

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РФ

ФГБОУ ВПО «БРЯНСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ»

Г.Ф. Бовкун

ВИРУСОЛОГИЯ и БИОТЕХНОЛОГИЯ

*учебно-методическое пособие
для студентов заочного обучения
по специальности 111801 - Ветеринария*

Брянск 2014

УДК 619.578

ББК 48

Б – 13

Бовкун Г.Ф. ***Вирусология и Биотехнология***: учебно-методическое пособие./ Г.Ф. Бовкун. – Брянск: Издательство БГСХА, 2014. - 38 с.

Пособие содержит современные методики вирусологических, серологических исследований, основы биотехнологии и консервирования противовирусных препаратов в соответствии с требованиями ФГОС ВПО по направлению подготовки 111801 – «Ветеринария».

Рецензент:

заведующая кафедрой ветеринарной вирусологии им. В.Н. Сюрин, ФГБОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина», доктор биологических наук **Е.И. Ярыгина**

Рекомендовано методической комиссией факультета ветеринарной медицины и биотехнологии Брянской ГСХА от 28 января 2014 года протокол № 5.

© Брянская ГСХА, 2014

© Бовкун Г.Ф., 2014

ЗАНЯТИЕ №1

Тема. Правила работы в лаборатории вирусологии. Отбор патологического материала, подготовка к исследованию. Заражение и вскрытие лабораторных животных. Строение, заражение и вскрытие куриных эмбрионов. Признаки размножения вируса в куриных эмбрионах.

Правила работы в лаборатории вирусологии

В лаборатории вирусологии работают с вирусосодержащим материалом, потери которого не должно быть в окружающую среду. В то же время микроорганизмы из окружающей среды не должны контаминировать вирусную биомассу, поэтому необходимо соблюдать правила внутреннего распорядка.

- Работают в халате, колпаке, резиновых перчатках, сменной обуви.
- Запрещено покидать помещение в халате, выполнять другие работы в лаборатории.
- Исследования проводят в ламинарном боксе.
- Поступивший материал, считают инфицированным, помещают на кювет, банки обтирают дезраствором. Работают над кюветом, используют пипетки с грушами. Всю посуду после работы погружают в дезинфицирующий раствор. Стерильную посуду открывают над факелом.
- После работы рабочее место дезинфицируют 5% хлорамином, 2-10% NaOH, 3% формальдегидом или 96⁰ спиртом.
- Хранят вирусосодержащий материал в морозильной камере холодильника, с обязательными надписями. Холодильники под замком с пломбой и печатями.
- При работе не допускают распространения вирусов, не допускают загрязнение материала микрофлорой, обеспечивают личную безопасность.

Отбор вирусосодержащего материала, транспортировка

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

Материал от, погибших, вынужденно убитых больных животных берут в период четких клинических признаков, не позднее 2-3 ч после смерти или убоя. Если материал с признаками гниения, выделить вирус, провести его идентификацию не возможно. Затруднено серологическое исследование.

Материалом для исследования служат:

- кусочки 10-20 г печени, селезенки, легкого;
- лимфоузлы, почки, головной мозг, без вскрытия черепа.

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

Для выделения вирусов используют дефибринированную кровь или лаковую кровь, когда к 1 объему крови добавляют 1 объем стерильной дистиллированной воды.

Для серологических исследований берут кровь дважды с интервалом 2-3 недели в объеме 5 мл, чтобы исследовать парные сыворотки.

Взятые пробы как можно скорее следует охладить и транспортировать материал:

- в термосе с охлаждающей смесью (сухой лед, этиловый спирт в равных частях - 71°C держится несколько дней);
- в смеси из 3 частей льда, снега и 1 части хлорида натрия (- 15-20°C держится несколько часов);

Можно материал поместить в смесь из равных объемов глицерина и физиологического раствора (0,85% NaCl). Если использовать глицерин, то материал нельзя вводить лабораторным животным, эмбрионам, культурам клеток, использовать МФА.

Тару, где находится материал, подписывают, термос опечатывают, материал снабжают сопроводительной запиской.

После транспортировки хранят исследуемый материал в лаборатории при $-40-70^{\circ}\text{C}$.

Подготовка вирусосодержащего материала для исследований

В лаборатории материал оттаивают, отмывают от глицерина, берут для исследований только часть, остальную хранят при $-40-70^{\circ}\text{C}$.

- *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 1500-3000 тыс. оборотов в мин. (об/мин.), надосадочную жидкость отсасывают в стерильный флакон, освобождают от микрофлоры (пенициллин, стрептомицин, нистатин по 100 мкг на 1 мл), контакт 30-60 мин, сеют на ПА, ПБ, МППБ, среду Сабуро или Чапека, если роста нет, суспензию можно использовать, сутки ее хранят $-20-70^{\circ}\text{C}$.

- *Смывы из носа, конъюнктивы* встряхивают с тампонами 10-15 мин, отжимают, центрифугируют 2-3 тыс. об/мин – 20 мин, надосадочную жидкость сливают, добавляют пенициллин и стрептомицин по 100 мкг, выдерживают, делают посев, замораживают при $-10-20^{\circ}\text{C}$.

- *Фекалии* берут в количестве 1 г, добавляют 10 мл Хенкса, стерильные бусы, встряхивают, центрифугируют 2-3 тыс. об/мин, добавляют пенициллин, стрептомицин, нистатин по 100 мкг, тетрациклин 200 мкг на 1 мл, выдерживают 30 – 60 мин, делают посев, замораживают

- *Мочу* добавляют антибиотики, выдерживают, делают посев, замораживают.

- *Содержимое папул, пузырьков, пустул, корок* разводят физиологическим раствором 1:5, корки растирают в ступке, центрифугируют 2-3 тыс. об/мин 10-15 мин, добавляют антибиотики 200-500 мкг на 1 мл, выдерживают после контроля на отсутствие микрофлоры используют для заражения.

- *Кровь* оттаивают, центрифугируют, добавляют антибиотики 100-200 мкг/мл, используют после контроля на стерильность. Свернувшуюся кровь растирают в ступке с Хенксом 1:1, центрифугируют, добавляют антибиотики, выдерживают и после контроля на отсутствие микрофлоры используют.

Методы заражения лабораторных животных

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

Лабораторных животных используют для:

- биопробы, (развивается заболевание с характерными признаками) и первичного выделения и накопления вируса;
- поддержания вируса в активном состоянии;
- титровании вируса;
- получения диагностических гипериммунных сывороток.

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

Метод заражения	Кролики	Морские 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
Интрацеребральный	0,3	0,05	0,03	0,02

Вирусосодержащий материал может быть введен разными методами: подкожно, внутрикожно, внутримышечно, внутрибрюшинно, внутривенно, интраназально, интрацеребрально. Способ введения обусловлен тропизмом вируса - способности репродуцироваться в определенных типах клеток.

В нервных клетках репродуцируются – нейротропные, в клетках кожи- дермотропные, легких – пневмотропные (грипп), если в разных клетках– политропные (ИРТ), во всех типах клеток – пантропные (чума собак) вирусы.

Биопроба служит для индикации вируса в материале. Если после заражения возникает заболевание со специфической клинической картиной, делают заключение о наличии вируса и его виде. Если результаты нечеткие, то исследование продолжают.

Вскрытие лабораторных животных

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

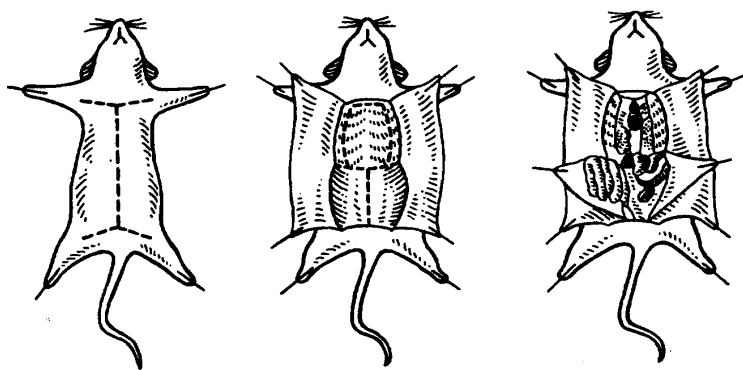


Рис. 1. Порядок вскрытия брюшной и грудной полостей

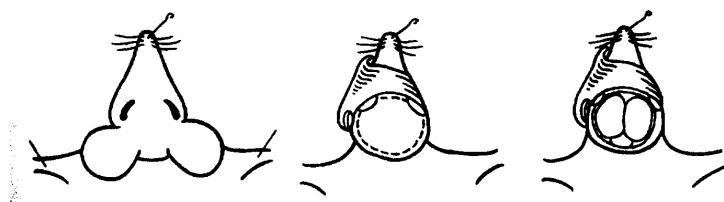


Рис.2. Порядок вскрытия черепной полости

Труп фиксируют на вскрывочном столике или на доске. Брюшную и грудную полости вскрывают при фиксации животных в спинном положении, схема вскрытия рис.1. Шерсть обрабатывают дезинфицирующим раствором, используют стериль-

ные ножницы и пинцеты. После вскрытия кожи , инструменты меняют.

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

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 проницаема для микробов;
- *подскорлупная оболочка*;
- *воздушная камера*, образуется между листками подскорлупной оболочки;
- *хорионаллантоисная оболочка (ХАО)*;
- *аллантоисная полость с жидкостью*;
- *зародыш*, располагается головой к воздушной камере, погружен в амниотическую жидкость;
- *амнион*, содержит 1 мл жидкости;
- *желточный мешок* пуповиной связан с зародышем;
- *остаток белка*.

Способы заражения

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.

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*, оступив 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, ньюкаслской 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 аллантоисную 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 см, *второй вариант*- горизонтально в центр на глубину 2-3 мм.

- *на хорионаллантоисную 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 0,2 мл вирусосодержащей суспензии, отверстие закрывают пластырем или покровным стеклом.

Вскрытие куриного эмбриона

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

КЭ вскрывают в стерильном боксе. Скорлупу обрабатывают иодированным спиртом. Вскрывают воздушную камеру, отсасывают аллантаическую 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 вируса в курином эмбрионе

- Гибель в характерные для вируса сроки
- Патологоанатомические изменения в различных структурах КЭ:
 - На ХАО – кровоизлияния, узелки (вирус оспы, ИЛТ, болезнь Ауески и др.).
 - Обезвоживание и мумифицирование КЭ.
 - Прилипание лапок к голове.
 - Перекручивание шеи (признак размножения вируса инфекционного бронхита кур).
 - Дистрофия печени – признак размножения вируса гепатита утят.
 - Накопление уратов (соли мочевой кислоты), фиброзные пленки обнаруживают при поражении почек вирусом инфекционного бронхита.
 - Акрангия и отеки шеи при пикорнавирусной инфекции.
- Гемагглютинирующие свойства аллантаической и амниотической жидкости, с вывлением вирусов с помощью капельной РГА. К капле аллантаической жидкости добавляют взвесь эритроцитов, через 5-10 мин учет по образованию хлопьев.
- Иногда не удается обнаружить ни один из признаков, такой пассаж называют «слепым».

Содержание занятия:

1. Освоить методы заражения белых мышей.
2. Освоить методику вскрытия погибших.
3. Познакомиться со строением КЭ.
4. Освоить методы заражения КЭ.
5. Провести вскрытие КЭ с диагностической целью.

ЗАНЯТИЕ № 2

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

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

- 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 кристалл-виолета 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 оспообразующих 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 ООЕ

Для этого заражают 5 куриных эмбрионов на ХАО известным разведением вирусосодержащего материала в дозе 0,2. Погибших КЭ вскрывают или охлаждают, подсчитывают оспины (некротические узелки). Определяют титр по формуле:

$$T = n : (V \times a), \text{ где}$$

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

Пример: разведение 1:10, доза 0,2, количество оспин 10,11,13,18,8.

Определяют $n = (10+11+13+18+8) : 5 = 12$

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

т.е. в 1 мл вирусосодержащего материала 600 доз вируса, каждая доза способна образовывать 1 оспина на ХАО.

Определение титра по БОЕ

Вирусосодержащий материал разводят 1:10, 1:100, 1:1000, доза для заражения культур клеток 0,2 мл. Через 48 часов подсчитываем бляшки на матрице.

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

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

Пример: после заражения матрасов 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.

Если вирусы не образуют оспин и бляшек, их T определяют по $ЛД_{50}$, $ЭЛД_{50}$ или $ИД_{50}$, $ЭИД_{50}$.

Определение титра вируса по $ЛД_{50}$, $ЭЛД_{50}$

Готовят разведения вирусосодержащего материала 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , затем заражают лабораторных животных или КЭ. Учитывают результат по количеству погибших, % летальности.

Таблица 2- Схема определения Т по ЛД₅₀

Разведение	Выжило	Погибло	% летальности
10 ⁻¹	0	6	100
10 ⁻²	0	6	100
10 ⁻³	1	5	88,8
10 ⁻⁴	4	2	37,5

Т.е. ЛД₅₀ между 10⁻⁴ и 10⁻³, расчет по формуле Кербера:

$$\text{Lg ЛД}_{50} = \text{lg} B - \frac{B-50}{B-a} \times \text{lg} D, \text{ где}$$

В- разведение, при котором гибель > 50%,
 в - % летальности, соответствующий В,
 а – процент летальности разведения, при котором погибло менее 50% биологических моделей,
 D- коэффициент разведения = 10.

$$\text{Lg ЛД}_{50} = \text{lg} 10^{-3} - \frac{88,5-50}{88,8-37,5} \times \text{lg} 10 = -3-(0,65 \times 1) = -3,65$$

Т = 10^{-3,65} ЛД₅₀, т.е. разведение вируса 10^{-3,65} вызывает гибель 50 % лабораторных животных.

Определение титра вируса по гемагглютинирующей активности

Вирусы, агглютинирующие эритроциты, можно оценить по ГАЕ, за 1 ГАЕ принимают дозу вируса, способную агглютинировать 50% эритроцитов. Для этого ставят луночную РГА:

- в лунки вносят физраствор по 0,5 мл;
- готовят разведение вируса от 1:2 до 1:1024;
- добавляют в каждую лунку по 0,5 мл 1-2%-ной суспензии эритроцитов.

Учитывают реакцию после 40 – 60 минутной экспозиции

при комнатной температуре. Интенсивность агглютинации оценивают в крестах:

- # - осадок зонтик с ажурными (зазубренными) краями;
- +++ - осадок зонтик с округлыми краями;
- ++ -осадок диск;
- - отрицательная – осадок пунктик.

Таблица 3 - 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
Вирус. материал	0,5	Готовят 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 через 30-40 мин при комнатной температуре										
Результат Т=128ГАЕ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
Разведение	1:2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024

Разведение, при котором оценка не менее (++) и будет 1 ГАЕ (гемагглютинирующая единица).

Согласно примеру, представленному в таблице 3, титр изучаемого вируса составляет 128 ГАЕ.

Содержание занятия:

1. Приготовить КФ.
2. Освоить методы перевивания культур, оценки жизнеспособности клеток.
3. Познакомиться с методами титрования вирусов, освоить титрование по ГАЕ.

ЗАНЯТИЕ № 3

Тема. Серологические реакции в вирусологии. ИФА и его разновидности.

Вирусы - хорошие антигены, поэтому их можно обнаружить в исследуемом материале с помощью серологических реакций:

- *реакции диффузной преципитации (РДП);*
- *реакции задержки гемагглютинации (РЗГА), еще эту реакцию называют реакцией торможения гемагглютинации (РТГА) ставят с вирусами, обладающими гемагглютинирующей активностью;*
- *реакции непрямой гемагглютинации (РНГА);*
- *реакции нейтрализации (РН);*
- *иммуноферментного анализа (ИФА), современная чувствительная реакция;*
- *полимеразной цепной реакции (ПЦР) – увеличение числа копий определенных фрагментов ДНК in vitro с последующей идентификацией.*

Серологическая диагностика вирусных заболеваний предусматривает выявление антител (Yg) у больных, переболевших (реконвалесцентом) с помощью серологических реакций. Выявление антител (Yg) у реконвалесцентом называется ретроспективной диагностикой.

Реакция диффузионной 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 или антирабические диагностические сыворотки);
- обнаружения антител у обследованных, используя заведомо известный антиген, реакцию называют РИД для диагностики лейкоза КРС, РДП - инфекционной анемии лошадей

Методика постановки РДП – РИД включает:

- приготовление гель-агара: 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.

- заполнение компонентами лунок: разбавленный антиген ВЛ в центральную лунку, в периферические – специфическую преципитирующую сыворотку (2 лунки), в 4 лунки - испытуемые сыворотки. Ставят контроли: антиген ВЛ и преципитирующая сыворотка, отрицательная сыворотка, слабоположительная сыворотка;

- выдерживание реакции в эксикаторе при комнатной температуре, учет через 48 часов, не позже 96 часов.

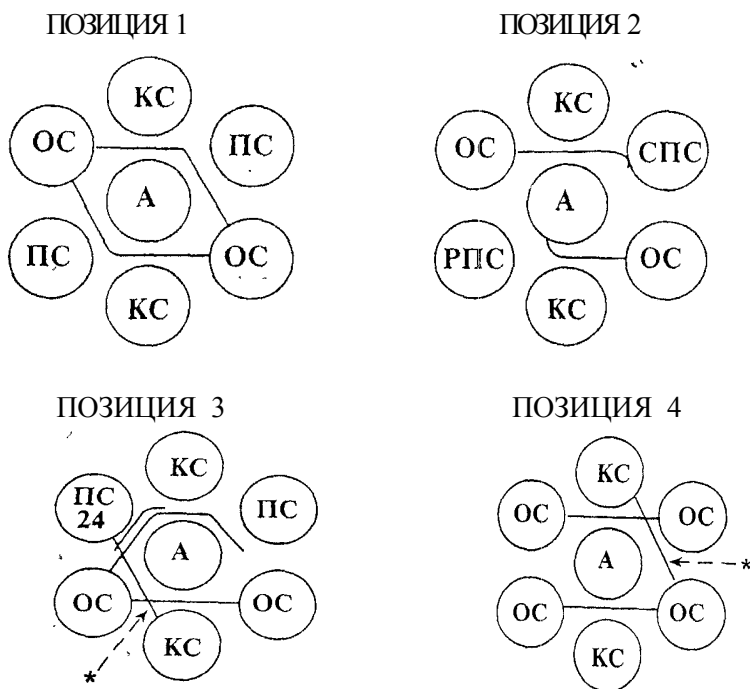


Рис. 3. Результаты реакции антигена ВЛКРС с отрицательной (ОС), положительной (ПС), слабоположительной (СПС), резко положительной (РПС), контрольной положительной сывороткой (КС)

Реакция непрямой гемагглютинации (РНГА)

Сущность РНГА заключается в склеивании эритроцитарного антигена, сенсibilизированного экстрактом вируса или Ig с образованием специфических осадков.

РНГА применяют для:

- обнаружения вируса в исследуемом материале, используя эритроцитарный антиген (диагностикум), сенсibilизированный специфическими Ig (вирус чумы свиней);
- определения титра антител в сыворотке крови, используя эритроцитарный диагностикум, сенсibilизированный специфическим вирусом.

РНГА ставят по типу:

- луночной в лунках плексиглазовых пластин (макрометод);
- луночной в планшетах с лунками (микрометод).

Учет в крестах:

- осадок - зонтик с зазубренными краями - #;
- осадок - зонтик с округлыми краями +++;
- осадок - диск ++;
- осадок пунктик – отрицательная.

Реакция задержки гемагглютинации (РЗГА, РТГА)

Сущность РЗГА, (РТГА) в нейтрализации гемагглютинирующей активности вируса специфической сывороткой, с выявлением результатов с помощью гемагглютинации. Ставят в два этапа, в первом этапе реакции взаимодействуют вирус и сыворотка, во втором - выявляют результат этого взаимодействия, добавляя суспензию эритроцитов. РЗГА ставят с целью:

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

РЗГА ставят в лунках макрометодом и микрометодом.

Учет в крестах:

- # - полное отсутствие гемагглютинации, осадок пунктик;
- ++ - осадок диск и пунктик;
- - осадок в виде зонтика.

Реакция нейтрализации (РН)

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

РН ставят с целью:

- определения титр вируснейтрализующих антител;
- идентификации неизвестного вируса, испытывая его с заведомо известными сыворотками;
- установления антигенного родства между вирусами.

РН ставят с разными разведениями сыворотки или вируса.

РН ставят на лабораторных животных, куриных эмбрионах, культурах клеток.

Методика РН на КЭ с разведенными сыворотками

Таблица 4 - Методика постановки РН на КЭ с разведенными сыворотками

Разведение сыворотки	Разведение сыворотки	Количество зараженных	Доза для заражения	Количество погибших	Количество выживших
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

В пробирках готовят разведения сывороток, затем добавляют равный объем вирусосодержащего материала в дозе 100 ЭД₅₀ (эффективных доз).

Смесь выдерживают 60 мин при комнатной температуре или в термостате, вводят смесь из каждой пробирки 4 КЭ по 0,2 мл.

Учитывают результаты по разведению сыворотки, защищающей 50% КЭ от действия 100 ЭД₅₀, которое рассчитывают по формуле Кербера:

$$\text{Lg TЭД}_{50} = \text{LgD} + (\text{Lg d} : 2) - \text{Lgd} \times (\sum r : n)$$

где $TЭД_{50}$ - разведение сыворотки,

D – наибольшее разведение, защищающее 100% КЭ,

d – коэффициент разведения, равен 2

Σr - количество, защищенных КЭ в каждом разведении,

n - количество объектов при испытании каждого разведения

По данным, приведенным в таблице 4,

$$\begin{aligned} \text{Lg} TЭД_{50} &= \text{Lg} 10^{-0,6} + (\text{Lg} 2 : 2) - \text{Lg} 2 \times (13 : 4) = -0,6 + (-0,3:2) - \\ &(-0,3) \times 3,25 = -0,6 + (-0,15) + (-0,975) = -1,725 \end{aligned}$$

Находим по таблице антилогарифмов, что это разведение 1: 48 = $TЭД_{50}$, защищающее 50% КЭ от 100 ЭД₅₀.

Методика РН с разведениями вируса

Шире используют методику РН 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 (в небольшом разведении).

- Ко всем разведениям второго ряда добавляют нормальную сыворотку.

- Смеси выдерживают установленное время при определенной температуре.

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

- Рассчитывают T вируса в присутствии специфической сыворотки T_{AS+SS} и титр вируса – в присутствии нормальной сыворотки T_{AS+SN} .

- Определяют *индекс нейтрализации (ИН)* по формуле:

$$ИН = T_{AS+SN} : T_{AS+SS},$$

где T_{AS+SN} – разведение вируса, нейтрализованное нормальной сывороткой; T_{AS+SS} – разведение вируса, нейтрализованное специфической сывороткой.

ИН показывает во сколько раз антитела могут снизить титр вируса путем нейтрализации.

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

Пример: сыворотка против вируса НБ нейтрализовала полевой вирус НБ в титре 10^{-2} , а нормальная – 10^{-5} . $\text{ИН} = 10^{-5} : 10^{-2} = 1000$. Таким образом специфическая сыворотка против НБ снижает титр вируса в 1000 раз.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

ИФА – высокочувствительный метод выявления комплекса антиген - антитело, меченного 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 прямой и непрямой метод, в положительных случаях образуется цветное окрашивание, обнаруживаемое микроскопией, используют редко ;
- *твердофазном* – в лунках микропанелей (серологических планшетов).

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

Для выявления антител лунки планшета сенсibiliзируют инактивированным антигеном, а для выявления антигена (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

- 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, голубого - при разложении ТМБ;
- повышается плотность раствора, устанавливают на спектрофотометре.

Появление окрашивания в лунках, увеличение плотности раствора характеризуется положительной реакцией.

Если комплекса антигена с антителом не образуется, конъюгат после контакта не фиксируется и смывается, 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.

Основу метода составляет катализируемое ДНК-полимеразой многократное образование копий определенных фрагментов молекулы ДНК *in vitro*.

ПЦР ставят в 25 – 40 циклов. Каждый цикл включает три этапа:

- *денатурация ДНК* 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 синтетические праймеры или приготовленные, отжиг проводят при 50 – 65⁰ С – 30 сек;

- *элонгация или полимеризация*, когда вносят фермент ДНК-полимеразу при температуре 68 – 72⁰ С 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. Идентификацию проводят электрофорезом с окрашиванием бромистым этидием.

Методика постановки ПЦР включает:

- *выделение ДНК-матрицы исследуемого материала;*
- *смешивание выделенной ДНК с амплификационной смесью:* ДНК-полимеразой, двумя видами праймеров, хлористым магнием, буфером, деионизированной водой и минеральным маслом;

- *амплификация в амплификаторе*, где происходит денатурация, отжиг, элонгация, по программе;

- *учет результатов электрофорезом в 1-2%-ном агарозном геле в присутствии бромистого этидия*, по образованию светящихся или серых полос.

Метод ПЦР применяют:

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

Содержание занятия:

1. Поставить РИД для диагностики лейкозакрупного рога-того скота.
2. Познакомиться с методикой постановки и учета РНГА для диагностики ТГЭС.
3. Познакомиться с методикой постановки и учета РЗГА для обнаружения антител против гриппа птиц.
4. Познакомиться с методикой РН с разведениями сыворотки и с разведениями вируса.
5. Поставить и учесть ИФА.

ЗАНЯТИЕ № 4

Тема. Биотехнология производства противовирусных препаратов. Способы консервирования биомассы микроорганизмов и биопрепаратов

Биотехнология производства вирусной биомассы

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

- культивирование вируса с последующей индикацией, идентификацией вируса 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 посевы 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

1. *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.

2. Убитые вакцины:

- *цельновирионные*, инактивированные разными факторами и средствами: формальдегидом, этиленимином, 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;
- безвредность;
- иммунную и специфическую активность;
- эпизоотологическую безопасность и эффективность;
- стабильность при хранении.

Технология производства лечебно-профилактических сывороток

Лечебно-профилактические сыворотки – это сыворотки крови гипериммунных животных, содержат большое количество специфических иммуноглобулинов (Ig), способных нейтрализо-

вать 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;
- грунди́рование 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 сап, трихоманоз, инан, 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 окончании 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 выпавшие 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 pH 3,2 и при pH 4,2, температуре 22 – 25⁰ С;
- термоденатурация при 58⁰ С в течение 45 мин, при pH 4,3, в присутствии 14 – 14,5% сульфата аммония;ые фильтры;
- высаливание активных глобулинов сульфатом аммония 34% при pH 7,1;
- стерилизующая фильтрация через пластины СФ или мембранн

- 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, РДП.

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* (комплемента связывающие) 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, дефибрирования, фильтрации, расфасовки во флаконы, ампулы.

Контроль диагностических сывороток включает:

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

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 гамма-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 гамма-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

- 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 осуществляется 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, глютамат, калийфосфатный буфер).

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

Таблица 1 - 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 крио-

протектор в концентрации 5 – 10%. Широко используют 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 - -50⁰ С в течение трех месяцев.

При температуре 5⁰ С под слоем вазелинового масла можно хранить культуры клеток в течение 30 дней.

Содержание занятия:

1. Учесть результаты РИД для диагностики лейкоза крупного рогатого скота.

2. Разобрать технологию приготовления противовирусных вакцин, лечебно-профилактических, диагностических сывороток, иммуноглобулинов.

3. Познакомиться с образцами вакцин и сывороточных препаратов.

4. Разобрать способы консервирования биопрепаратов, вирусной биомассы, культур клеток.

Экзаменационные вопросы по ветеринарной вирусологии

1. Определение «вирус», «вирион».

2. Морфология и структура вирусов.

3. Классификация вирусов. Репродукция: адсорбция, проникновение, депротенизация.

4. Репродукция: синтез ранних вирусных белков, синтез вирусных компонентов, сборка, формирование частиц, выход из клетки.

5. Понятие вирогении.

6. Реакция клетки на вирусную инфекцию.

7. Культивирование вирусов.

8. Характеристика культур клеток.

9. Изменчивость вирусов.

10. Антивирусные факторы естественной резистентности.

11. Противовирусное значение .Ig.
 12. Значение ЕК – клеток и цитотоксических лимфоцитов.
 13. Иммунопатологическое действие вирусов.
 14. Противовирусные средства.
 15. Отбор патологического материала, транспортировка.
 16. Подготовка вирусосодержащего материала для исследований.
 17. Строение куриного эмбриона.
 18. Способы заражения КЭ
 19. Признаки размножения вирусов в КЭ.
 20. Этапы приготовления куриных фибробластов.
 21. Титрование вирусов по О О Е и Б О Е
 22. Титрование вирусов по ГАЕ
 23. ИФА, сущность , варианты постановки.
 24. Сущность РДП (РИД), методика постановки.
 25. Сущность и методика постановки Р З Г А .
 26. Сущность и методика постановки Р Н Г А .
 27. Сущность и методика постановки РН.
 28. Характеристика перевиваемых культур клеток.
 29. Прионы и вириды.
 30. Биотехнология производства 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 микроорганизмов.
- Сублимационное высушивание.
36. Возбудитель оспы овец.
 37. Возбудитель оспы птиц.
 38. Возбудитель миксоматоза кроликов.
 39. Возбудитель контагиозного пустулезного дерматита овец.
 40. Возбудитель болезни Ауески.
 41. Возбудитель рипопневмонии лошадей.
 42. Возбудитель ИРТ
 43. Возбудитель З К Л .
 44. Возбудитель болезни Марека.

45. Возбудитель ИЛТ.
46. Возбудитель бешенства.
47. Возбудитель папилломатоза КРС.
48. Возбудитель аденовирусной инфекции собак.
49. Возбудитель аденовирусной инфекции КРС.
50. Возбудитель ССЯ.
51. Возбудитель РС – инфекции КРС.
52. Возбудитель ПГ – 3.
53. Возбудитель НБ.
54. Возбудитель чумы плотоядных.
55. Возбудитель АЧЛ.
56. Возбудитель чумы свиней.
57. Возбудитель лейкоза КРС.
58. Лабораторная диагностика лейкоза КРС,
59. Возбудитель Инан.
60. Возбудитель болезни Тешена.
61. Возбудитель ящура.
62. Возбудитель ИББ.
63. Возбудитель Т Г Э С.
64. Возбудитель коронавирусной инфекции телят.
65. Возбудитель ИБК.
66. Возбудитель гриппа кур.
67. Возбудитель гриппа уток.
68. Возбудитель гриппа лошадей.
69. Возбудитель парвовирусного энтерита собак.
70. Возбудитель ГБК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Барышников П.И. Ветеринарная вирусология: учебное пособие для вузов/ П.И. Барышников. - М.: Форум, 2009.- 96с.
2. Белоусова Р.В. Практикум по ветеринарной вирусологии / Р.В. Белоусова, Преображенская Э.А., Троценко Н.И. 3-е изд. перераб и допол.-М.: Колос, 2006. – 248 с.
3. Ветеринарная вирусология. Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская, И.В. Тетьякова/ М., «Колос», 2007- 423с.
4. Госманов Р.Г. Ветеринарная вирусология: учебник для вузов/ Р.Г. Госманов, Кольчев Н.М., Плешакова В.И. – 3-е изд, перераб. и допол.- СПб.: Лань, 2010 – 480 с.
5. Методические указания по диагностике лейкоза крупного рогатого скота, Утв. МСХ РФ 23.08.2000.
6. Сюрин В.Н Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин., Самуйленко А.Я., Соловьев Б. В., Фомина Н.В. М., ВНИТИБП, 1998, 1205с.

Учебное издание

Бовкун Галина Федоровна

ВИРУСОЛОГИЯ и БИОТЕХНОЛОГИЯ

*учебно-методическое пособие
для студентов заочного обучения
по специальности 111801 - Ветеринария*

Редактор Лебедева Е.М.

Подписано к печати 31.01.2014 г. Формат 60x84 ¹/₁₆.

Бумага печатная. Усл. п. л. 2,20. Тираж 100 экз. Изд. № 2554.

Издательство Брянской государственной сельскохозяйственной академии.
243365 Брянская обл., Выгоничский район, с. Кокино, Брянская ГСХА