Включает исследование сыворотки крови к антигенам, против которых будут проводить гипериммунизацию, если специфические Ig не обнаруживают, их грундируют, т.е. вводят антиген и, если титры Ig нарастают, используют для гипериммунизации.

Цикл гипериммунизации длительный 1 - 2 и более месяцев. Для гипериммунизации используют специальный антиген, а не вакцину, применяют даже биомассу вируса, начинают с малых доз и до 150 мл, способ введения подкожный или внутримышечный.

Антигены, биомассу вируса готовят в антигенной лаборатории.

По окончанию гипериммунизации, через 7 – 10 суток определяют накопление Ig, если титр соответствует максимальному, проводят забор крови в объеме 13% к общей массе крови или 800 мл на каждые 50 кг массы животного. Кровь берут из яремной вены, как правило, двукратно. Кровопускание предусматривает получение цитрированной крови.

После кровопускания животные отдыхают в течение месяца, затем им назначают новый цикл гипериммунизации. Животные – доноры могут пройти несколько циклов иммунизации (5 – 8) после чего их тотально обескровливают.

Приготовление гипериммунных сывороток начинают с сепарирования и дефибринирования плазмы цитрированной крови. Полученную сыворотку консервируют 0,5%-ным фенолом и отстаивают в специальных емкостях в течение двух месяцев. Отстоявшуюся сыворотку фильтруют через пластины Ф, чтобы задержать вы-

павшие в осадок белки, а затем стерилизуют фильтрацией через пластины СФ, расфасовывают в стерильные флаконы, закрывают герметически, обкатывают алюминиевыми колпачками, маркируют этикетками, сдают образцы на контроль.

Гипериммунные сыворотки, полученные из крови удалением форменных элементов и фибрина, называют нативными.

Лечебно-профилактические сыворотки, предназначенные для животных, выпускают только нативными. Для медицинских целей готовят очищенные гипериммунные лошадиные сыворотки, используя отечественный метод «Диаферм – 3» (диализ, ферментация), разработанный в 1954 году и затем усовершенствованный.

Метод «Диаферм – 3» включает 8 стадий:

- ферментативный гидролиз сывороточных белков пепсином в течение 1 часа, при рН 3,2 и при рН 4,2, температуре 22 – 25⁰ С;

- термоденатурация при 58⁰ С в течение 45 мин, при рН 4,3, в присутствии 14 – 14,5% сульфата аммония;ые фильтры;

- высаливание активных глобулинов сульфатом аммония 34% при рН 7,1;

- стерилизующая фильтрация через пластины СФ или мембранные фильтры;

- диализ и дополнительная очистка от балластных белков при рН 5.2 – 5,6 в присутствии хлороформа;

- стабилизация очищенной сыворотки в течение 3 месяцев;

- повторная стерилизующая фильтрация;

- расфасовка.

Приготовленные лечебно-профилактические сыворотки проходят производственный и государственный контроль.

Контроль сыворотки включает исследования:

- *визуальное* (цвет, консистенция), содержание белка, рН;

- *на стерильность*, посевом на питательные среды: ПА, ПБ, МППБ, среду Сабуро или Чапека для исключения микрофлоры;

- *на безвредность*, заражением морских свинок массой по 300 – 400 г, которым подкожно вводят 10 мл сыворотки (по 5 мл с обеих сторон), можно проверить безвредность на кролике. Животные должны оставаться здоровыми и не иметь заметной местной и общей реакции в течение 10-дневного наблюдения;

- *на специфическую* активность биологическим или серологическими методами. Биологический метод включает заражение иммунизированных и контрольных животных, иммунизированные должны остаться здоровыми при гибели контрольных. Серологические исследования с определением титра Ig проводят в РН, РСК, РЗГА, РНГА.

Технология приготовления диагностических сывороток

Сыворотки крови гипериммунных лошадей, кроликов, морских свинок, валухов для выявления специфических антигенов в исследуемом материале называют *диагностическими*

Выпускают несколько типов диагностических сывороток:

- *агглютинирующие* получают гипериммунизацией корпускулярными антигенами кроликов породы шеншилла весом 3 – 4 кг в возрасте 6 – 12 месяцев. Выпускают колипротективные, сальмонеллезные, листериозные, лептоспирозные сыворотки;

- *преципитирующие* – гипериммунизацией лошадей (сибиреязвенная), кроликов для выявления вирусов: лейкоза, инана, ящура, бешенства;

- *лизирующие* (комплементсвязывающие) для диагностики ящура, гипериммунизацией морских свинок слабовирулентным вирусом ящура с добавлением сапонина. Гемолитическую сыворотку для РСК получают гипериммунизацией кроликов эритроцитами барана до достижения титров гемолиза 1:6000;

- *антитоксические* – гипериммунизацией валухов тонкорунных пород с целью диагностики клостридиозов: злокачественного отека, инфекционной энтеротоксемии, ботулизма, *Cl.perfringens* типов А,С,Д,Е,Ф;

- *флуоресцирующие* получают гипериммунизацией кроликов, полученную сыворотку осаждают сульфатом аммония, диализируют, полученную глобулиновую фракцию метят флуорохромом и консервируют мертиолятом.

Доноры лошади и валухи проходят несколько циклов гипериммунизации с последующим тотальным забором крови. Кроликов и морских свинок обескровливают после цикла гипериммунизации.

Диагностические сыворотки готовят из цитрированной крови продуцентов после окончания цикла гипериммунизации, используя методы сепарирования, дефибринирования, фильтрации, расфасовки во флаконы, ампулы и консервирования.

Контроль диагностических сывороток включает:

- проверку на стерильность, посевом на питательные среды, сыворотка должна быть стерильной;
- проверку на активность с помощью серологических реакций.

Контрольные вопросы

1. Производство лечебно-профилактических сывороток.
2. Производство диагностических сывороток.

Биотехнология глобулиновых препаратов. Способы консервирования биомассы микроорганизмов, биопрепаратов

Цель занятия. Познакомиться с технологией производства

глобулиновых препаратов, способами консервирования биомассы микроорганизмов, биопрепаратов.

Оборудование и материалы. Образцы глобулиновых препаратов для ветеринарного и медицинского применения, лиофильно высушенные биопрепараты, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать технологию производства глобулиновых препаратов, способы консервирования биомассы микроорганизмов и биопрепаратов.

Биотехнология глобулиновых препаратов

Иммуноглобулины (глобулины) – это 10%-ный раствор глобулиновой фракции гипериммунной сыворотки. Для ветеринарных целей готовят:

- *глобулин нормальный неспецифический* из крови убойного крупного рогатого скота, применяют телятам с признаками антенатальной гипотрофии внутрь или подкожно;

- *глобулин против болезни Ауески*, впервые биотехнология разработана И.И. Лукашевым в 1962 году, производство на Орловской биофабрике.

Если для ветеринарных целей выпускают полиглобулиновые препараты, то для медицинских растворы гамма-глобулиновых фракций.

Существуют несколько производственных методов получения глобулинов из гипериммунной сыворотки крови:

▪ *метод солевого фракционирования (высаливания)* с использованием сульфата аммония. После первого осаждения в осадке остаются глобулины, в результате второго осаждения извлекаются гамма-глобулины;

▪ *спиртовой метод*, разработан в Московском НИИ вакцин и сывороток, осаждение гамма-глобулина происходит в три этапа: первый – осаждение гамма- и бета-глобулинов, второй – отделение бета-глобулинов, третий – осаждение из надосадочной жидкости гамма-глобулинов;

▪ *риваноловый метод* получения глобулина осаждением альбумина и бета-глобулина 0,4%-ным раствором риванола с последующим удалением риванола активированным углем и фильтрацией.

Глобулиновые препараты контролируются по химическим, бактериологическим, иммунологическим показателям, к которым относят:

▪ *процентное содержание белка* рефрактометрическим методом;

▪ *чистота гамма-глобулиновой фракции* определяют электрофорезом;

▪ *стерильность* определяют посевом на ПА и ПБ, посеvy выдерживают 8 суток;

▪ *безвредность*, когда препарат вводят подкожно 3 мл морским свинкам и 0,5 мл белым мышам, срок наблюдения 5 – 7 суток, животные должны оставаться клинически здоровыми;

▪ *специфичность* определяют биопробой на белых мышах, которым подкожно вводят 0,01 мл препарата, а затем заражают вирусом, если опытные мыши живы, препарат является специфичным.

Способы консервирования биомассы микроорганизмов и биопрепаратов

Методы сохранения биологического материала

включают:

- *консервирование при положительных температурах* с использованием химических веществ (хлороформа, фенола, формалина, глицерина) для диагностических сывороток и диагностикумов);

- *консервирование при низких температурах* (замораживание) для биомассы, содержащей вирус, бактерии;

- *консервирование высушиванием.*

Методы высушивания

Широкое применение на практике получили следующие методы сушки:

- *сублимационный (лиофильный)* широко применяют для высушивания микроорганизмов, вирусов, живых противомикробных и противовирусных вакцин;

- *конвективный* – распылительное высушивание применяют для ферментных препаратов, сахаров, кровезаменителей, выполняют в распылительных сушилках;

- *контактное высушивание в вакуум-сушильных шкафах* периодического действия для ферментных препаратов, витаминов;

- *терморadiационное высушивание* с помощью инфракрасных лучей (ИКЛ);

- *токами высокой частоты*, когда энергия электромагнитных волн будет переходить в тепло, под действием температурного градиента влага испаряется.

Метод сублимационной сушки

Широко применяют для консервирования микроорганизмов, живых вакцин, диагностических сывороток, диагностикумов. Впервые применен в 1935 году.

Выполняют в лиофильных сушилках Иней 3-2, установках сублимационной сушки УСС, сублимационной установки УЗВ -10, сублимационной установке УКСЗ.

Процесс сублимационного высушивания осуществ-

ляется в четыре стадии:

- *предварительное замораживание биомассы;*
- *первичное высушивание в вакууме;*
- *вторичное высушивание (досушивание) или вакуумная десорбция;*
- *окончание процесса сушки* и извлечение высушенного материала.

Выживаемость микроорганизмов зависит от защитных сред, применяемых при приготовлении суспензии к высушиванию, в составе которых входят компоненты:

- *высокомолекулярный* (декстран, желатин, пептон, гидролизат казеина или лактоальбумина, обезжиренное молоко);
- *гидрофильный* компонент (сахароза, лактоза, глюкоза, сорбитол);
- *буферный* компонент (трис-буфер, глутамат, калийфосфатный буфер).

В практике лиофилизации микроорганизмов, живых вакцин применяют комбинированные защитные среды, состав которых представлен в таблице 1.

Таблица 15- Комбинированные среды для высушивания

№ п/п	Защитные среды при лиофилизации
1.	Сахароза (10%) и желатин (1,5%)
2.	Сахароза (7,5%) и желатин (5%)
3.	Лактозо - солевая
4.	Сахароза в гидролизате молока
5.	Глюкоза (7,5%) + декстрин (5%) + бульон (25%)
6	Обезжиренное молоко + сахароза (10%)

Консервирование культур клеток

Культуры клеток сохраняют при низких температурах. Оптимальная – -196° , при которой клеточная популяция может сохраняться неограниченно долго. Обязательно применяют криопротектор в концентрации 5 – 10%. Ведущие криопротекторы 7%-ный глицерин и 10%-ный диметилсульфоксид (ДМСО). Разработан криопротектор на основе 0,1%-ной метилцеллюлозы и 10%-ного ДМСО.

Культуры клеток хранят при температуре $-7 - -50^{\circ}$ С в течение трех месяцев.

При температуре 5° С под слоем вазелинового масла можно хранить культуры клеток в течение 30 дней.

Контрольные вопросы

1. Характеристика семейства *Poxviridae*.
2. Возбудитель оспы овец.
3. Возбудитель оспы птиц.
4. Возбудитель миксоматоза кроликов.
5. Возбудитель контагиозного пустулезного дерматита.

ТЕМА №10

Лабораторная диагностика поксвирусных заболеваний, биопрепараты

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства поксвирусов, разобрать лабораторную диагностику заболеваний, биопрепараты.

Оборудование и материалы. Таблицы, электронный ресурс, образцы вакцин, лекарственные средства.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать лабораторную диагностику заболеваний.

Познакомиться с образцами биопрепаратов, лекарственных средств. Зарисовать вирус оспы овец, окрашенный по Морозову.

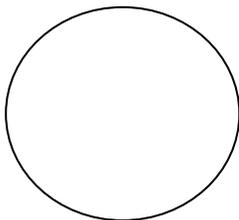


Рис.10. Вирус оспы

*Лабораторная диагностика оспы овец и коз по МУ
№115-6а от 12.11.85г.*

Диагноз ставят по клиническим признакам, результатам вскрытия и лабораторному исследованию, используя материал:

- клинический (срезанные папулы, везикулы, парные сыворотки);
- патологический (легкие, лимфоузлы)

В лаборатории проводят:

- *вирусоскопию* по Морозову мазков-отпечатков из папул, везикул и патологического материала, обнаруживают скопления вируса (тельца Пашена);

- *биопробу* на ягнятах, когда материал, разведенный физраствором 1:20 – 1:200, втирают в верхнюю губу или вводят внутрикожно в подхвостовую складку, у зараженных возникают клинические признаки заболевания;

- *вирусологическое исследование*, когда 10%-ной суспензией материала заражают первичные культуры клеток, вирусы обнаруживают по ЦПД, идентифицируют в РДП;

- *РДП* с сывороткой крови больных, переболевших.

Биопрепараты: живая сухая вакцина из штамма

НИСХИ, плановая вакцинация в местах распространения заболевания, напряженность иммунитета 12 месяцев.

Специфических средств лечения нет.

Лабораторная диагностика оспы птиц по МУ от 1985г.

Диагноз ставят по клиническим признакам, результатам вскрытия и лабораторному исследованию, используя материал:

- клинический (соскобы экзантемы, парные сыворотки);

- патологический (слизистую гортани)

В лаборатории проводят:

- *вирусоскопию* мазков отпечатков клинического и патологического материала по Морозову, обнаруживают скопления вируса (тельца Борреля);

- *вирусологическое исследование*, когда 10%-ной суспензией материала заражают КЭ на ХАО или в аллонтаис., гибель КЭ в течение 6 дней, на ХАО очаги некроза, папулы, при микроскопировании обнаруживают скопления вируса;

- *биопроба* на 3-4 месячных цыплятах, 10%-ную суспензию втирают в скарифицированную кожу, на 5-6 день – экзантема, а при микроскопировании мазков-отпечатков - скопление вирусов;

- *РДП* с сыворотками крови больных, переболевших;

- *ИФА* с сывороткой крови.

Биопрепараты: живая сухая вакцина из куриного штамма ВГНКИ, которую вводят в перепонку крыла.

Для лечения выпаивают виркон-С, бетипан, аскорбиновую кислоту, энрофлон, тилан назначают с кормом.

Для лечения оспы человека применяют метисазон – внутрь.

Лабораторная диагностика контагиозного пусту-

лезного дерматита по ГОСТ 25723-83

Диагноз ставят по клиническим признакам, результатам вскрытия и лабораторному исследованию, используя материал:

- клинический (соскобы пораженной кожи)
- патологический (соскобы пораженной кожи)

В лаборатории проводят:

- *вирусоскопию* мазков-отпечатков, окрашенных по Морозову или по Романовскому – Гимза, обнаруживают вирусы – овалыные тельца;

- *биопробу* на котятах, когда суспензию исследуемого материала 1:5, 1:10 втирают в скарифицированную кожу котят, возникает дерматит и гибель;

- *вирусологическое исследование* на культурах клеток L, обнаруживают ЦПД, идентифицируют вирус в РН.

Биопрепараты: живая сухая вакцина из штамма Л, применяют накожно или внутрикожно. Плановая вакцинация в сухостепной зоне.

Для лечения применяют местно йод-глицерин, винилин, на кожу салициловую мазь, внутримышечно энрофлоксацин, тилозин, аскорбиновую кислоту.

Лабораторная диагностика миксоматоза кроликов по МУ от 08.05.1988г.

Диагноз ставят по клиническим признакам, результатам вскрытия и лабораторному исследованию, используя патологический материал (свежие трупы кроликов, содержимое опухолей, готовят 10% -ную суспензию).

В лаборатории проводят:

- *ИФА* с экстрактом патологического материала.

- *Биопробу* на белых кроликах или КЭ. Кроликам закапывают суспензию на конъюнктиву или вводят внутрикожно, на 3-6 день – заболевание, гибель через 7-16 дней. КЭ заражают на ХАО, гибель через несколько дней, на ХАО папулы или очаги некроза.

● *Гистологическое исследование* патологического материала, готовят гистосрезы, окрашивают и обнаруживают миксомные, злокачественные клетки.

Биопрепараты: ▪ сухая культуральная кцина из штамма СК-82;

▪ сухая культуральная вакцина из штамма В-82, применяют наочно, внутрикожно, внутримышечно;

▪ ассоциированная сухая вакцина против миксоматоза и ГБК, внутримышечно.

Лечение мало эффективно.

Контрольные вопросы

1. Биопрепараты для профилактики поксвирусных заболеваний.

ТЕМА №11

Лабораторная диагностика бешенства, биопрепараты

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства вируса бешенства, разобрать лабораторную диагностику заболевания, биопрепараты.

Оборудование и материалы. Труп мыши, вскрывочная доска, инструменты для вскрытия, краски по Соллерсу, компоненты для РДП, мазки мозга погибших животных, микроскоп. Таблицы, электронный ресурс, образцы вакцин.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать лабораторную диагностику заболеваний. Вскрыть погибшую мышь, взять материал для исследования, покрасить мазки по Соллерсу, поставить РДП. Познакомиться с образцами вакцин. Зарисовать результаты микроскопии.

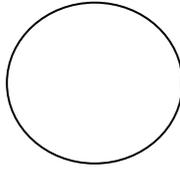


Рис. 11 Тельца Бабеша-Негри в мозге лисы

Биологические свойства возбудителя бешенства

Возбудитель бешенства принадлежит к семейству Rhabdoviridae, в составе которого три рода:

- Lyssavirus (lyssa греч. бешенство, rhabia исп. бешенство);

- Везикуловирусы;
- Ephemerovirus.

Всего в составе семейства 60 видов. К роду Lyssavirus относят возбудитель бешенства, а также вирусы поражающие центральную нервную систему животных и человека:

- Лагос-Бат поражает летучих мышей;
- Мокола – человека и землероек;
- Дювенэйд – человека, летучих мышей;
- вирус острого энцефаломиелита человека;
- бешествоподобный вирус у грызунов;
- Котокан – циркулирует у крупного рогатого скота и комаров;
- Ободьян – у комаров;
- Флондрас – у грызунов.

Бешенство – острое инфекционное заболевание с поражением цнс. Болеют дикие плотоядные, грызуны, они поддерживают возбудителя в природе. Восприимчивы домашние плотоядные, человек, крс, мрс, лошади, свиньи.

На севере вирус циркулирует у песцов, в центральных районах – у лис, енотов, волков, грызунов, в Южной Америке у летучих мышей, в Африке у мангуств.

Источник заражения большие, способ заражения через укус или ослюнявливание

Бешенство безусловно смертельное заболевание, т.е. все заболевшие умирают. Вначале у больных появляются признаки энцефалита, протекает с повышением внутричерепного давления и косоглазием, появляются признаки нарушения психики: водобоязнь, агрессия, затем паралич глотки и слюнотечение, жажда, потом развивается миелит с парезом и параличом конечностей и гибель от паралича дыхательного центра.

Морфология и структура вируса. Относят к семейству Rhabdoviridae роду Lyssavirus. Сложноустроенный суперкапсид пулевидной формы с шипиками, капсид спиральной симметрии, геном одна нить РНК.

Культивирование:

- в КЭ при заражении в желточный мешок – гибель;
- КФ – гибель;
- первичных культурах клеток почек собак, хомякам - гибель;
- ВНК-21 (производственная культура) – гибель.

Биологические свойства. Накапливается в нервной ткани, вызывает энцефаломиелит и слюне. Агглютинирует эритроциты собак.

Антигенные свойства. Все выделенные штаммы в мире одинаковые, отличаются вирулентностью.

Устойчивость. Низкие температуры, фенол, эфир консервируют вирус. Гибнет мгновенно при + 70⁰ С, чувствителен к 1-5%-ному формальдегиду, 3-5%-ной соляной кислоте, 1%-ному перманганату калия, 10%-ной настойке йода.

Лабораторная диагностика бешенства по ГОСТ

26675-2013

Обязательно лабораторное исследование, материал только патологический:

- труп мелких животных, обработать от блох;
- голова крупных животных с 2-мя шейными позвонками.

Материал упаковывают в целлофановые мешки, помещают в ящик, на дно которого кладут влагопоглощающий материал с дезинфектантом (формалин).

В лаборатории черен вскрывают и готовят:

- из аммонова рога, мозжечка, коры полушарий, продолговатого мозга по 2 мазка для РИФ и по 2 мазка для окрашивания по Муромцеву или Соллерсу, Туревичу, Сану, Ленцу. У мелких животных готовят мазки из всего мозга;

- готовят пастообразную суспензию из разных отделов головного мозга.

В лаборатории проводят:

- *РИФ* с мазками из мозга, для РИФ выпускают флуоресцирующую антирабическую сыворотку, скопления вируса ярко блестят.

- *Микроскопию мазков*, окрашенных по Муромцеву, когда мазки фиксируют в смеси Никитфорова 1-2 часа, подогревают 50-60⁰ С -15-20 мин, ополаскивают, погружают в раствор метиленового синего 1:40 на 5-10 мин, затем в 5-10%-ный танин до голубого цвета, промывают, погружают в смесь спирта и ацетона. Скопления вируса – тельца Бабеша-Негри сиреневого цвета, ядра нейронов сини.

- *РДП* на предметных стеклах. В центральную лунку вносят пастообразную массу мозга погибшего животного, а в периферические – антирабическую сыворотку, в положительных случаях образуются серые полосы.

- *Биопробу* на мышцах. 10%-ной суспензией мозга

с добавлением антибиотиков заражают 6 мышат итрацебрально по 0,03 мл, 6 мышат подкожно в верхнюю губу по 0,1 -0,2 мл. Срок наблюдения 30 дней. На 7-10 день парезы, параличи, гибель. У погибших извлекают мозг, готовят мазки для РИФ и окрашивают по муромцеву, обнаруживают скопления вируса.

- *ИФА* с суспензией мозга.

- *ПЦР* с суспензией мозга.

Биопрепараты: ▪ антирабическая живая жидкая вакцина АЗВИ для всех видов животных в неблагополучных местах;

- антирабическая инактивированная сухая культуральная вакцина из штамма «Щелково-51», для плотоядных вакцину разводят стерильной дистиллированной водой, сельскохозяйственных – РК АВ.

- антирабическая инактивированная вакцина сухая культуральная из штамма «Щелково-51» для собак и кошек «Рабикан»;

- антирабическая оральная вакцина из штамма «Рабивак/0333 для вакцинации диких плотоядных

- инактивированная вакцина «Рабикс» на основе штамма ERA-CВ 20М против бешенства собак, утверждена Россельхознадзором 31.10.2011г;

- инактивированная вакцина «Рабифел» на основе штамма ERA-CВ 20М против бешенства кошек, утверждена Россельхознадзором 31.10.2011г.

Если был контакт домашнего животного с диким вакцину применяют подкожно по 2 мл собакам и по 5 мл крупным животным 3 дня подряд, через 16 дней повторяют одну инъекцию. Лучше применять антирабическую вакцину АЗВИ или инактивированные. Покусы у животных обрабатывают настойкой йода, рваные раны перед наложением швов промывают 1%-ным перманганатом калия.

Контрольные вопросы

1. Характеристика вируса бешенства.
2. Вирус болезни Ауески.
3. Вирус ИРТ.
4. Вирус ринопневмонии лошадей
5. Вирус ЗКЛ.
- 6.. Вирус болезни Марека.
7. Вирус ИЛТ.

ТЕМА №12

Лабораторная диагностика герпесвирусных заболеваний

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства герпесвирусов, разобрать лабораторную диагностику герпесвирусных заболеваний, биопрепараты.

Оборудование и материалы. Диагностикумы для РЗГА, РНГА, сыворотки крови лошадей, свиней, образцы вакцин, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать лабораторную диагностику заболеваний млекопитающих. Поставить РЗГА с сывороткой крови лошадей, РНГА с сывороткой крови свиней. Познакомиться с образцами вакцин. Зарисовать результаты реакций

Рис 12. Результат РЗГА

Рис. 13. Результат РНГА

Лабораторная диагностика ринопневмонии лошадей по МУ от 28.07.80г.

Проводят обязательно при массовой пневмонии жеребят, мертворожденных у кобыл. Материал:

▪ мертворожденный, берут кусочки легких, селезенки, тимус, печени, готовят 10%-ную суспензию, с экстрактом ставят РГА с эритроцитами петуха или морской свинки, если результат положительный проводят вирусологическое исследование);

▪ сыворотка крови, носовая слизь кобыл.

Лаборатории проводят:

● *Вирусологическое исследование.* Заражают культуры клеток (МЛ, РК-15), вирус обнаруживают по ЦПД: лизис, бляшки. Ставят капельную РГА с культуральной жидкостью, вирус идентифицируют в РЗГА.

● *Серологическое исследование* с сывороткой крови. Ставят РЗГА. Серологическое исследование кобыл на носительство вируса ринопневмонии плановое, а также подлежат исследованию лошади при покупке и транспортировке с территории РФ.

● *ПЦР* с сывороткой крови.

● *РИФ* с носовой слизью.

Биопрепараты: живая сухая вакцина из штамма СВ/69, разработчик вакцины профессор К.П. Крюков.

Лечение. Применяют АБП, иммуномодуляторы.

Лабораторная диагностика болезни Ауески по ГОСТ 25753-83

Для установления диагноза проводят лабораторное исследование. Материал:

▪ патологический (головной мозг, кусочки селезенки, печени, лимфоузлы);

▪ клинический (сыворотка крови больных, переболевших).

В лаборатории проводят:

● Биопробу, когда 10%-ной суспензией головного мозга, органов заражают кролика или котенка подкожно, внутримышечно. Гибель от энцефалита, зуд в месте заражения.

● Вирусологическое исследование, суспензией патологического материала заражают культуру клеток (РК-15, ВНК-21), на 4-5 день ЦПД 6 округлые клетки, симпласты, синтиции. Идентифицируют вирус в РН на культурах клеток.

● РНГА с сывороткой крови больных, подозреваемых. Положительный титр 1:32 и выше.

● ИФА с сывороткой крови обследуемых.

Биопрепараты: ▪ живая вакцина из штамма ВГНКИ, применяют для плановой профилактики у поросят;

▪ вирус-вакцина из штамма БУК-628, применяют для профилактики заболевания у поросят;

▪ инактивированная культуральная вакцина для пушных зверей, овец, свиней, применяют в неблагополучных местах;

▪ глобулин против болезни Ауески – полиглобулиновая фракция гипериммунной сыворотки. Применяют для лечения двукратно, понижает титр вируса в организме. Препарат применяют и для профилактики в условиях высокого риска заражения.

Лечение. Кроме специфического средства – глобулина, назначают симптоматическое лечение: диуретики, иммуномодуляторы (аскорбиновую кислоту, гентамицин), обезболивающие средства (анальгин, димедрол). Если вылечить или не допустить *Лабораторная диагностика инфекционного ринотрахеита*

Чтобы точно определить заболевание необходимо

лабораторное исследование. Материал:

- клинический (сыворотка крови больных, носовые выделения);

- патологический (кусочки внутренних органов, трахея, легкие), готовят 10%-ную суспензию.

В лаборатории проводят:

- *Вирусологическое исследование*: заражают МДВК, обнаруживают через 48-96 часов ЦПД (включения в ядрах клеток).

- *РЗГА* с сывороткой крови и *РЗГА* с носовой слизью.

- *ИФА* с сывороткой крови.

- *РНГА* с сывороткой крови и эритроцитарным антигеном.

Биопрепараты: ▪ вирус-вакцина сухая против ИРТ крс из штамма ТК-А;

- вакцина инактивированная против ИРТ;

- ассоциированная вакцина против ИРТ и ПГ-3 живая сухая;

- вакцина «Комбовак» - инактивированная ассоциированная против ИРТ, ПГ-3, вирусной диареи, Рс-инфекции крс и пастереллеза телят (вакцинируют коров-матерей);

- сыворотка против сальмонеллеза, пастереллеза, ИРТ, ПГ-3.

Лечение. Животных лечат, применяя АБП, аскорбиновую кислоту, гипериммунную сыворотку. Основная тактика лечения – не допустить развитие пневмонии.

Лабораторная диагностика злокачественной катаральной лихорадки по МУ от 12.11.1985г.

Заболевание регистрируют у северных оленей и у крс в Африке.

Материал для исследований

- клинический – сыворотка крови больных, сгусток крови;

- патологический (кусочки селезенки, печени, лимфоузлы, готовят 10%-ную суспензию)

В лаборатории проводят:

- *Биопробу* на морской свинке, котенке, кролике. Заболевание возникает через 3 недели и заканчивается гибелью животного.

- *Вирусологическое исследование*, когда экстрактом сгустка крови, суспензией патологического материала заражают первичные культуры клеток, на 5-9 день ЦПД, включения – «тельца Коудри», синтиции, вирус идентифицируют в РСК, определяя серотип возбудителя.

- *РСК* с сывороткой крови обследуемых, положительный титр 1:8.

Биопрепараты. Отечественных вакцин нет, производят в ЮАР.

Лечение. Применяют АБП, иммуномодуляторы.

Лабораторная диагностика болезни Марека по ГОСТ 25586-83

Диагноз ставят по результатам вскрытия:

- у молодняка воспаление бедренного, седалищного нерва, энцефалит;

- у взрослых кур опухоли во внутренних органах: яичниках, яйцепроводах, печени, легких, гиперплазия перьевых фолликул.

Лабораторное исследование проводят, чтобы дифференцировать болезнь Марека от лейкоза. Материал:

- внутренние органы, пораженные опухолями, готовят 10%-ную суспензию;

- сыворотка или плазма крови убойных кур.

В лаборатории проводят:

- *Биопробу* на суточных цыплятах, заражают внутримышечно, через 4-6 недель признаки заболевания: невриты, опухоли во внутренних органах.

- *Биопробу* на КЭ. Заражают 11-12-дневные эмбри-

оны на ХАО или 5-6-дневные КЭ в желточный мешок. КЭ погибают, обнаруживают на ХАО пузырьки, папулы, у зародыша увеличение селезенки, опухоли в печени.

- *РИФ мазков-отпечатков* из пораженных перьевых фолликул.

- *РДП* с сывороткой убойных кур.

Биопрепараты : ▪ вирус-вакцина «Риспенс» из полевого штамма СВ/1988 (производство Голландия), применяют внутримышечно;

- сухая вирус-вакцина из штамма ФС-126 на основе вируса герпеса индеек;

- жидкая культуральная вакцина из вируса герпеса кур штамм №42, №50;

- живая вакцина из штамма CVI -988 Avi Nova (производство Израиль), применяют внутримышечно или подкожно;

- жидкая и сухая вакцины на основе ослабленного вируса БМ и герпеса кур АВИВАК (производство ВНИВИП СПб).

Лечение бесперспективно, выбраковка. Плановая вакцинация в суточном возрасте у цыплят яичных кроссов.

Лабораторная диагностика инфекционного ларинготрахеита птиц (ИЛТ) по Временному наставлению по лабораторной диагностике 1994г

Лабораторное исследование необходимо для постановки диагноза. Материал:

- патологический: слизистая кортани, трахеи, фибриновые пробки, готовят 10%-ную суспензию;

- клинический: плазма или сыворотка крови больных кур.

В лаборатории проводят:

- *Вирусологическое исследование*, заражают КЭ на ХАО, на 6-8 день охлаждают, вскрывают, обнаруживают узелки на ХАО. Из узелков готовят гистосрезы, окраши-

вают, обнаруживают включения на половину или 2/3 ядра клетки.

- *Биопроба на цыплятах* 30-90-дневного возраста суспензию втирают в клоаку, возникает заболевание.

- *ИФА, РДП, РН на КЭ* с экстрактом суспензии патологического материала.

- *РДП, РЗГА* с плазмой или сывороткой крови больных, в качестве антигена применяют отечественную вакцину из штамма НТ.

Биопрепараты применяют для плановой вакцинации:

- сухая вирус-вакцина клон НТ (аэрозольно, втирают в клоаку);

- живая вакцина против ИЛТ Avi Nova (закапывают в глаз;

- живая сухая вакцина АВИВАК ИЛТ (закапывают в глаз, аэрозольно, клоачно).

Лечение. Применяют АБП (энрофлон, тилан), аскорбиновую кислоту.

Контрольные вопросы

1. Характеристика семейства парамиксовирусов.
2. Вирус ПГ-3
3. Вирус РС-инфекции крс.
4. Вирус чумы плотоядных.

ТЕМА №13

Лабораторная диагностика парамиксовирусных заболеваний. Вирус болезни Ньюкасла

Цель занятия. Изучить основные биологические свой-

ства парамиксовирусов, разобрать лабораторную диагностику парамиксвирусных заболеваний, биопрепараты. Изучить биологические свойства, лабораторную диагностику НБ, биопрепараты.

Оборудование и материалы. Трупы птиц, инструменты для вскрытия и заражения КЭ, эритроциты петуха, плазмы крови кур, образцы вакцин, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать лабораторную диагностику поксвирусных заболеваний млекопитающих. Вскрыть погибших кур, взять материал для вирусологического исследования, заразить КЭ, поставить РЗГА с плазмой кур. Познакомиться с образцами вакцин. Зарисовать результаты реакций.

Рис. 14

*Лабораторная диагностика паратифа – 3 (ПГ-3)
по Временному МУ 17.10.1985г.*

Материал для исследований:

- патологический: трахея, лезкие, лимфоузлы, готовят мазки-отпечатки, 10%-ную суспензию;
- клинический: сыворотка крови.

В лаборатории проводят:

- РИФ с мазками отпечатками, скопления вируса ярко блестят.

- Вирусологическое исследование, которое включает заражением экстрактом патологического материала МДВК, ВНК-21, вирус обнаруживают по ЦПД (синти-

ции, вакуоли), идентифицируют в РЗГА или в реакции гемадсорбции, когда к зараженным культурам клеток добавляют эритроциты коровы, обнаруживают адсорбцию эритроцитов на инфицированных клетках.

- ПЦР с экстрактом патологического материала.

- РЗГА с сыворотками крови обследуемых, используют диагностикум и эритроциты морской свинки, диагностический титр 1:16 и больше.

- РНГА с сывороткой крови.

- ИФА с сывороткой крови.

Биопрепараты: ▫ вакцина «Паравак», применяют интраназально;

- вакцина «Бивак» против ПГ-3 и ИРТ;

- ассоциированная вакцина против ПГ-3 и ИРТ, в настоящее время ведущая;

- вакцина «Комбовак» против ПГ-3, ИРТ, вирусной диареи, РС-инфекции, рота-, коронавирусной диареи телят, вакцинируют коров-матерей перед отелом;

- гипериммунная сыворотка против пастереллеза, сальмонеллеза, ПГ-3, ИРТ.

Лечение. Применяют АБП, иммуномодуляторы.

Лабораторная диагностика РС –инфекции (респираторно-синтициальной инфекции)

Лабораторное исследование проводят обязательно при тяжелой массовой пневмонии у телят. Материал:

- патологический: трахея, лезкие, лимфоузлы, готовят мазки-отпечатки, 10%-ную суспензию;

- клинический: парные сыворотка крови.

В лаборатории проводят:

- РИФ с мазками отпечатками, скопления вируса ярко блестят.

- Вирусологическое исследование, которое включает заражением экстрактом патологического материала-

Таурус-1, вирус обнаруживают по ЦПД (зернистые, сморщенные клетки, включения, синтиции), идентифицируют в РДП, РСК.

- РДП с экстрактом патологического материала.

- РДП, РНГА с сыворотками крови обследуемых, диагностический титр в РНГА 1:32 и больше.

Биопрепараты. Применяют вакцину «Комбовак» против ПГ-3, ИРТ, вирусной диареи, РС-инфекции, рота-, коронавирусной диареи телят, вакцинируют коров-матерей перед отелом.

Лечение. Применяют АБП, иммуномодуляторы.

Лабораторная диагностика чумы плотоядных (чумы собак, (болезни Каре)

Лабораторное исследование проводят. Чтобы дифференцировать заболевание от бешенства. Материал:

- патологический: головной мозг, готовят 10%-ную суспензию;

- клинический: сыворотка крови.

С экстрактом суспензии мозга проводят:

- ПЦР.

- ИФА.

- РНГА с антительным диагностикумом.

- ИФА, РНГА с сывороткой крови.

- Вирусологическое исследование затруднено, заражают первичные культуры клеток почек, легких щенков, или МДВС, Vero, обнаруживают по ППД (синтиции), идентифицируют в ПЦР, ИФА, РНГА.

Биопрепараты. В РФ предложены три вакцинных штамма вируса чумы плотоядных: 668-КФ; «Вакчум», ЭПМ. Для плановой профилактики применяют ассоциированные вакцины:

- «Мультикан» -1,-2, -4, -6, -7, -8;

- «Депентовак»;

- Гексаконивак против ЧП, вирусного гепатита, парвовирусного энтерита, коронавирусного энтерита, бешенства и лептоспироза;

Перечисленные вакцины на основе штамма ЭПМ.

Для профилактики и лечения используют гипериммунную сыворотку «Гискан-5».

Лечение. Длительная вирусемия приводит к поражению спинного и головного мозга, энцефалит – смертельный. Для лечения применяют:

- гипериммунную сыворотку «Гискан-5»;
- противовирусный препарат – фоспренил;
- иммуномодуляторы – аскорбиновую кислоту, в повышенных дозах;
- антибиотики- гентамицин или ЦС-группу;
- диуретики –полярную смесь с K^+ , Mg^{++} и глюкозой в вену, подколоть лазикс.

Вирус болезни Ньюкасла (НБ)

Высококонтрагиозное остропротекающее заболевание птиц отряда куриных с поражением органов дыхания (ларенготрахеит), пищеварения (гастроэнтероколит), нервной системы(энцефалит, отек мозга). У молодняка гибель 100%, у взрослых- 25%, переболевшие носители возбудителя пожизненно.

Впервые описано на острове Ява и в Великобритании в окрестностях Ньюкасла в 1926 году. Кранвельд в 1927 году доказал вирусную природу заболевания.

Очень восприимчив молодняк кур, индеек, фазанов, цесарок. Источник: больные, переболевшие. Способ заражения алиментарный, аэрогенный, трансмиссивный, после нападения клещей.

Морфологические свойства. Вирус семейства Paramyxoviridae, подсемейства Paramyxovirinae, род Rubulovirus. Суперквпсид овальной формы с шипиками, d 120-300нм. В составе суперкапсида Н (гемагглютинин) и N

(нейрамидаза), капсид спиральной симметрии, геном – нить РНК, окруженная белком.

Культивирование:

- КЭ при любом способе заражения, гибель после 24 часов, в течении 8 суток;

- КФ в течение 48 часов образует ЦПД: округлые клетки, бляшки;

- в перевиваемых культурах клеток (СПЭВ, и др), образует ЦПД;

- в организме 30-дневных цыплят, гибель в течение 4-6 дней.

Биологические свойства. Вирус размножается в эпителиальных клетках органов дыхания, пищеварения, циркулирует в крови, накапливается в паренхиматозных органах, цнс. В местах скопления вызывает воспаление. Агглютинирует эритроциты птиц, человека, морской свинки, мышей.

Известно три типа штаммов возбудителя по вирулентности: вирулентные – велогенные, мезогенные – только для молодняка, лентогенные вызывают легкое перереболевание у цыплят. Больные очень заразные, выделяют вирус с пометом, выдыхаемым воздухом, истечениями из клюва.

Антигенные свойства. Все штаммы в мире одинаковые. Вирус содержит два антигена V и A.

Устойчивость. При -20°C сохраняется 2 года, при $+20^{\circ}\text{C}$ – 6 часов, $+56^{\circ}\text{C}$ 1 час. Дезинфектанты: 1-2% формалин, щелочи, 3-4% фенол уничтожают вирус за несколько минут.

Лабораторная диагностика по ГОСТ 25586-83

Материал:

- патологический, трупы вскрывают, берут 2-3 г

трахеи, легких, селезенки, костного, головного мозга, измельчают в 2-3 мл физраствора, добавляют антибиотик (гентамицин), центрифугируют, надосадочную жидкость используют;

- сыворотка (плазма) крови больных, вакцинированных.

В лаборатории проводят:

- *Вирусологическое исследование*: заражают 9-11-дневных КЭ в аллантаис, погибших вскрывают, ставят РГА с эритроцитами петуха, идентифицируют в РЗГА.

- *РН* с экстрактом патологического материала на КЭ с разными разведениями вируса, определяют индекс нейтрализации, 10 и больше.

- *Биопроба* на 30-дневных цыплятах, когда их заражают экстрактом патологического материала внутримышечно, гибель через 4-6 дней.

- *РЗГА* с сывороткой крови больных, вакцинированных, диагностический титр 1:16 и больше.

Биопрепараты. Плановая вакцинация повсеместно, применяют вакцины:

- вирусвакцина В₁ применяют суточным цыплятам в неблагополучных местах аэрозольно;

- вирусвакцина из штамма Ла Сота применяют с 10-14 дней выпаиванием, эту вакцину используют повсеместно;

- вирусвакцина из штамма Н для взрослых кур внутримышечно;

- вирусвакцина из штамма «Бор-74» выпаиванием взрослой птице и молодняку;

- жидкая инактивированная вакцина, ее используют внутримышечно в индосекторе при вспышке заболевания;

- ассоциированная вакцина против НБ, ИБК, ССЯ для кур внутримышечно.

За напряженностью иммунитета следят, после вакцинации, спустя 10-14 дней берут кровь, определяют титры антител в РЗГА , 1:8 и больше. Если титры антител не обнаружены, вакцинацию повторяют.

Средств лечения нет, убой, сжигание или на консервы в условиях птицеводства.

Контрольные вопросы

Коллоквиум №2 по разделу биотехнология, покс-, герпес, ПМВ-вирусы, возбудитель бешенства

1. Биотехнология производства вирусной биомассы.
2. Типы противовирусных вакцин.
3. Технология производства лечебно-профилактических сывороток.
4. Технология производства диагностических сывороток.
5. Биотехнология глобулиновых препаратов.
6. Способы консервирования биомассы микроорганизмов, биопрепаратов, культур клеток.
7. Характеристика семейства поксвирусов.
8. Возбудитель оспы овец.
9. Возбудитель оспы птиц.
10. Возбудитель миксоматоза кроликов.
11. Возбудитель контагиозного пустулезного дерматита.
12. Характеристика семейства герпесвирусов
13. Вирус болезни Ауески.
14. Вирус ИРТ.
15. Вирус ринопневмонии лошадей.
16. Вирус ЗКЛ.
17. Вирус болезни Марека.
18. Вирус ИЛТ.
19. характеристика семейства парамиксовирусов.

20. Вирус ПГ-3.
21. Вирус РС-инфекции.
22. Вирус ЧП.
23. Вирус НБ.
24. Возбудитель аденовирусной инфекции крс.
25. Возбудитель аденовирусной инфекции собак.
26. Вирус ССЯ.

ТЕМА №14

Лабораторная диагностика гриппа животных, биопрепараты

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства вирусов гриппа животных, разобрать лабораторную диагностику гриппа, биопрепараты. Коллоквиум по разделу «биотехнология», возбудители покс-, герпес, ПМВ, адено-вирусные заболевания.

Оборудование и материалы. Сыворотки крови кур, эритроциты кур, вирусный антиген, плексигласовые пластины, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать лабораторную диагностику гриппа млекопитающих и птиц. Поставить РЗГА с плазмой (сывороткой кур) кур. Познакомиться с образцами вакцин. Зарисовать результаты реакций

Рис 15

*Лабораторная диагностика гриппа кур
по ГОСТ 25581-91*

Проводят обязательно, материал:

- патологический: трахея, селезенка, легкие, головной и костный мозг, готовят 10%-ную суспензию;
- клинический сыворотка (плазма) больных кур.

В лаборатории проводят:

- *Вирусологическое исследование.* Заражают КЭ в аллантоис, амнион, гибель в течение 24-48 часов, обнаруживают вирус в каплевой РГА, идентифицируют до субтипа с помощью РЗГА.

- *РЗГА.* Ищут Ig аспространенным субтипам, в первую очередь исключают А-Н₅ N₁, А-Н₅ N₂, А-Н₇ N₇.

- *ИФА* для выявления специфических Ig у обследованных.

Биопрепараты: эмульгированная инактивированная вакцина против А-Н₅ N₁.

Лабораторная диагностика гриппа уток по ГОСТ 25581-91

Материал для исследований:

- патологический: трахея, легкие, селезенка, головной и костный мозг;
- клинический: сыворотка (плазма) крови больных.

В лаборатории проводят:

- *Вирусологическое исследование.* Заражают УЭ на ХАО, аллантоис – гибель через 48-72 часа, обнаруживают в каплевой РГА, идентифицируют до субтипа в РЗГА.

- *Биопроба* на утятах 10-дневных, гибель в течение 5 дней, на вскрытии кровоизлияния, отек легких, мозга.

- *РЗГА и РДП* с сывороткой крови.

Биопрепараты: пропиолактоновая гидроокисьюалюминиевая вакцина, вакцинируют уток перед яйцекладкой

Лабораторная диагностика гриппа лошадей по ГОСТ 25581-91

Материал для исследований:

- клинический : сыворотка крови больных, носовая слизь;
- патологический: легкие, трахея, готовят 10%-ную суспензию.

В лаборатории проводят:

- *Вирусологическое исследование*, заражают МДСК или белых мышей, или КЭ в аллантоис, гибель биологических моделей через 2-3 дня. Обнаруживают вирус в РГА, идентифицируют до субтипа в РЗГА.

- *РЗГА* с сывороткой крови, эритроцитами петуха, антигеном разных субтипов диагностический титр 1:16.

- *РГА* с носовой слизью, при положительном результате ставят *РЗГА* с сыворотками разных субтипов.

Биопрепараты: инактивированная вакцина против субтипов Н₇ N₇ , Н₃ N₈ , вакцинируют жеребых кобыл, чтобы был колостральный иммунитет у молодняка. В 3 месяца вакцинируют жеребят.

Лечение. Для птицы применяют АБП внутрь. При вирусемии лошадей внутривенно тамифлю, внутримышечно АБП, если температура тела выше 40⁰ АБП вводят внутривенно 2 раза в сутки, а также внутривенно раствор Рингера, 5%-ной глюкозы, диуретики, чтобы снять интоксикацию. Миозит лечат местно, используя разогревающие мази.

Контрольные вопросы

1. Характеристика семейства флавивирусов.
2. Возбудитель классической чумы свиней.
3. Характеристика асфарвирусов.
4. Возбудитель африканской чумы свиней.

ТЕМА №15

Лабораторная диагностика классической и африканской чумы свиней

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства вирусов классической и африканской чумы свиней, разобрать лабораторную диагностику заболеваний, биопрепараты. Поставить РНГА с целью выявления вируса классической чумы свиней с экстрактом патологического материала.

Оборудование и материалы. Экстракт патологического материала от свиней, эритроцитарный антиген, плексигласовые пластины, пипетки-автоматы, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать лабораторную диагностику заболеваний. Поставить РНГА с экстрактом патологического материала свиней. Познакомиться с образцами вакцин. Зарисовать результаты реакций.

Рис 16

Лабораторная диагностика классической чумы свиней по МУ от 30.12. 1996г.

Проводят обязательно, несмотря на то, что диагноз можно поставить по результатам вскрытия, чтобы отличить заболевание от африканской чумы. Материал:

- патологический: лимфоузлы, селезенка, легкие, почка, сгустки крови, готовят 20%-ную суспензию, двукратно замораживают и оттаивают;
- клинический –сыворотка крови.

В лаборатории проводят:

- *РИФ* гистосрезом гистосрезом патологического материала и мазков-отпечатков, обнаруживают специфическое свечение скоплений вируса.

- *РНГА с антительным диагностикумом* и экстрактом патологического материала в титре 1:32 и больше.

- *Вирусологическое исследование*, когда заражают РК-15, ЦПД нет, обнаруживают вирус после 96 часового культивирования с помощью РИФ.

- *Биопроба* на подсвинках, после заражения возникает заболевание, затем гибель.

- *ИФА с сывороткой крови* – ведущее исследование, чтобы исключить проникновение переболевших-носителей в стадо.

Биопрепараты: ▫ вакцина из штамма К живая сухая, в основе авирулентный штамм К, выделенный в Китае. Вакцина лапинизированная, представляет собой высушенные ткани новорожденных крольчат, содержащие вирус К;

- живая вирус-вакцина ЛК (разработана ВНИИВВиМ) – биомасса авирулентного штамма вируса, полученная культивированием на РК-15.

Обе вакцины дают 100%-ный профилактический эффект, соответствуют мировому уровню.

Лабораторная диагностика африканской чумы

Материал:

- патологический: сгустки крови, селезенка, легкие, лимфоузлы, почка, готовят 20%-ную суспензию;

- клинический – сыворотка крови.

В лаборатории проводят:

- *ИФА с экстрактом патологического материала* – ведущее исследование;

- *Вирусологическое исследование*, экстрактом патологического материала заражают культуру клеток сви-

ных моноцитов и макрофагов, через 48-72 часа ЦПД, образуются многоядерные гигантские клетки, которые адсорбируют свинье (реакция гемадсорбции), вирус можно идентифицировать вы РДП.

- ПЦР с экстрактом патологического материала.
- ИФА с сывороткой крови.

Биопрепаратов нет, лечение не разработано, в очагах немедленное умертвление свиней, сжигание туш.

Контрольные вопросы

1. Характеристика семейства коронавирусов.
2. Возбудитель коронавирусной диареи телят.
3. Вирус ТГЭС.
4. Вирус ИБК.

ТЕМА №16

Лабораторная диагностика коронавирусных заболеваний, биопрепараты

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства коронавирусов, разобрать лабораторную диагностику заболеваний, биопрепараты. Поставить ИФА с целью выявления вируса ТГЭС в экстракте фекалий поросят.

Оборудование и материалы. Экстракты фекалий поросят, диагностикум ИФА ТГЭС, пипетки автоматы, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Разобрать лабораторную диагностику заболеваний. Поставить ИФА с экстрактом фекалий поросят. Познакомиться с образцами вакцин.

Лабораторная диагностика ТГЭС по ГОСТ 25580-83
Материал:

- клинический :экстракты фекалий поросят, сыворотка крови свиноматок;

▪ патологический: легкие, печень, селезенка в первые дни заболевания, готовят 10%-ную суспензию.

В лаборатории проводят:

● *ИФА с экстрактом фекалий* – ведущее исследование.

● *РНГА с сыворотками крови* свиноматок и эритроцитарным диагностикумом ТГЭС, положительный титр 1:32 и больше. Исследование плановое, подлежат 5% поголовья свиноматок в племенных хозяйствах.

● *Вирусологическое исследование*, заражают ППК-66б, через 2-7 пассажей ЦПД, идентифицируют в РН на культурах клеток.

Биопрепараты: ▪ вакцина «Римс» живая сухая (ВГНКИ), применяют внутрь свиноматкам перед осеменением и перед опоросом;

▪ сухая живая вакцина ВИЭВ, применяют интраназально перед осеменением;

▪ инактивированная, эмульгированная вакцина ВИЭВ, применяют внутримышечно накануне опороса.

Лучшая в мире вакцина «Gastrotefa» производитель Рон-Мерье, есть оральная форма и для внутримышечного введения.

Для лечения применяют АБП внутрь, полиионные растворы.

Лабораторная диагностика коронавирусной инфекции (диареи) телят по Временному наставлению по лабораторной диагностике от 19.02.1988г.

Материал:

▪ клинический: фекалий больных телят, готовят экстракт;

▪ патологический: кусочки легких, готовят 10%-ную суспензию.

В лаборатории проводят:

● *ИФА с экстрактом фекалий.*

● *Вирусологическое исследование* с 10%-ным экстрактом легких, заражают первичные культуры клеток телят, обнаруживают по ЦПД (округлые клетки и синтиции), идентифицируют в РГА с эритроцитами крысы.

Биопрепараты: ■ инактивированная гидроксисьюльфатная вакцина против коронавирусного энтерита крс;

■ вакцина «Комбовак» против ИРТ, ПГ-3, Рс-инфекции, корона-, ротавирусной инфекции крс.

Лечение мало эффективно, применяют АБП, пробиотики, полиионные растворы.

Лабораторная диагностика ИБК (инфекционного бронхита кур) по МУ от 1988г.

Материал:

■ патологический: от погибших цыплят берут трахею, легкие, почки, на санбойне у кур – яйцепроводы, Кэ с признаками карликовости и мумификации, готовят 10%-ную суспензию;

■ клинический: сыворотка крови, желтки деформированных яиц, готовят экстракт.

В лаборатории проводят:

● *Вирусологическое исследование*, когда экстрактом суспензии заражают КЭ, после 3-6 пассажа 100%-ная гибель, на вскрытии погибших КЭ карликовость, мумификация, прилипание лапок к голове, ураты.

● *Биопроба* на 10-25-дневных цыплятах, заражают интратрахеально, через 5-18 дней гибель с поражением органов дыхания или поцек (нефросто-нефрит).

● *РН на КЭ*, чтобы определить серотип возбудителя, необходимо иметь эталонные сыворотки.

● *ИФА с сывороткой крови.*

● *РДП с экстрактом желтков* и эталонными сыворотками против разных серотипов.

Биопрепараты: ■ живая вирус-вакцина из штамма

АМ, выпаивают⁴

▪ живая вирус-вакцина из штамма Н-120, применяют интраназально или спрей методом;

▪ ассоциированная, инактивированная вакцина против ИБК, НББ, Ибб и ССЯ-76 для взрослой птице, применяют внутримышечно.

Лечение: АБП: тилан, энрофлон, дорин.

Контрольные вопросы

1. Характеристика семейства ретровирусов.
2. Возбудитель лейкоза крс.
3. Возбудитель инан.

ТЕМА №17

Лабораторная диагностика лейкоза крс, инфекционной анемии (инан) лошадей

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства вирусов лейкоза крс и инана лошадей, разобрать лабораторную диагностику заболеваний, биопрепараты. Поставить РИДс целью выявления лейкозных антител в сыворотке крови обследуемых, освоить гематологическое исследование для диагностики лейкоза крс.

Оборудование и материалы. Сыворотки крови коров, лейкозный диагностикум, стабилизированная кровь крс, камеры Горяева, меланжеры, предметные стекла, краска Романовского-Гимза, микроскопы, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Поставить РИД (результат зарисовать), подсчитать количество лейкоцитов, определить количество лимфоцитов в образцах крови обследуемых.

Рис. 17. Результаты РИД

*Лабораторная диагностика лейкоза крс по МУ, утв.
МСХ РФ 23.08.2000*

Диагностические исследования на лейкоз проводят: клиническими; патоморфологическими; гистологическими методами, молекулярно-генетическим, серологическим исследованием и биопробой.

● *Клиническое исследование* характеризуется появлением признаков заболевания в опухолевую стадию:

▪ нарушение половых циклов у телочек (длительная охота) , при ректальном обследовании обнаруживают увеличение лимфоузлов таза;

- частые атонии рубца;
- сердечная недостаточность;
- увеличение подкожных лимфоузлов;
- экзофтальмия и исхудание.

С появлением клинических признаков болезнь быстро прогрессирует на фоне исхудания.

● Патоморфологический метод основан на обнаружении опухолей в лимфоузлах, селезенке, печени, почках, сердечной мышце, сычуге, рубце, матке, в скелетной мускулатуре.

● Гистологическое исследование опухолей позволят поставить точный диагноз, так как заболевание протекает по типу острого и хронического лимфоидного лейкоза, лимфосаркомы, миеломной болезни, лимфогрануломатоза. Преимущественно диагностируют хронический лимфоидный лейкоз.

- Серологическое исследование включает постановку РИД и ИФА с сывороткой крови обследуемых. Ведущее исследование РИД, цель которого обнаружить специфические Ig, которые появляются через 2-4 недели после заболевания. Исследование проводят с 6 месячного возраста, за 30 дней до отела и 30 дней после отела, вакцинации, аллергического исследования. Выпускают набор для диагностики лейкоза, в составе которого антиген, специфическая преципитирующая сыворотка, порошок агара, растворитель антигена, концентрат для приготовления агарового геля. В центральную лунку вносят антиген, в две крайних лунки специфическую преципитирующую сыворотку (тест-система), в четыре других – испытуемые. Учет через 48 – 96 часов. Обязательно полоса в тест-системе. Если животные содержат лейкозные Ig полоса сливается с полосой тест системы, если загиб в сторону лунки с сывороткой – слабоположительная реакция, если загиб в сторону лунки с антигеном – резко положительная реакция, такую сыворотку разводят 1:5 и снова ставят реакцию. Отрицательная реакция, когда против испытуемой сыворотки нет полосы. РИД на лейкоз включена в плановое исследование у коров.

- Гематологическое исследование, материал стабилизированная кровь. Определяют количество лейкоцитов в камере Горяева, подсчитывая в 25 больших (100 малых) квадратах или автоматически. Количество лейкоцитов в квадратах умножают на 50. Определяют количество лимфоцитов, для этого готовят мазки крови, фиксируют этиловым спиртом 20-30 мин, окрашивают по Романовскому-Гимза 20-30 мин, микроскопируют окрашенные мазки, определяют лейкограмму и процент лимфоцитов.

$M \text{ лимфоцитов} = M \text{ лейкоцитов} \times \% \text{ лимфоцитов} : 100,$

Где M – количество клеток.

Результаты анализирую по таблице.

Таблица 15 – Лейкозный ключ

Возраст крс (го- ды)	Здоровые		Подозрит	Больные
	М лейко- цит	% лим- фоц	Кол-во лимфоцит	Кол-во лимфоцит
1-2	12 тыс	≤ 75	9-11 тыс	≥ 11
2-4	До 11 тыс	≤ 70	8-10 тыс	≥10 тыс
4-6	До 10 тыс	≤ 65	6,5 – 9 тыс	≥9 тыс
≥ 6	До 9 тыс	≤ 60	5,5 – 8 тыс	≥ 8 тыс

Если лейкоцитов, лимфоцитов меньше животные здоровые, если лейкоцитов больше нормативных показателей, а лимфоцитов норма – подозрительные, таких животных исследуют через 1-2 месяца, если получают такие же показатели – больные. Если количество лейкоцитов и лимфоцитов больше нормы животные больные.

- ПЦР с сывороткой крови.
- Биопроба, заражают лекоконтратом овец внутривенно или внутривенно кроликов, через 14-30 дней они реагируют в РИД.

Биопрепараты разрабатываются.

Лечение не разрабатывалось, так препараты для лечения лейкоза человека дорогие, импортного производства (маптера, велкейд, алкеран), не всегда эффективны.

Лабораторная диагностика инан по Временному МУ МСХ СССР №115-6а от 25.03.1983 г.

Проводят с диагностической целью и планоно. Материал:

- сыворотка и стабилизированная кровь больных;
- кусочки печени, легких, лимфоузлы, почки погибших.

В лаборатории проводят

- РДП с сывороткой крови и диагностикумом инан,

с составе которого антиген, специфическая сыворотка. РДП плановое исследование у лошадей.

- *Гематологическое исследование* проводят у положительно реагирующих в РДП, определяют количество эритроцитов (у больных $\leq 4,5$ млн), гемоглобина ($Hb \leq 50$ г/л), СОЭ (100-170мм/час), процент лимфоцитов (60-75%).

- *Биопроба* на рабочих жеребятках, подкожно 100-200 дефибрированной крови подозрительных или 100-200 сывотки крови, наблюдение 90 дней, появляются клинические признаки б температура, положительная реакция в РДП, положительные гематологические результаты.

- *Гистологическое исследование*, когда в печени, легких, лимфоузлах обнаруживают гемосидерин, гиперплазию селезенки, гломерулонефрит.

Биопрепараты не разработаны, вирус характеризуется антигенным дрейфом, лечение не разработано, заболевание прогрессирует

Контрольные вопросы

1. Характеристика семейства пикорнавирусов.
2. Возбудитель ящура.
3. Возбудитель болезни Тешена.

ТЕМА №18

Лабораторная диагностика ящура, болезни Тешена

Цель занятия. Изучить основные биологические свойства вирусов ящура и болезни Тешена, разобрать лабораторную диагностику заболеваний, биопрепараты.

Поставить РСК с целью определения антигенного типа вируса ящура.

Оборудование и материалы. Компоненты для РСК для определения антигенного типа вируса ящура, пробирки Флоринского, пипетки, образцы биопрепаратов, таблицы, электронный ресурс.

Задание для самостоятельной работы студентов. Поставить РСК по схеме табл.9, учесть результаты, познакомиться с образцами биопрепаратов, лекарственных средств.

Таблица 17– Методика постановки главного опыта РСК

Компоненты	1	2	3	4	5	6	7
Антиген А	1						
Антиген О	-	1					
Антиген С	-	-	1				
Испытуем	-	-	-	1			
1:2	-	-	-	-	1		
1:4	-	-	-	-	-	1	
1:8	-	-	-	-	-	-	1
Сыворотка А	1	1	1	1	1	1	1
Комплемент	1	1	1	1	1	1	1
Выдерживаем +37 ⁰ С – 30 мин							
Гемсистема	1	1	1	1	1	1	1
Выдерживаем +37 ⁰ С – 30 мин							
Учет							

Гемсистема включает 2%-ную взвесь эритроцитов барана и гемолитической сыворотки.

Лабораторная диагностика ящура по ГОСТ 25384-82

Диагноз ставят по клиническим признакам, но необходимо определить антигенный тип и

вариант возбудителя. Материал:

- клинический: содержимое афт, готовят 10%-ную суспензию, сыворотка крови.

В лаборатории проводят:

- *РСК с содержимым афт* для определения антигенного типа и варианта возбудителя с диагностическими ящурными сыворотками.

- *Вирусологическое исследование*. Содержимым афт заражают ВНК-21, обнаруживают вирус по ЦПД (синтиции), идентифицируют в РСК.

- *Биопроба на морских свинках или мышатах сосунах*, проводят, если материала для исследований недостаточно. 10%-ной суспензией заражают лабораторных животных. У морских свинок образуются афты на мякоти лапок, мышата погибают.

- *РДП с сывороткой крови больных, переболевших*.

- *ИФА с сыворотками крови больных, переболевших*.

Биопрепараты:▪ эмульгированная инактивированная вакцина против ящура свиней;

- сорбированная инактивированная вакцина против А, О. Азия-1 для свиней, крс, мрс;

- эмульгированная инактивированная вакцина против ящура крс, мрс, свиней.

Лечение. Афозный стоматит лечат, применяя:

- 0,001%-ный раствор молочной кислоты, добавляют в воду;

- при значительном поражении слизистой индивидуально применяют: винилин, масляный раствор хлорофиллипта, метрогил-гель;

- телятам вводят кровь переболевших 40 мл подкожно по 10 мл в 4-х местах;

- при поражении межпальцевой складки, венчика после обработки перекисью водорода повязки с винили-

ном, метрогилом, масляным раствором хлорофиллипта.

Лабораторная диагностика болезни Тешена по МУ от 23.03.2002 г.

Материал для исследований только патологический: головной мозг, готовят 10%-ную суспензию.

- *ИФА с суспензией патологического материала.*

- *Вирусологическое исследование, заражают СПЭВ, вирус обнаруживают по ЦПД (скопление округлых клеток в виде виноградных гроздьев), идентифицируют в РН на культурах клеток, можно в ИФА, или РИФ.*

Биопрепараты: инактивированная эмульгированная вакцина из штамма Навля-96.

Лечение: применяют глобулин против болезни Ауески, диуретики, аскорбиновую кислоту, анальгетики.

Экзаменационные вопросы по вирусологии и биотехнологии

1. Определение «вирус», «вирион».
2. Морфология и структура вирусов.
3. Классификация вирусов.
4. Репродукция вирусов.
5. Понятие вирогении.
6. Культивирование вирусов.
7. Характеристика культур клеток.
8. Мутации вирусов.
9. Рекомбинации вирусов.
10. Антивирусные факторы естественной резистентности.
11. Противовирусное значение ИГ .
12. Значение ЕК и цитотоксических лимфоцитов.
13. Иммунопатологическое действие вирусов.
14. Противовирусные средства.
15. Отбор патологического материала, транспортировка.
16. Подготовка вирусосодержащего материала для исследований.
17. Строение КЭ.
18. Способы заражения КЭ.
19. Признаки размножения вирусов в КЭ.
20. Этапы приготовления КФ.
21. Титрование вирусов по ООЕ, БОЕ.
22. Титрование вирусов по ГАЕ, ЦПД₅₀, LD₅₀ /
23. ИФА, сущность, варианты постановки, ПЦР.
24. Сущность РДП, методика постановки, учета.
25. Сущность и методика постановки РЗГА.
26. Сущность и методика постановки РНГА.
27. Сущность и методика постановки РН.
28. Характеристика перевиваемых культур клеток.
29. Прионы и вириоды.
30. Биотехнология производства и очистки вирусной биомассы.
31. Типы противовирусных вакцин.
32. Технология производства лечебно-профилактических сывороток.
33. Технология производства диагностических сывороток.
34. Биотехнология глобулиновых препаратов.
35. Способы консервирования биомассы микроорганиз-

мов, биопрепаратов, культур клеток.

36. Возбудитель оспы овец.
37. Возбудитель оспы птиц.
38. Возбудитель миксоматоза кроликов.
39. Возбудитель контагиозного пустулезного дерматита.
40. Вирус болезни Ауески.
41. Вирус ринопневмонии лошадей.
42. Вирус ИРТ.
43. Вирус ЗКЛ.
44. Вирус болезни Марека.
45. Вирус ИЛТ.
46. Вирус бешенства.
47. Вирус папилломатоза крс.
48. Возбудители аденовирусной инфекции собак.
49. Вирус АВИ крс.
50. Вирус ССЯ.
51. Вирус ПГ-3.
52. Вирус НБ.
53. Вирус РС-инфекции крс.
54. Вирус чумы плотоядных.
55. Вирус АЧЛ.
56. Вирус катаральной лихорадки овец.
57. Возбудитель ротавирусной диареи телят
58. Вирус классической чумы свиней.
59. Вирус африканской чумы свиней.
60. Вирус лейкоза крс.
61. Вирус инан.
62. Вирус болезни Тешена.
63. Вирус ящура.
64. Вирус ИББ.
65. Возбудитель Вирус парвовирусного энтерита собак.
66. Вирус алеутской болезни норок.
67. Вирус панлейкопении кошек и возбудитель кальци-
вирусной инфекции кошек
68. Вирус ТГЭС.
69. Возбудитель коронавирусной инфекции телят.
70. Вирус ИБК.
71. Вирус гриппа кур.
72. Вирус гриппа уток.
73. Вирус гриппа лошадей.
74. Вирус ГБК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышников П.И. Ветеринарная вирусология: учебное пособие для вузов/ П.И. Барышников.- М: Форум, 2009.-96с.
2. Бовкун Г.Ф. Вирусология: Учебно-методическое пособие / Г.Ф. Бовкун.- Брянск, Брянская ГСХА, 2009. – 38с.
3. Бовкун Г.Ф. Вирусология: Учебно-методическое пособие/ Г.Ф. Бовкун.- Брянск: Брянская ГСХА, 2012.- 41с.
4. Бовкун Г.Ф. Вирусология и биотехнология: Учебно-методическое пособие для студентов заочного обучения./ Г.Ф. Бовкун.- Брянск: Издательство БГСХА. 2014. – 38с.
5. Ветеринарная вирусология. Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская, И.В. Третьякова/ М., «Колос», 2007-423с.
6. Госманов Р.Г., Колычев Н.М. Ветеринарная вирусология/ Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев, В.И. Плешакова.-СПб: «Лань», 2010 - 473с.
7. Калмыкова М.С. Основы ПЦР с разными форматами детекции: Учебное пособие/ М.С. Калмыкова.- СПб: «Лань» 2009.-98 с.
8. Практикум по ветеринарной вирусологии/ Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А.. М., «Колос», 1999. - 245с.
9. Сюрин В.Н., Самуйленко А.Я., Соловьев Б. В., Фомина Н.В. Вирусные болезни животных/. М., ВНИТИБП, 1998, 1205 с.
10. Тихонов И.В. Биотехнология: учебник/ И.В. Тихонов.- М. ГИОРД, 2005. 518 с.

Учебное издание

Бовкун Галина Федоровна

ВИРУСОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

*Учебно-методическое пособие
для студентов очного обучения
по специальности 36.05.01 «Ветеринария»*

Редактор Павлютина И.П.

Подписано к печати 26.10.2016. Формат 60×84. Бумага печатная.
Усл. п.л. 5,87. Тираж 100. Изд. 5147.

Издательство Брянского государственного аграрного университета
243365, Брянская область, Выгоничский район, с. Кокино,
ФГБОУ ВО «Брянский государственный аграрный университет»

