

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н.И. Вавилова»

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В ВЕТЕРИНАРНОЙ МИКРОБИОЛОГИИ,
ВИРУСОЛОГИИ, ЭПИЗООТОЛОГИИ, МИКОЛОГИИ С
МИКОТОКСИКОЛОГИЕЙ И ИММУНОЛОГИИ**

краткий курс лекций

для аспирантов 3 года обучения

Направления подготовки
36.06.01 Ветеринария и зоотехния

Профиля подготовки
**Ветеринария микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксинологией и иммунология**

Саратов 2014

Рецензенты:

Доктор биологических наук, профессор кафедры «Микробиология, вирусология и биотехнология» ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ» Щербаков А.А.

Кандидат биологических наук, руководитель научно-исследовательской лаборатории ООО «ВИК Здоровье животных» Семенов С.В.

Методы исследований в ветеринарной микробиологии, вирусологии, эпизоотологии, микологии с микотоксикологией и иммунологии: краткий курс лекций для аспирантов 3 года обучения направления подготовки 36.06.01 «Ветеринария и зоотехния» / Сост.: Е.С. Краникова, А.В. Агольцов // ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ». – Саратов, 2014. – 51 с.

Краткий курс лекций по дисциплине «Методы исследований в ветеринарной микробиологии, вирусологии, эпизоотологии, микологии с микотоксикологией и иммунологии» составлен в соответствии с программой дисциплины и предназначен для аспирантов 3 года обучения направления подготовки 36.06.01 «Ветеринария и зоотехния». Краткий курс лекций содержит теоретический материал по вопросам эпизоотологических, микробиологических, вирусологических и микологических методов исследования, связанных с исследованием как самих животных, так и биологического материала и объектов окружающей среды на наличие патогенов и продуктов их жизнедеятельности. Материал ориентирован на вопросы компетенций будущих ветеринарных специалистов.

Введение.

Инфекционные болезни на протяжении многих столетий были и остаются наиболее опасными болезнями из-за их способности вовлечь в процесс большое число здоровых животных в течение короткого периода времени.

При постановке диагноза инфекционной болезни эпизоотологических данных и анамнезе болезни, данных лабораторных и инструментальных исследований. После постановки предварительного диагноза определяется дальнейшая тактика обследования и проведения противоэпидемических мероприятий (изоляция инфицированного, выявление контактировавших, возможных источников и механизма передачи возбудителя инфекции).

Лабораторные исследования играют важную роль в установлении диагноза инфекционных болезней, назначении этиотропной терапии, проведении контроля за эффективностью лечения. Процесс специфической лабораторной диагностики основан на выявлении возбудителя и ответной реакции организма в ходе инфекционного процесса. Он состоит из трех этапов: сбора материала, транспортировки и его исследования в лаборатории. К проведению каждого этапа предъявляют определенные требования, от соблюдения которых зависит эффективность лабораторной диагностики. Лабораторные методы диагностики различны по чувствительности и специфичности. Задача врача заключается в правильном выборе метода исследования и грамотной оценке его результатов.

Лекция 1

ЭПИЗОТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ИССЛЕДОВАНИЯ.

1.1 Исторические предпосылки;

1.2 Исходные данные и их характеристика;

1.3 Эпизоотологический риск;

1.4 Дескриптивная эпизоотология

Термин эпизоотология (epi - на, zoon - животное и logos – учение) - наука о закономерностях возникновения, распространения и угасания заразных болезней животных, методах их профилактики и борьбы с ними.

Главными задачами эпизоотологии можно считать две:

- изучение закономерностей эпизоотического процесса (причин возникновения, развития, распространения, угасания и исчезновения инфекционных болезней и влияния условий внешней среды на интенсивность этого процесса);
- разработка и совершенствование методов профилактики и ликвидации инфекционных болезней (активное вмешательство в эпизоотический процесс).

Стратегическое направление деятельности специалистов-эпизоотологов - это профилактика болезней, то есть разработка мероприятий, препятствующих возникновению ИБ.

Схема изучения инфекционных болезней

- Общее определение болезни
- История изучения, географическое распространение, экономическое значение
- Этиология
- Эпизоотологические особенности
- Патогенез
- Клинические признаки: инкубационный период, течение и формы проявления болезни, симптоматика, исход
- Патоморфологические изменения
- Диагноз, дифференциальный диагноз
- Иммунитет и специфическая профилактика
- Профилактика, меры борьбы и терапия
- Краткие сведения о болезни у человека (при зооантропонозе)
- Метод эпизоотологии.

Эпизоотология как наука имеет свой собственный специальный метод исследования - метод эпизоотологического исследования (МЭИ), или комплексный (единый) МЭИ. *Эпизоотологическое исследование* - это совокупность методических приемов и специальная система анализа эпизоотологического материала, направленные на раскрытие закономерностей эпизоотического процесса и разработку на этой основе определенных теоретических и практических положений.

Реализация эпизоотологического метода исследования требует наличия конкретного исходного материала, отвечающего определенным требованиям. Исходные данные по их происхождению, аналитической значимости и предназначению подразделяется на три категории (таблица 1).

Источники исходных данных и их общая характеристика

Источники	Характеристика данных
Первичные данные	Данные ветеринарного учета и отчетности Результаты выборочного исследования
Результаты текущего исследования	Имеющиеся данные по диагностике, эпизоотологическому анамнезу
Общестатистические сведения	Особенности исследуемой популяции

Эпизоотологический риск

В современной мировой науке и практике именно эпизоотологический риск трактуется как первостепенная понятийная эпизоотологическая категория. Оценка рисков как многосторонний и целевой подход в рамках эпизоотологического метода исследования в связи со сравнительной конкретностью и предметностью этого понятия приходит на смену абстрактной прогностике и другим оценочным приемам. Эта категория вполне соответствует концепции эпизоотологии, как общеветеринарной диагностической дисциплины (применительно к эпизоотологии как инфекционных, так и незаразных болезней).

Клиническая эпизоотология за счет своего комплексного эпизоотологического метода максимально расширяет арсенал подходов, повышает степень объективности и обобщает данные информационных ресурсов по результатам аналогичной работы и аналогичным решением сходных клинических проблем.

Особое значение при незаразных болезнях животных, в частности, при хирургической, акушерской, онкологической патологии придается доказательной эпизоотологии. Этот раздел эпизоотологической науки использует совокупность приемов, методов и подходов для достижения наиболее объективного, достоверного и убедительного выражения результатов клинико-лабораторного, биохимического, эпизоометрического и статистического исследований.

Таким образом, концепция эпизоотологии как общеветеринарной диагностической дисциплины в практической деятельности ветеринарного врача позволяет рассматривать любое явление патологии как эпизоотический инцидент (случай). При этом обследование хозяйства и расследование данного конкретного случая заболевания не заканчивается определением диагноза, но приводятся и анализируются факты по временному, территориальному, зоографическому распространению данного заболевания, то есть тем самым определяются условия и факторы, приводящие к заболеванию, его многолетняя динамика в районе, сезонность, риск, шансы, а также дается относительный прогноз по нему. На этих данных обосновываются рекомендации по противоэпизоотическим, лечебным и профилактическим мероприятиям в конкретном хозяйстве.

Следовательно, клиническая диагностическая эпизоотология дает возможность охарактеризовать заболевание любой природы как эпизоотический образец с типичной картиной возникновения, распространения и течения заболевания. В практической ветеринарии любой ветеринарный врач осознанно или неосознанно всегда использует методологию общей и частной эпизоотологии в раскрытии причин заболевания заразной и

незаразной этиологии, что объективно свидетельствует о естественности и прагматичности теории и методов эпизоотологии.

Самый простой пример эпизоотологического анализа заболеваемости животных травматизмом основывается на сведениях о рационе животных, его сбалансированности, характере местности и ее захламленности, и в конце концов выясняет ведущий фактор риска травматизма. Это позволяет ликвидировать такой фактор. А если смотреть на травматизм только с хирургической точки зрения, то долгое время придется забивать или оперировать животных с различными травмами, не замечая и не влияя на причину такого травматизма. Такой хирург (терапевт, акушер и т.д.) не будет считаться квалифицированным специалистом, поскольку не обращает внимания на причинно-следственные связи явлений, с которыми имеет дело.

И наконец, чтобы доказать практическую ценность и значимость эпизоотологии в ветеринарии, нужно знать и помнить об ущербе, который наносится хозяйством при несоблюдении и невыполнении канонов и рекомендаций эпизоотической науки. Инфекционные болезни в силу своей контагиозности и плотности размещения животных могут поражать большое число животных, в масштабах от одного хозяйства до нескольких стран. Современные примеры распространения ящура в Англии или губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота лишней раз и убедительно свидетельствуют о катастрофических потерях поголовья животных и о значительном экономическом ущербе не только для хозяйств, но и для каждой страны в целом.

В Азии, Китае, Тайване, Монголии ежегодно из-за ящура уничтожают от 100 тыс. до 500 тыс. свиней. Спонгиозная энцефалопатия крупного рогатого скота и овец, стационарно текущая в той же Англии и некоторых странах Европы, постоянно заставляет забивать подозрительный по заболеванию крупный рогатый скот 100-200 тыс. голов да плюс к этому страны и фермеры несут огромные потери от торговых барьеров на любое мясо и продукты из этих стран. В России в настоящее время основные потери составляют по крупному рогатому скоту болезни молодняка и лейкоз, из-за которых в большинстве хозяйств невозможно наращивание поголовья и получение здоровых животных.

Дескриптивная эпизоотология

Это первый, изначальный и обязательный, базовый методический элемент эпизоотологического исследования, он означает применение, главным образом, описательно-оценочных методов и приемов. Основная цель дескриптивной эпизоотологии — обоснование эпизоотологических проблем и формулировка гипотез относительно факторов риска. Описательно-оценочный характер этого элемента предусматривает четыре методических подхода. По завершении дескриптивного этапа эпизоотологического исследования должны быть собраны фактические материалы и документация в виде актов, карт, схем, таблиц, графиков и т

Эпизоотологическая диагностика - это раздел общей эпизоотологии, который изучает содержание, принципы, методы и процессы распознавания инфекционных состояний живых организмов и инфицированности неживых (абиотических) объектов, т.е. все формы проявления эпизоотического процесса, включая, в первую очередь, и все формы инфекционного и иммунного процессов. Из такого определения эпизоотологической диагностики следует, что она включает в себя три вида инфекционной диагностики :

1. диагностика инфекционных болезней всех видов животных и птиц,
2. внеморбидная диагностика инфекционных состояний организмов также всех видов животных, т.е. инфекций без патогенного проявления воздействия возбудителя (латентные болезни, иммунные состояния, персистенция и все виды носительства инфекционных агентов),

3. эпизоотологический мониторинг внешней среды, включая живые организмы и неживые объекты природы.

Практические и, особенно, научные эпизотологи используют в своей работе все три вида эпизоотологической диагностики, тогда как ветеринарные врачи чаще всего ограничиваются диагностикой инфекционных болезней животных, редко прибегая к неморбидной диагностике и еще реже - к эпизоотологическому мониторингу (в природных очагах инфекций).

Но вся инфекционная диагностика основана и проводится комплексно, т.е. с использованием различных и многочисленных методов смежных наук. Однако такой комплексной инфекционной диагностике всегда должно предшествовать комплексное эпизоотологическое исследование данной территории. Частью эпизоотологического исследования является и мониторинг местности, объемы и масштабы которого определяется ее эпизоотическим статусом. Например, в природном эпизоотическом очаге, в неблагополучной зоне и пункте или в угрожаемой и благополучной зонах объемы и глубина эпизоотологической диагностики будут различны.

Собственно диагностика инфекционных болезней животных и птицы проводится по определенным схемам и правилам. Цель и задача диагностики инфекционных болезней сводится к распознаванию инфекции в виде диагноза болезни в терминах инфекционной нозологии. Чаще всего инфекционная диагностика начинается с подозрения в заболевании животного, либо с обследования явно клинически больного животного. Весь процесс инфекционной диагностики имеет свою последовательность и этапность независимо от используемых методов (табл.8). В каждом конкретном случае диагностики инфекционной болезни обязательными этапами являются как минимум два - клинический и идентификация возбудителя либо его антигенов. При вирусных, микоплазменных или хламидиозных инфекциях, да нередко и при бактериальных и особенно хронических, когда выделить возбудителя в чистой культуре не удается или на такой анализ не дано времени, диагностику ведут по обнаружению иммунного ответа больного организма животного, т.е. по уровню специфических антител или активированных Т- и В-лимфоцитов в крови.

Вопросы для самоконтроля

1. Исторические предпосылки эпизоотологического метода.
2. Что такое дескриптивная эпизоотология?
3. Какие бывают эпизоотологические риски?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бакулов И.А. – Законы и категории эпизоотологии. – Вестник РАСХА. – № 1.- 1994.- С.44-46.
2. Эпизоотологический метод исследования, В. В. Макаров, А. В. Святковский, В. А. Кузьмин, О. И. Сухарев.

Лекция 2

РЕТРОСПЕКТИВНЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В ЭПИЗООТОЛОГИИ. ПОНЯТИЕ И ЗНАЧЕНИЕ В ДИАГНОСТИКЕ; ПУТИ РЕАЛИЗАЦИИ; СПОСОБЫ АНАЛИЗА.

2.1 Понятие и значение в диагностике;

2.2 Пути реализации;

2.3 Способы анализа

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕТРОСПЕКТИВНОЕ (RETROSPECTIVE STUDY) — исследование, которое применяется для проверки этиологических гипотез. В ретроспективном исследовании предположения о воздействии предполагаемого причинного фактора(-ов) получают из данных, отражающих свойства участников группы исследования, или из событий или опыта их в прошлом. Важная черта ретроспективного исследования: некоторые участники исследования имеют заболевание или другой исход, представляющий интерес, и их характеристики и прошлый опыт сопоставляются с характеристиками и опытом другой группы людей — не пораженных. Также можно сравнивать людей с различной тяжестью поражения. Среди эпидемиологов существует разногласие о предпочтительности использования термина ретроспективное исследование или термина исследование случай-контроль для описания этого метода.

Эпизоотологическое обследование- основной метод эпизоотологии, направленный на выяснение многообразных по-ложений и фактов, характеризующих конкретный неблагополучный пункт или зону (хозяйство, район), и особенностей проявления, распространения и ликвидации в нем заразной болезни. При эпизоотологическом обследовании необходимо использовать разнообразные методы других на-ук, включая клинический и патологоанатомический методы, бактериологические, вирусологические, серологические, аллергические, энтомологические и другие исследования.

Основой метода обследования является сбор и регистрация данных о закономерностях пространственно-зоографического распределения заболеваемости среди всех видов животных, пород животных, возрастных и зоотехнических групп, различных категорий домашних, диких и синантропных животных, а также выявление зависимости такой заболеваемости от хозяйственно-технологических и социально-экономических условий ведения животноводства (птицеводства). После этого проводят анализ структуры заболеваемости по группам и нозологическим формам с расчетом общих и частных эпизоотологических (зоометрических) показателей: заболеваемости, смертности, летальности, превалентности, инцидентности, эпизоотичности, показателей экономического ущерба и других. Эти показатели позволяют определить и оценить эпизоотическую ситуацию, эффективности проводимых или проводившихся ранее противоэпизоотических и профилактических мероприятий, а также тенденцию развития эпизоотического процесса на исследуемой территории (или в хозяйстве).

Сравнительно-исторический и сравнительно-географический приемы включают в себя сбор сведений о факторах, способствующих распространению инфекционных болезней в данной местности, о количестве и качестве эпизоотических очагов, сведения о поголовье восприимчивых животных, заболеваемости, летальности и т. д. Данные этих двух методов позволяют установить связь предыдущих эпизоотических вспышек инфекционной болезни с современной эпизоотической ситуацией, выявить повторяемость эпизоотии в определенной местности и в определенные годы (стационарность и периодичность), а также зависимость эпизоотической обстановки от природно-географических и социально-экономических условий на определенных территориях. На основании сравнительного исторического и географического описания можно судить об эволюции заразных болезней. Данные сравнительно-исторического

исследования определяются по временному и территориальному распределению инфекционной заболеваемости животных, по годовой и многолетней динамике эпизоотий с определением сезонности, периодичности или цикличности, стационарности инфекционных болезней животных на данной территории (хозяйства). Ретроспективный анализ статистических показателей заболеваемости среди животных позволяет определить гипотетические факторы эпизоотического риска, характер заболеваемости, ее связь и зависимость от природных, экологических, техногенных, хозяйственно-экономических и социальных факторов. Влияние природных и экологических факторов на эпизоотологическую или эпизоотическую обстановку на данной местности и в данное время оценивают по результатам сравнительно-географического исследования, целью которого оказывается выявление закономерностей пространственно-территориального распределения заболеваемости, ее зависимости от климатических, ландшафтных, биоценологических, социально-экономических и административно-территориальных особенностей данной местности. Конечной целью эпизоотолого-географического исследования служит выявление гипотетических кофакторов заболеваемости биотической и абиотической природы.

Тысячелетия сожительства человека с животными будь то с домашними, сельскохозяйственными, синантропными или дикими дали человеку пусть и на бытовом уровне, но опыт и знания взаимосвязи заболеваемости животных с климатом, с обилием или скудностью растительности, с водным режимом местности, с временами года, с особенностями состава почв, температуры и влажности воздуха на данной территории в различные сезоны. Такие данные необходимо фиксировать и иметь под рукой с целью определения движущих сил эпизоотического процесса, их интенсификации или ослабления (затухания) с целью определения резервуаров инфекционных агентов, путей переноса и переживания патогенных микроорганизмов в объектах биоценозов, средств и путей распространения таких микроорганизмов в разное время года и в разные года. Знание таких факторов позволяет с наибольшей вероятностью и достоверностью прогнозировать тенденцию, перспективу эпизоотической ситуации и риска. Такие проблемы и вопросы решает эколого-ландшафтная эпизоотология, которая выделилась в самостоятельный раздел теоретической эпизоотологии в последние 20-35 лет.

Эпизоотологический эксперимент — это метод исследования, направленный на моделирование естественного течения инфекционного и эпизоотического процессов конкретной болезни для познания их закономерностей и оценки эффективности противоэпизоотических мероприятий. Задачи эпизоотологического эксперимента сводятся к изучению, определению и идентификации возбудителя инфекционного заболевания, к изучению возможных и реальных механизмов передачи возбудителя среди животных, к изучению патогенеза болезни, к проверке и оценке эффективности лечебных, профилактических и противоэпизоотических мероприятий.

Необходимость проведения эпизоотологического эксперимента возникает в тех случаях, когда не удается достоверно охарактеризовать эпизоотологическую ситуацию в хозяйстве с помощью эпизоотологического обследования и клинико-лабораторных методов. В практической ветеринарии самый простой эпизоотологический эксперимент чаще всего проводится в виде так называемой биологической пробы (биопробы). Это когда ветеринарный врач заражает здоровых восприимчивых животных патологическим материалом от инфекционно больного животного, наблюдает и фиксирует начало, разгар и конец заболевания. При этом ветеринарный врач имеет возможность выделить и идентифицировать возбудителя заболевания уже от биопробных животных (а не от естественно заболевших), оценить в полной мере выраженность и последовательность развития клинических симптомов болезни, а также эффективность терапевтических и иммунобиологических средств. Биопроба как модель никогда не может воспроизвести эпизоотический процесс, а только инфекционный процесс, который является составной частью эпизоотического. Суть методического приема в эпизоотологическом эксперименте

закключается во вмешательстве в текущий эпизоотический процесс путем фиксации (например, при биопробе) или исключения предполагаемых факторов риска. Роль эпизоотолога при этом сводится к оценке роли этих факторов путем сравнения результатов вмешательства по заболеваемости и исходу болезни в опытных и контрольных группах.

Наиболее часто используется 3 варианта эпизоотологического эксперимента: когортное исследование (или контролируемый эксперимент), неконтролируемый, естественный эксперимент. При контролируемом когортном эксперименте эпизоотолог формирует в ходе эпизоотического процесса в хозяйстве равноценные группы (когорты) животных: больных, здоровых. Роль основного или ведущего фактора в развитии эпизоотического процесса оценивается по увеличению или снижению заболеваемости, гибели и выздоровления в обеих группах животных, которые к тому же обследуются клинико-лабораторными методами биохимии, микробиологии, патофизиологии. Контролируемый эксперимент позволяет установить причинно-следственные связи в текущем эпизоотическом процессе и поэтому относится к основному методу аналитической эпизоотологии. Неконтролируемый эпизоотологический эксперимент сводится к проведению и оценке эффективности или результатов противоэпизоотических мероприятий, начатых в хозяйстве независимо от того, известен диагноз заболевания или нет. При таком варианте эксперимента все животные хозяйства составляют как бы одну опытную группу и без контрольной. Только фактическая результативность проводимых мероприятий является мерилем успеха эксперимента, и одновременно эта результативность подтверждает или опровергает предполагаемые факторы эпизоотического процесса и причинно-следственных связей.

Естественный эксперимент заключается в целенаправленном анализе влияния различных или нескольких факторов влияния на естественно текущий эпизоотический (инфекционный) процесс. Ветеринарный врач или эпизоотолог не вмешивается в течение эпизоотического процесса, не влияет на него, а лишь ведет учет степени и меры воздействия нескольких отдельных факторов на данную микропопуляцию сельскохозяйственных животных по росту или снижению заболеваемости и гибели больных животных. Естественный эксперимент используется, как правило, при оценке заболеваемости эпизоотического масштаба, природно-очагового неблагополучия, а также острого или хронического влияния техногенных и антропогенных факторов токсического и дефицитного свойства на геобиоценоз данной местности.

Применение статистических методов при эпизоотологическом анализе позволяет дать исчерпывающие характеристики эпизоотологическим явлениям путем перевода абсолютных количественных показателей в так называемые интенсивные и экстенсивные относительные показатели, или эпизоотологические категории (например, заболеваемость, смертность, смертельность, инцидентность, превалентность, очаговость, индекс контагиозности и т. д.). В связи с этим учет и отчетность по инфекционным болезням имеют важное значение в противоэпизоотической работе ветеринарных врачей и органов ветслужбы.

Обязательными документами эпизоотологического исследования остаются:

1. Акты комиссионного обследования хозяйства,
2. эпизоотическая карта района,
3. эпизоотическая кривая заболеваемости (т. е. график),
4. конкретная характеристика (описание) эпизоотических очагов,
5. эпизоотические (эпизоотологические) показатели (заболеваемости, летальности, инцидентности, контагиозности, очаговости, эпизоотичности и т.д.).

Таким образом, на завершающем этапе эпизоотологического исследования используется специализированная методология аналитической и количественной эпизоотологии. Конкретным результатом комплексного эпизоотологического исследования является подробная Справка об эпизоотологической (или эпизоотической)

ситуации обследованной местности (хозяйства), в которой сформулированы основные гипотезы эпизоотологических проблем, факторы реального эпизоотологического риска и эпизоотологический прогноз. Все собранные фактические и аналитические материалы прикладываются к Справке в виде Приложений.

Таким образом, общенаучная методология, методические подходы и методы проведения эпизоотологического исследования позволяют обоснованно признать, что эпизоотология как наука является общеветеринарной наукой. Это происходит от того, что в эпизоотологическом исследовании хозяйства и территории важнейшим количественным элементом является изучение и оценка таких общих эпизоотологических параметров как: здоровье, воспроизводство и продуктивность животных, а также эпизоотологические признаки их популяций: восприимчивость, резистентность из организма к инфекционным агентам, плотность и условия их содержания (расселения), границы и контакты, экологическая обстановка и хозяйственно-экологические связи.

Кроме того, эпизоотолог проводит оценку и эпизоотологических признаков популяций возбудителя: патогенность, контагиозность, иммунногенность, а также взаимодействие этих популяций микроорганизмов с популяциями макроорганизмов (животных): заразность, инкубационный период, симптоматику болезни, тяжесть и продолжительность ее течения, постинфекционный иммунитет, признаки бессимптомного или субклинического носительства (персистенции) возбудителей в организме здоровых и переболевших животных.

Вопросы для самоконтроля

1. Способы анализа в ретроспективных методах исследования.
2. Пути реализации ретроспективных методов.
3. На чём освоен метод ретроспективного исследования?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авилов В.М. Организация государственного ветеринарного надзора в агропромышленном комплексе Москва, 1994. - 32с
2. Бакулов И.А. Роль и задачи эпизоотологии /Тез. докл. III Всесоюз. конф. по эпизоотологии. Новосибирск, 1991. - С.57
- 3.. Батуров О.В. Компьютерная база данных для оценки регионального риска проявления особо опасных инфекций / Батуров О.В., Богомолова М.Г., Константинов А.П.// Тез. докл. III Всесоюзной конф. по эпизоотологии.-Новосибирск, 1991. С. 7.
4. Башенин В.А. Курс общей эпидемиологии /М.: Л., 1936. 419с.

Лекция 3

МОРФОЛОГИЯ И СИСТЕМАТИКА БАКТЕРИЙ.

3.1 Общие понятия в систематике микроорганизмов

3.2 Основы систематики в историческом аспекте и на современном этапе развития микробиологии

3.3 Обязательные и необязательные таксоны.

Все известные живые организмы в природе можно разделить на 4 существенно отличающиеся друг от друга царства: вирусы и плазмиды, архебактерии, эубактерии и эукариоты. Архебактерии и эубактерии по признаку отсутствия оформленного клеточного ядра объединяют в группу прокариот. К ним относятся бактерии, сине-зеленые водоросли, спирохеты, актиномицеты, риккетсии и подобные им бактерии, а также микоплазмы. Простейшие, дрожжи, нитчатые грибы и все другие группы живых существ с более высоким уровнем организации, имеющие оформленное клеточное ядро, называются эукариотами.

Систематика занимается всесторонним описанием видов организмов, выяснением степени родственных отношений между ними и объединением их в различные по уровню родства классификационные единицы (таксоны). Классификация — составная часть систематики. Она сводится к распределению организмов в соответствии с их общими признаками по различным таксонам. Таксономия — наука о принципах и методах распределения (классификации) организмов в иерархическом плане. Основной таксономической единицей в биологии является вид (*species*). Виды объединяют в таксоны более высоких рангов: род (*genus*), триба (*tribus*), семейство (*familia*), порядок (*ordo*), класс (*classis*), тип (*phylum*). Помимо этих основных категорий, используются также дополнительные — подрод, подтриба, подсемейство, подпорядок, подкласс, подтип. Иногда употребляются также неформальные категории «отдел» и более общая — «группа».

Общее для всех живых существ определение понятия «вид» дать чрезвычайно трудно в связи с многообразием форм жизни. В микробиологии были предложены различные понятия вида. Н. А. Красильников, автор фундаментального труда «Определитель бактерий и актиномицетов» (1949), дал следующее определение вида: ***«Вид — группа или совокупность близких между собой организмов, которые имеют общий корень происхождения, на данном этапе эволюции характеризуются определенными морфологическими, биохимическими и физиологическими признаками, обособлены отбором от других видов и приспособлены к определенной среде обитания»***. Это определение подвергалось различными авторами модификациям. Сейчас, когда стало понятно, что степень родства бактерий, их свойства и признаки зависят от их собственных геномов, можно дать более краткое определение вида: ***Вид — совокупность микроорганизмов, имеющих общий корень происхождения, сходный генотип (степень гомологии ДНК 60 % и более, близкое суммарное содержание пар Г+Ц) и максимально близкие фенотипические признаки***.

Специфические особенности микроорганизмов определили и набор тех признаков и свойств, которые используются для их систематики и классификации.

Морфологические признаки — величина, форма, характер взаиморасположения.

Тинкториальные свойства — способность окрашиваться различными красителями. Особенно важным признаком является отношение к окраске по Грамму, которое зависит от структуры и химического состава клеточной стенки бактерий. По этому признаку все бактерии делятся на грамположительные и грамотрицательные. Морфологические свойства и отношение к окраске по Грамму определяют принадлежность к крупным

таксонам — роду, семейству и т. д.

Морфологические признаки — величина, форма, характер взаиморасположения.

Тинкториальные свойства — способность окрашиваться различными красителями. Особенно важным признаком является отношение к окраске по Грамму, которое зависит от структуры и химического состава клеточной стенки бактерий. По этому признаку все бактерии делятся на грамположительные и грамотрицательные. Морфологические свойства и отношение к окраске по Грамму определяют принадлежность к крупным таксонам — роду, семейству и т. д.

Культуральные свойства — особенности роста бактерий на жидких (образование пленки, осадок, помутнение) и плотных (форма, размеры, консистенция, края, поверхность, прозрачность колоний, образование пигмента и другие свойства) питательных средах. В микробиологии широко используют такие специфические термины, как «колония», «культура», «штамм», «типы» или «варианты». Под колонией принято понимать видимую простым глазом изолированную структуру, образующуюся в результате размножения и накопления бактерий за определенный срок инкубации. Колония образуется обычно из одной родительской клетки или из нескольких идентичных клеток. Поэтому пересевом из изолированной колонии может быть получена чистая культура возбудителя.

Под культурой понимают всю совокупность бактерий, выросших на плотной или жидкой питательной среде. Как колония, так и культура каждого вида характеризуются определенными признаками. Основной и главный принцип бактериологии — во избежание ошибок изучать свойства только чистых, однородных культур. Каждая выделенная культура данного вида бактерий называется также штаммом, т. е. конкретным образцом данного вида (*нем.* stammen — происходить). Штаммы одного и того же вида бактерий, различающиеся по антигенному строению, называют серотипами (сероварами, серовариантами), по чувствительности к фагу — фаготипами (фаговарами), по биохимическим или культуральным признакам — биотипами (биоварами) и т. п. Штамм можно считать низшей таксономической единицей бактерий.

Подвижность бактерий. Различают бактерии подвижные и неподвижные. Подвижные бактерии подразделяют на ползающие, или скользящие, они передвигаются за счет волнообразного сокращения клеток; и плавающие бактерии, у которых активная подвижность связана с наличием жгутиков.

Спорообразование — форма и характер расположения споры в клетке.

Физиологические свойства — способы углеродного (аутотрофы, гетеротрофы), азотного (аминоаутотрофы, аминокетотрофы) питания; тип дыхания: аэробы, факультативные анаэробы, строгие анаэробы, микроаэрофилы.

Биохимические свойства — способность ферментировать различные углеводы, протеолитическая активность, образование индола, сероводорода, наличие уреазы и других ферментов и т. д.

Чувствительность к специфическим бактериофагам.

Антигенные свойства. Они зависят от химического состава клеточной стенки и жгутиков бактерий.

Химический состав клеточных стенок (содержание и состав основных Сахаров и аминокислот).

Липидный и жирнокислотный состав. Изучение состава жирных кислот проводят с помощью газовой хроматографии, которая обладает высокой разделительной способностью и чувствительностью.

Белковые спектры. С помощью различных методов фракционирования, главным образом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле, разделяют смеси рибосомных, мембранных или внутриклеточных белков и получают электрофореграммы, или белковые спектры, соответствующей фракции данного вида бактерий.

В связи с тем, что количество фенотипических признаков, используемых для классификации микроорганизмов, значительно возросло, в конце 50-х гг. XX в. Возникла нумерическая (численная) таксономия. Ее возникновению способствовало появление совершенных компьютерных систем, которые позволяют быстро и точно производить громоздкие математические расчеты. В основе нумерической таксономии лежит принцип сопоставления организмов по возможно большему количеству учитываемых признаков при допущении, что все они для систематики равноценны. Однако принцип равнозначности является основным недостатком этого метода.

В последние годы для классификации бактерий помимо изучения их фенотипических свойств все более широко используют методы геносистематики. В ее основе лежит изучение нуклеотидного состава ДНК и наиболее важных характеристик генома, в частности его размера (величина, объем, молекулярная масса) и других параметров. Наиболее точным методом установления генетического (геномного) родства между бактериями является определение степени гомологии ДНК. Чем больше идентичных генов, тем выше степень гомологии ДНК и ближе генетическое родство.

Метод молекулярной гибридизации ДНК—ДНК считается сейчас наиболее важным для систематики бактерий. Однако четких и твердо установленных критериев степени гомологии ДНК для таких рангов, как вид и род бактерий, еще нет. Допускают, что диапазон гомологии ДНК от 60 до 100 % говорит о принадлежности к одному и тому же виду, степень гомологии от 40 до 60 % — к разным родам одного семейства. Таким образом, подобно тому, как фенотип и генотип отражают сущность организма, феносистематика и геносистематика отражают сходство и различие организмов, степень их генетического родства. Признаки, используемые для систематики бактерий, используют и для их идентификации, т. е. для установления их таксономического положения и прежде всего видовой принадлежности, что является решающим моментом бактериологической диагностики инфекционных заболеваний. Чаще всего для идентификации патогенных бактерий изучают их морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические и антигенные свойства, а при необходимости и некоторые другие, например отношение к специфическим фагам, антибиотикам и т. д.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие основные морфологические формы бактерий вы знаете?
2. Обязательные и необязательные таксоны.
3. Что общее между бациллами и кдлостридиями и в чем их различие?
4. Почему появилась наука систематика?
5. Какие обязательные и необязательные таксоны микроорганизмов вы знаете?
6. Как следует обозначать вид у бактерий и почему?
7. Дайте характеристику таким понятиям, как «штамм», «культура», «серовар».
8. Как вы понимаете тинкториальные свойства микроорганизмов?
9. На чем основана феносистематика и геносистематика?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Коротяев, А.И.* Медицинская микробиология, иммунология и вирусология: учебник для мед. вузов/ А.И. Коротяев, С.А. Бабичев.- СПб.: СпецЛит, 2008.- 4-е изд., испр. и доп.- 767 с.
2. *Кисленко, В.Н.* Ветеринарная микробиология и иммунология. Часть 2. Иммунология./В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев. - М.: КолосС, 2007.- 224 с.
3. *Колычев, Н.М.* Ветеринарная микробиология и иммунология.-3-е изд., перераб. и доп./Н.М. Колычев, Р.Г., Госманов.-М.:КолосС, 2006.- 422 с.

Лекция 4

МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

4.1 Световая микроскопия;

4.2 Люминесцентная микроскопия;

4.3 Электронная микроскопия: трансмиссионная и сканирующая

Микроскопические методы исследования—способы изучения различных объектов с помощью микроскопа. В биологии и медицине эти методы позволяют изучать строение микроскопических объектов, размеры которых лежат за пределами разрешающей способности глаза человека. Основу м.м.и. составляет световая и электронная микроскопия. В практической и научной деятельности врачи различных специальностей — вирусологи, микробиологи, цитологи, морфологи, гематологи и др. ,помимо обычной световой микроскопии используют фазово-контрастную, интерференционную, люминесцентную, поляризационную, стереоскопическую, ультрафиолетовую, инфракрасную микроскопию. В основе этих методов лежат различные свойства света. При электронной микроскопии изображение объектов исследования возникает за счет направленного потока электронов.

Для световой микроскопии и основанных на ней других м.м.и. определяющее значение помимо разрешающей способности микроскопа имеет характер и направленность светового луча, а также особенности изучаемого объекта, который может быть прозрачным и непрозрачным. В зависимости от свойств объекта изменяются физические свойства света — его цвет и яркость, связанные с длиной и амплитудой волны, фаза, плоскость и направление распространения волны. На использовании этих свойств света и строятся различные М.м.и. Для световой микроскопии биологические объекты обычно окрашивают с целью выявления тех или иных их свойств. При этом ткани должны быть фиксированы, т.к. окраска выявляет определенные структуры только убитых клеток. В живой клетке краситель обособляется в цитоплазме в виде вакуоли и не прокрашивает ее структуры. Однако в световом микроскопе можно изучать и живые биологические объекты с помощью метода витальной микроскопии. В этом случае применяют темнопольный конденсор, который встраивают в микроскоп.

Поляризационная микроскопия позволяет изучать объекты исследования в свете, образованном двумя лучами, поляризованными во взаимноперпендикулярных плоскостях, т.е. в поляризованном свете. Для этого используют пленчатые поляризаторы или призмы Николя, которые помещают в микроскопе между источником света и препаратом. Поляризация меняется при прохождении (или отражении) лучей света через различные структурные компоненты клеток и тканей, свойства которых неоднородны. В так называемых изотропных структурах скорость распространения поляризованного света не зависит от плоскости поляризации, в анизотропных структурах скорость его распространения меняется в зависимости от направления света по продольной или поперечной оси объекта. Если показатель преломления света вдоль структуры больше, чем в поперечном направлении, возникает положительное двойное лучепреломление, при обратных взаимоотношениях — отрицательное двойное лучепреломление. Многие биологические объекты имеют строгую молекулярную ориентацию, являются анизотропными и обладают положительным двойным преломлением света. Такими свойствами обладают миофибриллы, реснички мерцательного эпителия, нейрофибриллы, коллагеновые волокна и др. Сопоставление характера преломления лучей поляризованного света и величины анизотропии объекта позволяет судить о молекулярной организации его структуры (*рис. 2*). Поляризационная микроскопия является одним из гистологических методов исследования (Гистологические методы исследования), способом микробиологической диагностики (Микробиологическая диагностика), находит применение в цитологических исследованиях (Цитологическое

исследование) и др. При этом в поляризованном свете можно исследовать как окрашенные, так и неокрашенные и нефиксированные, так называемые нативные препараты срезов тканей.

Широкое распространение имеет **люминесцентная микроскопия**. Она основана на свойстве некоторых веществ давать свечение — люминесценцию в УФ-лучах или в сине-фиолетовой части спектра. Многие биологические вещества, такие как простые белки, коферменты, некоторые витамины и лекарственные средства, обладают собственной (первичной) люминесценцией. Другие вещества начинают светиться только при добавлении к ним специальных красителей — флюорохромов (вторичная люминесценция). Флюорохромы могут распределяться в клетке диффузно либо избирательно окрашивают отдельные клеточные структуры или определенные химические соединения биологического объекта. На этом основано использование люминесцентной микроскопии при цитологических и гистохимических исследованиях (см. Гистохимические методы исследования). С помощью иммунофлюоресценции в люминесцентном микроскопе выявляют вирусные антигены и их концентрацию в клетках, идентифицируют вирусы, определяют антигены и антитела, гормоны, различные продукты метаболизма и т.д. (*рис. 3*). В связи с этим люминесцентную микроскопию применяют в лабораторной диагностике таких инфекций, как герпес, эпидемический паротит, вирусный гепатит, грипп и др., используют в экспресс-диагностике респираторных вирусных инфекций, исследуя отпечатки со слизистой оболочки носа больных, и при дифференциальной диагностике различных инфекций. В патоморфологии с помощью люминесцентной микроскопии распознают злокачественные опухоли в гистологических и цитологических препаратах, определяют участки ишемии мышцы сердца при ранних сроках инфаркта миокарда, выявляют амилоид в биоптатах тканей и т.д.

Ультрафиолетовая микроскопия основана на способности некоторых веществ, входящих в состав живых клеток, микроорганизмов или фиксированных, но не окрашенных, прозрачных в видимом свете тканей, поглощать УФ-излучение с определенной длиной волн (400—250 нм). Этим свойством обладают высокомолекулярные соединения, такие как нуклеиновые кислоты, белки, ароматические кислоты (тирозин, триптофан, метилаланин), пуриновые и пиридиновые основания и др. С помощью ультрафиолетовой микроскопии уточняют локализацию и количество указанных веществ, а в случае исследования живых объектов — их изменения в процессе жизнедеятельности.

Инфракрасная микроскопия позволяет исследовать непрозрачные для видимого света и УФ-излучения объекты путем поглощения их структурами света с длиной волны 750—1200 нм. Для инфракрасной микроскопии не требуется предварительной химической обработки препаратов. Этот вид М.м.и. наиболее часто используют в зоологии, антропологии, других отраслях биологии. В медицине инфракрасную микроскопию применяют в основном в нейроморфологии и офтальмологии.

Для исследования объемных объектов используют **стереоскопическую микроскопию**. Конструкция стереоскопических микроскопов позволяет видеть объект исследования правым и левым глазом под разными углами. Исследуют непрозрачные объекты при относительно небольшом увеличении (до 120 раз). Стереоскопическая микроскопия находит применение в микрохирургии (Микрохирургия), в патоморфологии при специальном изучении биопсийного, операционного и секционного материала, в судебно-медицинских лабораторных исследованиях.

Для изучения на субклеточном и макромолекулярном уровнях структуры клеток, тканей микроорганизмов и вирусов используют **электронную микроскопию**. Этот М.м.и. позволил перейти на качественно новый уровень изучения материи. Он нашел широкое применение в морфологии, микробиологии, вирусологии, биохимии, онкологии, генетике, иммунологии, Резкое повышение разрешающей способности электронного микроскопа

обеспечивается потоком электронов, проходящих в вакууме через электромагнитные поля, создаваемые электромагнитными линзами. Электроны могут проходить через структуры исследуемого объекта (трансмиссионная электронная микроскопия) или отражаться от них (сканирующая электронная микроскопия), отклоняясь под разными углами, в результате чего возникает изображение на люминесцентном экране микроскопа. При трансмиссионной (просвечивающей) электронной микроскопии получают плоскостное изображение структур, при сканирующей — объемное. Сочетание электронной микроскопии с другими методами, например с радиоавтографией, гистохимическими, иммунологическими методами исследования (Иммунологические методы исследования), позволяет проводить электронно-радиоавтографические, электронно-гистохимические, электронно-иммунологические исследования.

Электронная микроскопия требует специальной подготовки объектов исследования, в частности химической или физической фиксации тканей и микроорганизмов. Биопсийный материал и секционный материал после фиксации обезживают, заливают в эпоксидные смолы, режут стеклянными или алмазными ножами на специальных ультратомах, позволяющих получать ультратонкие срезы тканей толщиной 30—50 нм. Их контрастируют и затем изучают в электронном микроскопе. В сканирующем (растровом) электронном микроскопе изучают поверхность различных объектов, напыляя на них в вакуумной камере электронно-плотные вещества, и исследуют так называемые реплики, повторяющие контуры образца.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое люминесцентная микроскопия. На чём она основана?
2. В каких случаях она применяют?
3. Электронная микроскопия?
4. Основные виды электронной микроскопии?
5. Дать понятие трансмиссионной и сканирующей микроскопии?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дюков В.Г., Непийко С.А., Седов Н.Н. Электронная микроскопия локальных потенциалов./ АН УССР. Ин-т физики. – Киев: Наук. думка, 1991. – 200 с.
2. Ч. Пул, Ф. Оуэнс Нанотехнологии: Пер. с англ./Под ред. Ю. И. Головина. – М.: Техносфера, 2005. – 336 с
3. Спенс Дж. Экспериментальная электронная микроскопия высокого разрешения: Пер. с англ./Под ред. В. Н. Рожанского. – М.: Наука. Гл. ред. физ.-мат. Лит., 1986. – 320 с., ил.
4. Томас Г., Горинж М. Дж. Просвечивающая электронная микроскопия материалов: Пер. с англ./Под ред. Б.К. Вайнштейна – М: Наука. Главная редакция физико-математической литературы, 1983 – 320с

Лекция 5 МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

5.1 Атомно-силовая микроскопия;

5.2 Фазово-контрастная микроскопия;

5.3 Интерференционная микроскопия.

Для исследования живых и неокрашенных биологических объектов используют фазово-контрастную микроскопию. Она основана на дифракции луча света в зависимости от особенностей объекта излучения. При этом изменяется длина и фаза световой волны. Объектив специального фазово-контрастного микроскопа содержит полупрозрачную фазовую пластинку. Живые микроскопические объекты или фиксированные, но не окрашенные микроорганизмы и клетки из-за их прозрачности практически не изменяют амплитуду и цвет проходящего через них светового луча, вызывая лишь сдвиг фазы его волны. Однако, пройдя через изучаемый объект, лучи света отклоняются от полупрозрачной фазовой пластинки. В результате между лучами, прошедшими через объект, и лучами светового фона возникает разность длины волны. Если эта разность составляет не менее $\frac{1}{4}$ длины волны, то появляется зрительный эффект, при котором темный объект отчетливо виден на светлом фоне или наоборот в зависимости от особенностей фазовой от пластинки.

Фазово-контрастная микроскопия

Самым главным достоинством фазово-контрастного метода микроскопирования живых неокрашенных микроорганизмов является чёткое и контрастное их изображение. Данный способ изучения наиболее приемлем для исследований в клинических лабораториях для изучения различного рода выделений и осадков, простейших, их цист, процессов агглютинации, рассмотрение ретикулоцитов, а также кровяных пластинок, костного мозга качественных и злокачественных опухолей и прочее.

Для того чтоб понять сущность и принцип работы фазово-контрастного метода необходимо знать, что фотоплёнка и человеческий глаз способен воспринимать исключительно изменения амплитуды, то есть размахи колебаний световой волны, однако они не восприимчивы к изменениям её фазы, задержкам или ускорениям.

Все препараты, которые наблюдались в микроскопах в тех частях, где были смещения амплитуды световых волн, являются контрастными, а там, где присутствовали фазовые смещения, были малоконтрастные. Используя фазово-контрастные приспособления микроскопа, существующие фазовые неконтрастные колебания искусственно конвертируются в колебания с другой амплитудой, из-за чего фазовые элементы препарата становятся такими же контрастными, как и амплитудные. Вследствие этого изображение всего исследуемого объекта становится чётким и контрастным.

Для достижения подобного результата можно использовать обычный микроскоп МБИ – 2, а также специальный к нему набор фазово-контрастных приборов, в состав которых входят: конденсатор с комплектом кольцевых диафрагм, комплект фазовых объективов (10X, 20 X, 40 X и 90X), вспомогательный микроскоп малой степени увеличения, который используется вместо окуляра, осветитель и светофильтр.

Как правило, обычный конденсатор микроскопа заменяют фазовым и при этом необходимо проверить, чтоб этот конденсатор правильно и точно вошёл в держатель, и в процессе подъёма его передняя линза становилась вровень с предметным столиком микроскопа. Объективы также необходимо заменить на фазовые.

Для начала следует установить правильное освещение для объекта. Для этого осветительную лампу ставят на расстоянии пятнадцати-двадцати сантиметров от самого микроскопа, сужают диафрагму осветителя и направляют лучи на поверхность плоского зеркала, таким образом, чтоб точное и отчётливое изображение накаленной нити лампы оказалось в самом центре зеркала. Зеркало двигают, отбрасывая свет на поверхность диафрагмы конденсатора, которую затем полностью открывают.

Если увеличение слишком маленькое и его не достаточно, то в таких случаях устанавливают препарат для излучения. Опуская и поднимая конденсатор, выходит наиболее резкое изображение препарата при условии закрытой диафрагмы осветителя. Если же поле зрения всё-таки оказывается слишком освещённым, в таких случаях ставят дополнительный светофильтр. С помощью лёгких передвижений зеркал ярко освещённое пятно двигают в центр поля зрения и затем открывают диафрагму осветителя, таким образом, чтоб все поля зрения были полностью и равномерно освещены. На этом этапе заканчивается установка света.

Вместо окуляра устанавливают вспомогательный микроскоп. Ставят также тот фазовый объектив, который будут использовать и соответствующую ему кольцевую диафрагму конденсатора. При передвижении окулярной части вспомогательного микроскопа изучают изображение кольцевой щели диафрагмы конденсатора, то есть светлое кольцо, а также изображение фазовой пластинки в объективе – тёмное кольцо, для того, чтоб узнать, насколько совмещены эти два изображения.

Для того чтоб получить фазовый контраст нужно более полно совместить изображения этих двух колец. Данный процесс выполняется с помощью центрировочных винтов фазового конденсатора, благодаря которым щель конденсорной диафрагмы движется настолько, чтоб её изображение совместилось с изображением фазовой тёмной пластинки. Вспомогательный микроскоп достают из тубуса и устанавливают на его месте рабочий окуляр, после чего изучают необходимый объект.

Стоит также отметить основные условия успешного процесса подготовки фазово-контрастного исследования:

- Правильное расположение света;
- Полностью открытая диафрагма фазового конденсатора;
- Полное соответствие номера кольцевой диафрагмы фазового конденсатора относительно увеличению фазового объектива;
- Тщательное совмещение тёмного изображения фазовой пластинки, а также светлого изображения кольцевой диафрагмы при помощи вспомогательного микроскопа.

Разновидностью фазово-контрастной микроскопии является амплитудно-контрастная, или аноптральная микроскопия, при которой применяют объектив со специальными пластинками, изменяющими только яркость и цвет фонового света. В результате расширяются возможности исследования живых неокрашенных объектов. Фазово-контрастная микроскопия находит применение в микробиологии и паразитологии при исследовании микроорганизмов, простейших, клеток растений и животных; в гематологии для подсчета и определения дифференцировки клеток костного мозга и крови; а также при изучении клеток культуры тканей и т.п.

Интерференционная микроскопия решает те же задачи, что и фазово-контрастная. Но если последняя позволяет наблюдать лишь контуры объектов исследования, то с помощью интерференционной микроскопии можно изучать детали прозрачного объекта и проводить их количественный анализ. Это достигается благодаря раздвоению луча света в микроскопе: один из лучей проходит через частицу наблюдаемого объекта, а другой мимо

нее. В окуляре микроскопа оба луча соединяются и интерферируют между собой. Возникающую разность фаз можно измерить, определив т. о. массу различных клеточных структур. Последовательное измерение разности фаз света с известными показателями преломления дает возможность определять толщину живых объектов и нефиксированных тканей, концентрацию в них воды и сухого вещества, содержание белков и т.д. На основании данных интерференционной микроскопии можно косвенно судить о проницаемости мембран, активности ферментов, клеточном метаболизме объектов исследования.

Атомно-силовой микроскоп - сканирующий зондовый микроскоп высокого разрешения. Используется для определения рельефа поверхности с разрешением от десятков ангстрем вплоть до атомарного. В отличие от сканирующего туннельного микроскопа, с помощью атомно-силового микроскопа можно исследовать как проводящие, так и непроводящие поверхности.

Для определения рельефа поверхностей непроводящих тел использовалась упругая консоль (кантилевер), отклонение которой, в свою очередь, определялось по изменению величины туннельного тока, как в сканирующем туннельном микроскопе[1]. Однако такой метод регистрации изменения положения кантилевера оказался не самым удачным, и двумя годами позже была предложена оптическая схема: луч лазера направляется на внешнюю поверхность кантилевера, отражается и попадает на фотодетектор[2]. Такой метод регистрации отклонения кантилевера реализован в большинстве современных атомно-силовых микроскопов.

Принцип работы атомно-силового микроскопа основан на регистрации силового взаимодействия между поверхностью исследуемого образца и зондом. В качестве зонда используется наноразмерное остриё, располагающееся на конце упругой консоли, называемой кантилевером. Сила, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу консоли. Появление возвышенностей или впадин под остриём приводит к изменению силы, действующей на зонд, а значит, и изменению величины изгиба кантилевера. Таким образом, регистрируя величину изгиба, можно сделать вывод о рельефе поверхности.

Вопросы для самоконтроля

1. Где находит применение фазово-контрастная микроскопия?
2. Что является разновидностью фазово-контрастной микроскопии?
3. На чем основана атомно-силовая микроскопия?
4. Что такое интерференционная микроскопия?
5. Какие разновидности АСМ вы знаете?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Малая медицинская энциклопедия. — М.: Медицинская энциклопедия. 1991—96 гг.
2. Первая медицинская помощь. — М.: Большая Российская Энциклопедия. 1994 г.
3. Энциклопедический словарь медицинских терминов. — М.: Советская энциклопедия. — 1982—1984 гг...
4. Рашкович Л.Н. Атомно-силовая микроскопия процессов кристаллизации в растворе // Соросовский образовательный журнал, 2001, №10, с. 102-108.

Лекция 6

РАЗВИТИЕ ИММУНОЛОГИИ И ВИДЫ ИММУНИТЕТА.

6.1 Основные этапы развития иммунологии и её задачи.

6.2 Определение понятия иммунитета и его виды.

6.3 Иммунологическая толерантность.

6.4 Аллергия.

С конца 18 века Дженнер начал прививать людей коровьей оспой. Научно обоснованные методы профилактики инфекционных болезней были разработаны Луи Пастером в конце 19 века. Основу иммунологии как науки заложили русский учёный И.И.Мечников и Пауэль Эрлих. Большой вклад в профилактику и диагностику различных инфекционных заболеваний внесли отечественные учёные: Ценковский Л.С., Габричевский Г.Н., Гельман Х.И., Кальман О.Г., Михин Н.А. На сегодняшний день задачами практической иммунологии являются:

- изучение закономерностей формирования устойчивости организма к инфекционным болезням;
- разработка и совершенствование методов иммунологической диагностики инфекционных болезней;
- создание биопрепаратов (вакцин и сывороток) для специфической профилактики и лечения инфекционных болезней.

Иммунитет - это способ защиты от живых тел и веществ, несущих в себе признаки генетической чужеродности. Система органов и клеток, осуществляющие реагирование против чужеродных субстанций называется иммунной системой.

По происхождению различают виды иммунитета.

1. Врождённый иммунитет.
2. Приобретённый естественно активный иммунитет.
3. Приобретённый естественно пассивный иммунитет (плацентарный, кластральный иммунитет).
4. Приобретённый искусственно активный иммунитет.
5. Приобретённый искусственно пассивный иммунитет

По направленности действия иммунитет бывает следующих видов.

1. Антибактериальный иммунитет.
2. Антивирусный иммунитет.
3. Антитоксический иммунитет.
4. Иммунитет при протозойных заболеваниях.
5. Иммунитет при гельминтозных заболеваниях.

По стерильности иммунитет делится на два вида.

1. Стерильный иммунитет.
2. Нестерильный иммунитет.

Иммунологическая толерантность — состояние организма, при котором иммунная система устойчиво воспринимает чужеродный антиген, как собственный и не отвечает на него. Толерантность — то есть неотвечаемость, терпимость.

Ауто толерантность — это естественная иммунологическая толерантность организма к собственным тканям, формирующаяся в результате эмбрионального развития. Ф. М. Бернет впервые сформулировал представление о «своём» и «не своём» в рамках иммунологии. В соответствии с его представлениями «своё» с точки зрения иммунной

системы организма — это комплекс макромолекул, который находился в контакте с иммунной системой в период её становления. Незрелые лимфоциты реагируют на связывание их антигенраспознающего рецептора не активацией, как зрелые клетки, а гибелью. В результате в процессе онтогенеза происходит гибель (делекция) клонов, специфичных к аутоантителам (чувствительных к собственным тканям).[1] Нарушение иммунной толерантности к собственным антигенам приводит к развитию аутоиммунных заболеваний.

Толерантность — альтернатива индукции иммунного ответа. Развивается в следствие введения высоких доз белков или полисахаридов, обладающих мономерностью и безагрегантностью (для чего белковые растворы подвергаются ультрацентрифугированию), а также имеющих относительно низкую молекулярную массу и высокую эпитопную плотность. То есть одни и те же вещества могут выступать, как в качестве иммуногенов, так и в противоположном качестве — толерогенов. Так же важную роль в развитии отсутствия иммунного ответа играет наличие у иммунных клеток необходимого рецепторного аппарата (см. ниже).[2]

Иммунологическую толерантность так же нельзя путать с иммунологической супрессией, при которой подавляется уже состоявшийся иммунный ответ (например, физиологическая иммуносупрессия развивающаяся в определённое время после начала инфекционного заболевания). При толерантности продуктивная активация антигенспецифичного клона лимфоцитов и не начинается. При супрессии продуктивная активация клона начинается, реализуется, затем подавляется. Механизмы супрессии по названию те же, что и механизмы толерантности — делекция клона апоптозом или ингибция внутриклеточного метаболизма сигналами с тормозных рецепторов (имеющих ITIM), но происходят эти два процесса (толерантность и супрессия) совсем на разных этапах лимфопоэза и иммуногенеза лимфоцитов, следовательно, по крайней мере они нетождественны.[4]

Аллергия – «неправильная», повышенная реакция иммунной системы животного на какие-либо вещества. Большинство аллергий имеет наследственную предрасположенность. Вещества, которые у обычных животных просто удаляются из организма, у аллергиков вызывают воспалительный процесс

Аллергия строго специфична, т.е. возникает строго на определенные вещества, и, как правило, слабо зависит от количества этого вещества, попавшего в организм. Например, при пищевой аллергии достаточно маленького кусочка для возобновления процесса.

Существует несколько видов аллергий, наиболее распространенные у животных – аллергия на слюну блох, аллергия на вещества внешней среды и пищевая аллергия.

Аллергия на слюну блох – самая частая, но при этом часто недооценивается, так как при этом на животном может не быть обнаружено блох. Дело в том, что для возникновения аллергической реакции достаточно одного укуса блохи, аллергия развивается на ее слюну, а укусить блоха может просто во время прогулки. Этим объясняется тот факт, что часто животные, живущие вместе и имеющие блох, чешутся по-разному – у одних развивается аллергическая реакция, у других – нет.

Пищевая аллергия – самая редкая. Для развития пищевой аллергии иммунной системе требуется время, всегда разное, поэтому неверно думать, что пищевая аллергия возникает на новые продукты. Наоборот, белки, абсолютно новые для животного, наименее вероятно вызовут какую-либо реакцию и поэтому используются для диагностики. Чаще всего аллергия развивается на белок – мясо. Аллергия строго индивидуальна – у одного – на говядину, у другого – рыбу.

Аллергия на вещества внешней среды (атопический дерматит) – вторая по распространенности аллергия после блошиной. Обычно первые проявления этой аллергии появляются в возрасте от 10 мес. до 3 лет. Вещества, вызывающие ее, могут быть самыми

разными – пыльца, домашняя пыль, плесень. Достаточно «микродоз» для возникновения реакции. Поскольку мы не можем изолировать животное от внешней среды, этот тип аллергии нуждается в пожизненном лечении. Мы не можем вылечить аллергию, но в большинстве случаев, мы можем подобрать лечение для того, чтобы сделать жизнь животного достаточно комфортной.

Признаки аллергии. К сожалению, признаки всех типов аллергий очень схожи – это зуд, краснота, расчесы. Сыпь, как правило, говорит не об аллергии, а о вторичном присоединившемся бактериальном воспалении. Для блошиной аллергии более характерно поражение спины, крупа и хвоста. Отличить пищевую аллергию от аллергии на внешние вещества по внешним признакам невозможно. Явное сезонное течение аллергии более характерно для атопического дерматита и аллергии на блох.

Диагностика аллергии. Диагноз «аллергия» устанавливается на основании клинических признаков и исключения других причин зуда (паразитов). Не существует анализа, подтверждающего аллергию.

Поскольку клинические признаки всех аллергий очень схожи, диагностика, принятая в дерматологии во всем мире, проводится путем последовательного исключения одной за другой аллергий. Поскольку мы не можем точно доказать у животного аллергию на внешние вещества, мы последовательно исключаем аллергию на блох и пищевую аллергию. При этом для исключения пищевой аллергии проводится специальное диагностическое питание не менее 6-8 недель, для которого используются абсолютно новые для животного продукты. Важно понимать, что даже очень маленький кусочек лакомства в этот период может возобновить проблему и помешать установить верный диагноз. В мире не существует ни одного анализа, достоверно показывающего – на какой продукт у животного пищевая аллергия. Это можно выяснить только диагностической диетой.

Животные с любым типом аллергии очень склонны к развитию вторичного бактериального и/или грибкового воспаления, поэтому часто нуждаются в дополнительном антибактериальном и/или антигрибковом лечении.

Вопросы для самоконтроля

1. Какую роль сыграли в развитии иммунологии такие учёные, как Дженнер, Пастер, Мечников, Эрлих?
2. Раскройте роль отечественных учёных в становлении иммунологии в России.
3. Укажите виды иммунитета по происхождению.
4. Укажите виды иммунитета по направленности его действия, механизму проявления, стерильности, специфичности.
5. Аллергия, виды аллергии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология: Ч. 2 Иммунология: Учеб. пособие / В.Н. Кисленко. - М.: КолосС, 2007. – 224 с.
2. Руководство по микробиологии и иммунологии: Учеб. пособие / Н.М. Колычев [и др.] - Новосибирск: АРТА, 2010. - 256 с.
3. Иммунология: Учебник / Е.С. Воронин [и др.] – М.: Колос-пресс, 2002. - 408 с.
4. Колычев, Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология: Учебник / Н.М. Колычев, Р.Г. Гросманов - М.: КолосС, 2003. – 432 с.
5. Ройт, А. Иммунология: Пер. с англ. / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. – М.: Мир, 2000. – 592 с.
6. Хаитов, Р.М. Иммунология: Учебник / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович. - М.: Медицина, 2000. - 432 с.

УСЛОВИЯ И СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ

7.1 Питательные среды.

7.2 Понятия культура, штамм, клон.

7.3 Фазы развития культуры.

7.4 Размножение микроорганизмов.

7.5 Биопленки.

Питательные среды

В микробиологической практике существует много самых разнообразных питательных сред. В зависимости от их свойства, состава и назначения питательные среды можно разделить на несколько групп.

По происхождению различают: а) естественные питательные среды и б) искусственные питательные среды.

К первым относятся сыворотка крови, желчь, яйца, молоко, картофель, морковь. Ко вторым — питательные среды, приготовленные из мясных или растительных настоек, к которым добавляют различные азотистые продукты, углеводы и соли, например мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар и т. д.

По консистенции среды разделяют на плотные, полужидкие и жидкие. К плотным средам относится мясо-пептонный агар, питательная желатина, свернутая сыворотка, свернутый яичный белок, картофель и др. Полужидкой питательной средой является 0,5% мясо-пептонный агар. К жидким средам относится мясопептонный бульон, пептонная вода, сахарный бульон и др.

По составу все питательные среды могут быть разделены на три группы:

среды основные, или простые, употребляемые для выращивания большинства патогенных микробов (мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар, мясопептонная желатина и др.);

среды специальные, или селективные, применяемые для выделения и выращивания определенных патогенных бактерий, которые на обычных средах плохо или совсем не растут (сахарный бульон, желчный бульон, агар с кровью и др.);

среды дифференциально-диагностические, служащие одним из вспомогательных средств при определении (идентификации) чистой культуры исследуемого микроорганизма (углеводы пестрого ряда Гисса, агар Эндо и др.).

Понятия культура, штамм, клон.

Чистая культура. Совокупность однородных микроорганизмов, выделенных на питательной среде, характеризующихся сходными морфологическими, тинкториальными (отношение к красителям), культуральными, биохимическими и антигенными свойствами, называется чистой культурой.

Штамм. Чистая культура микроорганизмов, выделенных из определенного источника и отличающихся от других представителей вида, называется штаммом. Штамм — более узкое понятие, чем вид или подвид.

Клон. Близким к понятию штамма является понятие клона. Клон представляет собой совокупность потомков, выращенных из единственной микробной клетки.

Для обозначения некоторых совокупностей микроорганизмов, отличающихся по тем или иным свойствам, употребляется суффикс *var* (разновидность) вместо ранее применявшегося *type*.

Фазы развития бактериальной популяции.

Бактерии размножаются преимущественно простым поперечным делением (вегетативное размножение), которое происходит в различных плоскостях, с образованием многообразных сочетаний клеток (кисть винограда — стафилококки, цепочки — стрептококки, соединения по парам — диплококки, тьюки, пакеты — сарцины и др.).

Процесс размножения культуры микробов на несменяемой среде протекает не-равномерно. В нем *определяют четыре основные фазы.*

1. Начальная фаза (лаг-фаза), или фаза покоя. В это время культура приспосабливается к питательной среде. В микробной клетке увеличивается содержание РНК и с ее помощью происходит синтез необходимых ферментов.

2. Экспоненциальная (логарифмическая) фаза характеризуется максимальным увеличением клеток в культуре, оно идет в геометрической прогрессии (1, 2, 4, 8, 16, 256 и т. д.). В это время в среде большинство молодых и биологически активных клеток. В конце фазы, когда среда истощается, исчезают необходимые для данного микроба вещества, уменьшается количество кислорода, происходит увеличение продуктов обмена — рост культуры замедляется. Кривая постепенно принимает горизонтальное направление.

3. Стационарная фаза, или период зрелости, графически представляет линию, идущую параллельно оси абсцисс. Наступает равновесие между числом вновь образованных и погибших клеток. Уменьшается количество среды, увеличивается плотность клеток в популяции, усиливается токсическое действие продуктов обмена — все это обуславливает гибель клеток.

4. Фаза отмирания. В этой фазе наблюдается не только уменьшение, но и изменение клеток. Появляются деградированные формы, а также споры. Через несколько недель или месяцев культура погибает. Так происходит потому, что ядовитые продукты жизнедеятельности не только тормозят, но и убивают микробные клетки.

Таким образом, благодаря процессам метаболизма, поддерживается жизнедеятельность микробной клетки. Для дыхания аэробом необходим кислород, анаэробы используют нитратное, сульфатное дыхание и брожение. Микроорганизмы усваивают органические и неорганические вещества из внешней среды, окисляя которые получают необходимую энергию и пластические элементы. В результате происходит рост клетки. Достигнув необходимой стадии зрелости происходит размножение клетки простым делением. В процессе своей жизнедеятельности микроорганизмы постепенно расходуют питательные вещества, выделяя в окружающую среду свои метаболиты, изменяя тем самым состав среды и делая ее непригодной для жизни.

Биоплёнки - это высокоорганизованные, подвижные, непрерывно изменяющиеся гетерогенные сообщества, состоящие как из активно функционирующих клеток, так из покоящихся форм, заключенных в экзополимерный матрикс. Они могут состоять из одного или, что встречается более часто, из нескольких видов микроорганизмов. Ранее считалось, что биоплёнки образуются только на изделиях медицинского назначения, таких как катетеры, эндотрахеальные трубки, внутриматочные спирали, контактные линзы. В настоящее время установлено, что биоплёнки являются основными факторами патогенеза заболеваний, характеризующихся хроническим воспалением. Их

обнаруживают более чем в 80 % хронических инфекционных и воспалительных заболеваний, что позволило выдвинуть концепцию хронических болезней как болезней биоплёнок. Образование биоплёнок - это сложный комплексный динамический процесс, состоящий из нескольких этапов: адгезии клеток на поверхности и перераспределения клеточной массы; активного деления клеток для создания клеточных кластеров; образования экзополимерного слизистого матрикса. Изначальное прикрепление микробной клетки к поверхности субстрата осуществляется за счёт действия электростатических, гидрофобных сил, сил Ван дер Ваальса, неспецифической адгезии. Адгезия к биологическим поверхностям обуславливается специфическим взаимодействием белков-адгезинов или лектинов фимбрий экзоплазматического компартмента бактериальной клетки с рецепторами или определенными доменами поверхности мембран клеток-мишеней. Механизм адгезии грамположительных бактерий отличается от механизма адгезии грамотрицательных. Так, например, важнейшим элементом в процессе адгезии стафилококков является полисахарид (Polysaccharide Intercellular Adhesin - PIA), который участвует как в клеточной субстратной адгезии, так и в последующем формировании клеточных кластеров. У грамотрицательных микроорганизмов важную роль в адгезии и клеточной агрегации играют жгутики и фимбрии IV типа. Движение, обусловленное жгутиками, способствует распространению и образованию клеточного монослоя на субстрате, а фимбрии IV типа участвуют в клеточной агрегации за счёт лектинового взаимодействия. По мере размножения бактерий они более прочно прилипают к поверхности, дифференцируются, обмениваются генами, что обеспечивает их выживаемость.

Вопросы для самоконтроля

1. Что такое микроорганизмы, размножения?
2. Какие бывают питательные среды.
3. Понятия культура, штамм, клон.
4. Фазы развития культуры.
5. что такое биопленки, их функция?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Афиногенова А. Г. Микробные биопленки ран: состояние вопроса / А. Г. Афиногенова, Е. Н. Даровская // Травматология и ортопедия России. - 2011. - № 3(61). - С. 119-125.
2. Влияние бигуанидов на формирование стрептококковой биопленки на модели культуры клеток фибробластов кожи эмбриона человека / А. Г. Афиногенова, К. Б. Грабовская, Е. В. Кулешевич и др. // Инфекции в хирургии. - 2011. - № 1. - С. 3-11.
3. Гостев В. В. Бактериальные биопленки и инфекции / В. В. Гостев, С. В. Сидоренко // Журнал инфектологии. - 2010. - Т. 2. - № 3. - С. 4-15.
4. Микробиологические аспекты хирургической патологии билиарной системы / В. А. Черкасов, Н. А. Зубарева, П. Я. Сандаков, Э. С. Горовиц // Вестник хирургии. - 2003. - Т. 162, № 2. - С. 109-113.
5. Михайлова Е. С. Микробиоценозы эзофагогастроуденальной зоны у больных с патологией желчевыводящих путей: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е. С. Михайлова. - М., 2009. - 24 с.
6. Серова Е. В. Профилактика постхолецистэктомического синдрома у больных острым калькулезным холециститом: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Е. В. Серова. - Красноярск, 2010. - 25 с.

Лекция 8

НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУНИТЕТ И ИММУННАЯ СИСТЕМА.

8.1 Неспецифические факторы защиты организма.

8.2 Клеточные специфические факторы защиты организма и иммунная система

Иммунитет - это способ защиты организма от живых тел и веществ, несущих на себе признаки чужеродной генетической информации. Система организма, выполняющая эту функцию, называется иммунной системой. Она представлена всеми видами лейкоцитов: лимфоцитами, моноцитами, макрофагами, нейтрофилами, базофилами, эозинофилами, а также органами, в которых происходит развитие лейкоцитов: костный мозг, тимус, селезенка, лимфатические узлы.

Неспецифический- направленный против любого чужеродного вещества (антигена). Он проявляется в виде гуморального, за счет продукции бактерицидных веществ, и клеточного, в результате которого осуществляется фагоцитоз и цитотоксический эффект.

Неспецифический иммунитет.

Удаление любых чужеродных в генетическом отношении тел, частиц осуществляется гуморальными и клеточными механизмами. Гуморальные механизмы предоставлены такими факторами как фибронектин, лизоцим, интерфероны, система комплемента и другими.

Фибронектин является белком, который способен присоединяться к чужеродным частицам, клеткам, микроорганизмам, в результате чего облегчается последующий этап инактивации этих чужеродных тел - фагоцитоз. Фибронектин продуцируется макрофагами, эндотелием, гладкомышечными клетками, астроглией, шванновскими клетками, энтероцитами, гепатоцитами и другими клетками. Обладает высоким сродством к фибрину, актину, гепарину.

Лизоцим является ферментом, который продуцируется нейтрофилами и макрофагами. Он разрушает мембраны бактерий, способствуя их лизису. Этот фермент содержится не только в крови, но и в слюне, чем объясняется бактерицидность слюны. Определение активности лизоцима является одним из способов оценки состояния неспецифического иммунитета.

Интерфероны - белки, продуцируемые нейтрофилами и моноцитами. За счет торможения синтеза белка в клетках, содержащих вирусы, они блокируют размножение вирусов, в том числе опухолеродных. У человека выделены десятки видов интерферонов.

Неспецифические факторы защиты организма делятся на 3 группы.

А. Анатомо-физиологические факторы неспецифического иммунитета.

1. Кожа и слизистые оболочки.
2. Секреты желёз пищеварительного тракта и глаз.
3. Воспаление.
4. Лимфатическая система.
5. Повышение температуры.
6. Повышение моче- и потоотделения.
7. Диарея.

Б. Гуморальные факторы неспецифического иммунитета.

1. Нормальные антитела.
2. Лизоцим.
3. Пропердин.
4. Лизины.
5. Лактоферрин.

6. Комплемент.
 7. Интерферон.
 8. Стресс.
- В. Клеточные факторы неспецифического иммунитета.
1. Микрофаги.
 2. Макрофаги.
 3. Опсонины.

Клеточные специфические факторы защиты организма и иммунная система.

Специфическая защита организма направлена на уничтожение какого-либо конкретного антигена. Она осуществляется комплексом специальных форм реагирования иммунной системы. К этим формам относятся: антителообразование, иммунный фагоцитоз, киллерная функция лимфоцитов, аллергические реакции, протекающие в виде гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ) и гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), иммунологическая память и иммунологическая толерантность.

Основными клетками, которые обеспечивают неспецифическую и специфическую защиту организма от чужеродных веществ, являются фагоцитирующие клетки, Т- и В-лимфоциты, антитела, комплемент, интерфероны, ферменты. Эти все клетки участвуют в иммунных реакциях макроорганизма. В зависимости от природы антигена на каждом из этапов защиты включаются наиболее эффективные формы реагирования и иммунореагенты. Например, для обезвреживания столбнячного и дифтерийного токсинов основную роль играют антитела (антитоксины), для предохранения от живых бактерий — фагоцитоз. Для противодействия клеткам злокачественных опухолей — цито-токсические Т-лимфоциты.

Результатом взаимодействия антигена с организмом человека является формирование специфической невосприимчивости организма (иммунитет), иммунологическая память к данному антигену, толерантность (терпимость) к антигену. Неблагоприятным последствием является приобретение повышенной чувствительности к антигену (аллергия).

Иммунитет — антибактериальный, антивирусный, антитоксический и т. д. — обеспечивает иммунная система в целом.

Иммунная система подразделена на центральные и периферические органы. В периферических органах происходит адекватный иммунный ответ на присутствие антигенов. Селезенка — орган, через который фильтруется кровь. Селезенка находится в левой подвздошной области и имеет дольчатое строение. Лимфоидные скопления заселены Т-, В-лимфоцитами и плазматическими клетками. Лимфоциты распознают генетически чужеродные молекулы и клетки, участвуют в регуляции иммунного ответа, формировании гуморального и клеточного иммунитета.

Иммунная система состоит из лимфоидных органов и лимфоцитов.

К основным органам относят:

- 1) костный мозг;
- 2) тимус;
- 3) фабрициеву сумку.

К периферическим органам относят:

- 1) селезенку;
- 2) лимфатические узлы;
- 3) пейеровы бляшки кишечника;
- 4) кровь.

Классы лимфоцитов:

- а) Т-лимфоциты:
 - 1) Т-хелперы;

- 2) Т-киллеры;
- 3) Т-амплифайеры;
- 4) Т-супрессоры;
- 5) Т-клетки иммунной памяти;
- б) В-лимфоциты:
 - 1) плазматические клетки;
 - 2) В-амплифайеры;
 - 3) В-супрессоры.

Антитела вырабатываются макроорганизмом при попадании в него чужеродных агентов — антигенов. Антитела относятся к глобулиновой фракции крови, поэтому их еще называют иммуноглобулинами и обозначают символом γ . Антитела синтезируются плазматическими клетками. Ig относятся к факторам специфического гуморального иммунитета: инактивируют токсины; в комплексе с комплементом препятствуют проникновению вирусов и лизируют бактерии; активизируют фагоцитоз; участвуют в аллергических реакциях; участвуют в деструкции гельминтов.

В плазме крови содержится около 5 % белков — из них 3% составляют иммуноглобулины. Иммуноглобулины различаются по структуре, антигенному составу и по выполняемым ими функциям. По этим свойствам они разделены на 5 классов: IgG, IgM, IgA, IgE, IgD. Ig обнаруживаются в сыворотке крови в таких количествах: IgG — 7—20 гл, IgA — 0,7—5 гл; IgM — 0,5—2 гл; IgD и IgE — очень мало.

Вопросы для самоконтроля

1. Опишите анатомио-физиологические факторы неспецифического иммунитета.
2. Раскройте гуморальные факторы неспецифического иммунитета.
3. Дайте определение фагоцитозу. Какие клетки и вещества участвуют в этом процессе?
4. Опишите органы иммунной системы животных и их функцию.
5. Дайте характеристику клеткам иммунной системы животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология: Ч. 2 Иммунология: Учеб. пособие / В.Н. Кисленко. - М.: КолосС, 2007. - 224 с.
2. Руководство по микробиологии и иммунологии: Учеб. пособие / Н.М. Колычев [и др.] - Новосибирск: АРТА, 2010. - 256 с.
3. Ветеринарная микробиология и иммунология: Учебник / Н.А. Радчук [и др.] - М.: Агропроиздат, 1991. - 383 с.
4. Журнал "Микробиология, эпидемиология и иммунология".
5. Иммунология: Учебник / Е.С. Воронин [и др.] - М.: Колос-пресс, 2002. - 408 с.
6. Колычев, Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология: Учебник / Н.М. Колычев, Р.Г. Гросманов - М.: КолосС, 2003. - 432 с.
7. Ройт, А. Иммунология: Пер. с англ. / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. - М.: Мир, 2000. - 592 с.
8. Хаитов, Р.М. Иммунология: Учебник / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович. - М.: Медицина, 2000. - 432 с.

Лекция 9

НОВЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В БАКТЕРИОЛОГИИ.

9.1 Ускоренный культурально - морфологический метод установления влияния химических веществ на микроорганизмы;

9.2 Посев на L -формы микобактерий;

9.3 Системы ВАСТЕС.

Ускоренный культурально - морфологический метод установления влияния химических веществ на микроорганизмы

Сущность метода заключается в наблюдении под микроскопом с фазовым контрастом за ростом и размножением чистых культур микроорганизмов на специально приготовленных агаровых пластинках. Питательные среды, соответствующие для изучаемых видов микроорганизмов, расплавляют и разливают в стерильные пробирки по 10 мл. Расчет рабочих концентраций химических веществ производится следующим образом: не больше 1 мл раствора на 10 мл питательной среды. Одна пробирка каждой серии является контрольной - без химических соединений. После внесения химических веществ все пробирки ставят на водяную баню, для поддержания температуры в пределах 50 - 70 град. С. Чистые предметные стекла прожигают над пламенем горелки, затем на них из пробирок наносят тонкий слой (0,5 - 1 мм) питательной среды. Параллельно, на покровное стекло пастеровской пипеткой наносится небольшая капля суспензии клеток тест - микроорганизма определенной концентрации (для энтеробактерий оптимальная концентрация 200 млн./мл, для дрожжей - 50 млн./мл). Покровное стекло с нанесенной каплей бактериальной взвеси переворачивается и опускается на поверхность тонкого слоя агара. Капля под покровным стеклом растекается на всю его площадь. Результаты проведенных опытов показали, что для получения ответа на статистически достоверном уровне достаточно просмотреть один препарат при подсчете не менее 100 микроколоний и единичных клеток. Наблюдение под микроскопом производится после инкубирования в термостате в течение времени, необходимого для каждого вида микроорганизмов и охлаждения их в холодильнике при температуре 6 - 10 град. С в течение 10 - 15 мин. Из термостата вынимают все слайды (опытные и контрольные) одновременно. Просмотр проводят по диагонали препарата с увеличением 40x7. При таком увеличении в поле зрения попадает 20 - 25 клеток, которые легко поддаются учету.

Разработаны критерии учета антибактериальных свойств химических веществ. К ним относятся: 1) процент жизнеспособных клеток; 2) интенсивность размножения - показывающая, с какой скоростью делится популяция за определенный промежуток времени; 3) длительность лаг - фазы; 4) морфологические изменения отдельных клеток и микроколоний.

Показатель жизнеспособности - это удельный вес размножившихся клеток микроорганизмов опытных серий (с токсическими соединениями) по сравнению с контролем в аналогичных условиях без внесения изучаемого соединения. Для получения результатов с точностью на уровне 96% необходимо в каждом препарате просмотреть не менее 400 микроколоний и единичных клеток. Время инкубации определяется опытным путем для каждого вида микроорганизмов. Для ряда видов микроорганизмов время инкубации установлено, а именно: для микроорганизмов кишечной группы - 3 часа; *Cl. perfringens* - 4 часа; *Micrococcus* - 3,5 - 5 часов; *Rh. gracilis* - 7 часов.

Целесообразно, на основании показателя жизнеспособности, определять процент ингибирования, который высчитывается вычитанием от 100 процента жизнеспособности.

Интенсивность размножения является вторым важным показателем влияния токсических соединений на микроорганизмы и определяется следующим образом. После

определения первого показателя (жизнеспособность или процент ингибиции) в нескольких полях зрения подсчитывается общее количество клеток во всех микроколониях контрольных и опытных препаратов. Подсчету подлежат и отдельные неразмножавшиеся клетки. Общее количество подсчитываемых отдельных клеток и микроколоний должно быть не менее 100. После, на основании получаемых величин, высчитывается степень подавления или стимуляции выражаемой в процентах по сравнению с контролем. Для этого в контроле и опытных препаратах определяется среднее количество клеток в одной микроколонии. Среднее количество клеток в микроколониях контрольного препарата принимается за 100%.

Одновременно, без дополнительных опытов, на тех же препаратах, можно определить и другой показатель - морфологические изменения микроорганизмов под действием токсических веществ и соединений. В контрольных препаратах отдельные клетки и клетки в микроколониях располагаются в определенном, характерном для каждого вида, порядке, в одной полости, имеют четкое очертание. При выращивании тест - микроорганизмов на питательных средах, содержащих токсическое соединение, наблюдаются морфологические изменения как отдельных клеток, так и микроколоний.

Культурально - морфологическим методом определяется еще один показатель антибактериального действия химических веществ на микроорганизмы - лаг - фаза. Для определения длительности лаг - фазы готовится не один, а несколько препаратов (5 - 6 и более) контроля в каждой концентрации изучаемого химического соединения. Это необходимо для того, чтобы просмотреть контрольный и опытные препараты в динамике - через определенные промежутки времени инкубации. Для этого, с учетом лаг - фазы каждого вида микроорганизма, определяют периодичность просмотра препаратов. Например, если лаг - фаза микроорганизмов находится в пределах 1 часа, то целесообразно препараты просматривать каждые 10 - 15 минут, если 2 - 3 часа и более - каждые 30 минут или 1 час. Общее время наблюдения не должно превышать срок наблюдения при определении первого показателя - жизнеспособности.

Длительность лаг - фазы равна времени от начала инкубации до появления 1 - 3 микроколоний, состоящих из 4 и более клеток и выражается в часах и минутах. Общим требованием, при определении этого показателя, является просмотр всех препаратов (контрольных и опытных) через равные промежутки времени. Для этого, если невозможно их учесть в течение нескольких минут, препараты помещают в холодильник, чтобы прекратить размножение популяции микроорганизмов.

Результаты выражаются в абсолютных (время лаг - фазы в минутах) или относительных (процент удлинения или сокращения лаг - фазы микроорганизмов под действием токсических веществ по сравнению с контролем) показателях.

Системы ВАСТЕС

Культуральная диагностика туберкулеза переживает в настоящее время принципиальные изменения, связанные с внедрением в практику полностью автоматизированных систем культивирования МБТ. Главное отличие этих методов - применение жидких питательных сред для культивирования с последующей радиометрической (ВАСТЕС 460), колориметрической (Mb-Vact, Vac-tALERT) и люминесцентной детекцией роста (ВАСТЕС MGIT 960). Рост МБТ на жидкой питательной среде в этих системах удается обнаружить уже через 1 - 2 недели в зависимости от их исходного количества в диагностическом материале. Частота выявления микобактерий так же несколько выше, чем на плотных питательных средах. Автоматизированные системы ВАСТЕС с использованием соответствующих флаконов, содержащих различные противотуберкулезные препараты, позволяют сократить время исследования лекарственной устойчивости микобактерий до 10 - 14 суток

Из перечисленных автоматизированных систем наиболее эффективна в настоящее время система ВАСТЕС MGIT 960BD. Флаконы MGIT с жидкой питательной средой 7H9

содержат в придонной части под силиконом флуоресцентный индикатор, "погашенный" высокими концентрациями кислорода. При наличии роста микобактерий в процессе поглощения кислорода индикатор начинает светиться, регистрация флуоресценции в системе ВАСТЕС MGIT производится автоматически. Использование флаконов MGIT возможно и "вручную", тогда регистрацию свечения производят с помощью транс иллюминатора на флаконах MGIT составляет 11 суток.

Основным недостатком ВАСТЕС MGIT, как и других систем ВАСТЕС, является высокая стоимость оборудования (до 100000 долларов США) и флаконов с питательной средой - посев одной пробы диагностического материала стоит до 400 рублей.

Посев на L-формы микобактерий

L-формы образуются в результате несбалансированного роста нормальных бактериальных клеток в длину и в толщину и поэтому полиморфны. В культурах L-форм обнаруживаются шаровидные, нитевидные или вовсе бесструктурные клетки размером от 0,2 до 50 мкм. Они спокойно проходят через бактериальные фильтры и легко разрушаются при механических воздействиях. В отличие от нормальных клеток L-формы часто содержат крупные вакуоли. Их метаболическая активность очень низкая. Клеточное деление происходит нестандартно, за счёт образования элементарных тел путём отпочкования от поверхности клетки или от мембраны вакуоли.

Культивировать L-формы можно только на специальных средах препятствующих осмотическому разрушению клеток. L-формы лучше растут на плотной, чем в жидкой среде. На плотной среде они образуют колонии, вырастающие в агар и имеющие характерную форму перевернутой шляпы. Колонии растут медленно, хотя иногда достигают значительных размеров.

Различают стабильные и нестабильные L-формы. Нестабильные L-формы имеют полноценную систему генетического контроля синтеза клеточной стенки и способны превращаться в нормальные бактериальные клетки после исключения действия фактора, вызвавшего их образование. При этом происходит восстановление всех основных биологических свойств такой клетки, включая патогенность. Если же генетический контроль синтеза клеточной стенки нарушен необратимо L-формы становятся стабильными, и по своим морфологическим, культуральным и иным свойствам становятся неотличимы от микоплазм. Они крайне редко возвращаются в исходные бактериальные формы и существуют без изменений в различных условиях среды. Переход в L-форму можно рассматривать как способ переживания бактериями неблагоприятных условий, особенно в случаях патогенных микроорганизмов.

Вопросы для самоконтроля

1. В чем заключается ускоренный культурально - морфологический метод установления влияния химических веществ на микроорганизмы?
2. Достоинства и недостатки системы ВАСТЕС.
3. Какие микроорганизмы образуют L –формы?
4. Назовите особенности культивирования L –форм микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методы общей бактериологии: Пер. с англ./Под ред. Ф. Герхардта и др. — М.: Мир, 1983. — 536 с
2. Хаитов, Р.М. Иммунология: Учебник / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатъева, И.Г. Сидорович. - М.: Медицина, 2000. - 432 с.
3. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология: Ч. 2 Иммунология: Учеб. пособие / В.Н. Кисленко. - М.: КолосС, 2007. – 224 с.

Лекция 10

СТРУКТУРА И ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ВИРИОНОВ.

10.1 Особенности принципа организации вирионов вирусов: морфология, типы симметрии, размер, простые и сложные вирусы.

10.2 Характеристика структурных компонентов вириона (геном; белки, структурные и неструктурные; углеводы; липиды) и их функции.

Особенности принципа организации вирионов вирусов

В состав простых вирионов входит один тип нуклеиновой кислоты - РНК или ДНК - и белки. У сложных вирионов в составе внешней оболочки содержатся липиды и полисахариды, первые получают из клеток хозяина, вторые в виде гликопротеидов закодированы в геноме вируса.

Вирусные ДНК. Молекулярная масса ДНК разных вирусов колеблется в широких пределах ($1 \cdot 10^6$ - $1 \cdot 10^8$). Она примерно в 10-100 раз меньше молекулярной массы ДНК бактерий. В геноме вирусов содержится до нескольких сотен генов. По своей структуре вирусные ДНК характеризуются рядом особенностей, что дает возможность подразделить их на несколько типов. К ним относятся двунитевые и однонитевые ДНК, которые могут иметь линейную или кольцевую форму.

Хотя в каждой нити ДНК нуклеотидные последовательности встречаются однократно, на ее концах имеются прямые или инвертированные (повернутые на 180°) повторы. Они представлены теми же нуклеотидами, которые располагаются в начальном участке ДНК. Нуклеотидные повторы, присущие как однонитевым, так и двунитевым вирусным ДНК, являются своеобразными маркерами, позволяющими отличить вирусную ДНК от клеточной. Функциональное значение этих повторов состоит в способности замыкаться в кольцо. В этой форме она реплицируется, транскрибируется, приобретает устойчивость к эндонуклеазам и может встраиваться в клеточный геном.

Химический состав вирусов отличается от других форм жизни необычайной простотой. Кроме геномной ДНК или РНК вирусы позвоночных содержат белки, масса которых составляет 57—90% массы вириона. Количество вирионных белков может колебаться в широких пределах в зависимости от сложности строения вируса

Вирусные белки представляют собой полипептиды, состоящие из нескольких пептидных звеньев. Последние, в свою очередь, образованы из нескольких аминокислотных остатков. По элементарному и аминокислотному составу вирусные белки принципиально не отличаются от белков микроорганизмов, растений и животных. Они принадлежат к высокомолекулярным белкам - **глобулинам**, в их составе обнаружены все 20 аминокислот.

В то же время вирусные белки по своим свойствам гетерогенные. В состав разных видов вирусов может входить от нескольких до 20 и более различных белков, отличающихся аминокислотным составом, иммунологическими и физико-химическими свойствами.

Одна из существенных особенностей вирусных белков состоит в том, что их субъединицы активно взаимодействуют между собой и способны к самосборке (агрегации), в результате которой из вирусной нуклеиновой кислоты и белка вируса *in vitro* реконструируются полноценные вирионы.

Характеристика структурных компонентов вириона

Среди белков, кодируемых вирусным геномом, различают **структурные и неструктурные вирусспецифические белки**. Первые входят в структуру вириона, вторые не входят. Структурными белками являются капсидные белки, белки оболочки и в некоторых случаях белки тегумента и ферменты.

Структурные белки входят в состав зрелых внеклеточных вирионов и выполняют ряд функций: защиту нуклеиновой кислоты от внешних повреждающих воздействий, взаимодействие с мембраной чувствительных клеток в ходе первого этапа заражения, взаимодействие с вирусной нуклеиновой кислотой в ходе и после упаковки в капсид, способность к разрушению в ходе освобождения нуклеиновой кислоты и др.

В зависимости от расположения того или иного белка в вирионе выделяют следующие группы белков: капсидные, вирусной суперкапсидной оболочки, матриксные, белки вирусных сердцевин. Представлены в основном ферментами.

Неструктурные белки - это белки, кодируемые вирусным геномом, но не входящие в вирион, их делят на пять групп: регуляторы экспрессии вирусного генома, предшественники вирусных белков, нефункциональные пептиды, ингибиторы клеточного биосинтеза и ингибиторы разрушения клеток, вирусные ферменты

Вирусные белки имеют молекулярную массу 5—200 кД. Наиболее просто устроенные вирусы (вирусы-сателлиты, дефектные вирусы) кодируют синтез только одного белка, многие патогенные вирусы кодируют синтез 5—10 белков, крупные вирусы, такие как вирусы оспы, герпесвирусы, кодируют синтез до 200 белков. Хотя это немного по сравнению с клетками про- и эукариотов (кодируют соответственно более 5000 и 100000 белков).

Разные вирусы демонстрируют различные варианты стратегии экспрессии своих генов и репликации геномов.

Нуклеиновые кислоты. У вирусов они являются носителями наследственности и определяют инфекционные свойства.

В вирусных частицах нуклеиновые кислоты занимают центральное положение. В сферических (шаровидных) вирусах, имеющих кубическую симметрию, они защищены белковой оболочкой, а в спиральных - плотно упакованы в белковые капсомеры.

У сложноорганизованных вирусов обнаружены **липиды**. В основном они входят в состав липопротеидной оболочки (суперкапсида). Все сложноорганизованные РНК-содержащие вирусы имеют значительное количество липидов (от 15 до 35% от сухой массы). У ДНК-содержащих вирусов 50...60% липидов представлено фосфолипидами, 20...30% составляет холестерин. Липидный компонент стабилизирует структуру вирусной частицы. В составе суперкапсидных оболочек вирусов липиды обеспечивают взаимодействие пепломеров, изолируют внутренние слои вирионов от гидрофильных веществ, содержащихся во внешней среде.

В состав сложноорганизованных вирусов входят **углеводы**. Углеводный компонент вирусов находится в составе гликопротеидов и гликолипидов. Содержание сахара в составе гликопротеидов может быть достаточно большим: 10...13% от массы вириона. Углеводный компонент гликопротеида, обеспечивая сохранение конформации белковой молекулы, обуславливает защиту молекулы от протеаз.

Кроме липидов и углеводов, в составе вирусных частиц имеются **K, Na, Ca, Mg, Fe и другие минеральные элементы**, принимающие участие в формировании связей в молекулах вирусного белка и нуклеиновых кислот.

В составе некоторых вирусов обнаружены **ферменты**, участвующие в репликации вирусных нуклеиновых кислот: ДНК-зависимая РНК-полимераза, осуществляющая транскрипцию ранних РНК с ДНК (вирус осповакцины), РНК-зависимая РНК-полимераза (обратная транскриптаза). У миксовирусов фермент нейраминидаз, вызывающий гидролитическое отщепление нейраминовой кислоты, входит в состав оболочек эритроцитов. У бактериофагов обнаружены два вирусспецифических фермента: лизоцим, разрывающий гликозидные связи в пептидогликановом комплексе бактериальной оболочки, и аденозинтрифосфатаза

Вирусные геномы

Все вирусные геномы являются гаплоидными, т.е. содержат одну копию каждого гена. Исключение составляют ретровирусы, которые обладают диплоидным геномом. Различают ДНК-содержащие и РНК-содержащие вирусы.

Геномы ДНК-вирусов позвоночных представлены одной двуспиральной молекулой за исключением парво- и цирковирусов.

Геномы полиома-, папиллома-, гепадна- и цирковирусов представлены кольцевой ДНК. ДНК гепаднавирусов частично двуспиральная, частично односпиральная. ДНК вирусов полиомы и папилломы является суперспиральной. Большинство линейных вирусных ДНК обладает способностью приобрести циркулярную конфигурацию, которая требуется для репликации по вращающемуся кольцевому механизму. У некоторых ДНК-вирусов (так же как у РНК-ретровирусов) имеются концевые повторяющиеся последовательности.

Все РНК-вирусы позвоночных за исключением рео- и бирнавирусов имеют одноцепочечные геномы. Геном некоторых РНК-вирусов состоит из нескольких (2-12) уникальных фрагментов, каждый из которых кодирует, как правило, один белок. РНК-вирусы с односпиральным геномом могут иметь различную полярность. Если они имеют ту же полярность, что и мРНК, то они могут прямо индуцировать синтез вирусного белка и считаются положительно (+) полярными.

Если геномная нуклеотидная последовательность комплементарна мРНК, то они считаются отрицательно (—) полярными. К ним относятся: парамиксо-, раб-цо-, филе-, ортомиксо-, арена- и буньявирусы. Все они имеют вирионную РНК-зависимую полимеразу (транскриптазу), которая в инфицированной клетке транскрибирует положительно-полярную РНК на матрице геномной вирусной РНК.

Размер геномов РНК-вирусов (одноцепочечных 1,7—21 т.н.; двуцепочечных — 18—27 т.п.н.) значительно меньше размера генома многих ДНК-вирусов. Поэтому РНК-вирусы, как правило, кодируют меньше белков, чем ДНК-вирусы. Масса генома различных вирусов находится в пределах от 1% (орто- и парамиксовирусы) до 32% (парвовирусы) от массы вириона.

Различные семейства вирусов позвоночных значительно различаются по структуре и функции генома.

Вопросы для самоконтроля

1. Принцип организации вирионов вирусов?
2. Какую функцию у вирусов выполняют нуклеиновые кислоты, липиды у углеводов?
3. Перечислите основные типы вирусных геномов?
4. Функции структурных компонентов вириона?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология. - 3-е изд., перераб. и доп /Госманов Р.Г., Колычев Н.М., Плешакова В.И.- М.: Лань, 2010.- 480 с. ISBN 978-5-8114-1073-6
2. Белоусова, Р. В. Ветеринарная вирусология : учебник / Р. В. Белоусова, Э. А. Преображенская, И. В. Третьякова ; Международная ассоциация "Агрообразование" . - М. КолосС, 2007. - 424 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 978-5-9532-0416-3
3. Белоусова, Р. В. Практикум по ветеринарной вирусологии : учебное пособие / Р. В. Белоусова, Н. И. Троценко, Э. А. Преображенская. - 3-е изд., перераб. и доп. - М. : КолосС, 2006. - 248 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 5-9532-0307-1
4. Бакулов И.А. Особо опасные болезни животных: Справочник/Бакулов И.А., Котляров В.М., Донченко А.С. и др.- Покров – Новосибирск, 2002. 164

Лекция 11

МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ВИРУСОВ.

11.1 Культуры клеток: виды, получение, методы исследования;

11.2 Куриные эмбрионы: характеристика, способы заражения и вскрытия.

В настоящее время существуют следующие методы культивирования вирусов:

- на восприимчивых домашних и лабораторных животных (телята, мыши, белые крысы, кролики, морские свинки, хомяки, цыплята);
- на развивающихся куриных эмбрионах, деэмбрионированных яйцах и эмбрионах других видов птиц;
- в культурах ткани и клеток.

Вирусы различных групп могут быть культивированы в организме восприимчивых домашних или лабораторных животных. Наиболее широко, в том числе в лабораторных условиях, применяют культивирование вирусов на белых крысах, кроликах, белых мышках, хомяках, цыплят. У молодых мышей экспериментально воспроизводят грипп, флавивирусные инфекции, ящур и т.д. Они восприимчивы ко многим вирусам, их легко разводить и с ними удобно работать. Лучше использовать мышей инбредных линий, так как они почти одинаково реагируют на тот или иной вирус. У крыс так-же создают инбредные линии, но эти животные более устойчивы к определенным вирусным инфекциям, чем мыши.

Способы заражения животных

Перед заражением всех животных выдерживают на карантине в течение 2...3 нед. Для культивирования вирусов используют только животных клинически здоровых, одного возраста и породы, из хозяйства, благополучного по инфекционным заболеваниям.

Метод заражения подопытных животных подбирают с учетом тропизма культивируемого вируса (к данному виду).

При культивировании *нейротропных* вирусов, развивающихся в клетках нервной системы, животных заражают в головной мозг (фиксированный вирус бешенства).

При культивировании *пневмотропных* вирусов (инфекционная пневмопневмония коз) в качестве вирусосодержащего материала используют суспензию из легких, смывы из носовой и ротовой полостей и зева. в качестве вирусосодержащего материала берут легкие.

При *пантропных* инфекциях (чума свиней, классическая чума птиц, чума крупного рогатого скота, африканская чума свиней и др.) используют в качестве вирусосодержащего материала кровь, селезенку, печень, лимфатические железы больных животных, которые извлекают с соблюдением условий стерильности. Из органов и тканей готовят соответствующую суспензию, которую применяют для последующего заражения *внутривенным или подкожным методами*.

Для культивирования *дерматропных* вирусов (оспа овец и птиц,) используют пораженные участки кожи больного животного, суспензию из везикул и пустул (при оспе, ящуре), из оспенных эпителиом или дифтеритических клеток (при оспе, дифтерите птиц) или материал, взятый из трахеи (при ларинготрахеите птиц). Вирусосодержащий материал лабораторным животным вводится *внутрикожно*.

Культивирование вирусов на куриных эмбрионах

Культивирование вирусов в куриных эмбрионах — наиболее доступный и удобный метод как для первичного выделения вирусов от больных животных и из объектов внешней среды, так и для последующего культивирования вирусов в лаборатории. Этот метод широко применяется для идентификации вирусов и антител, а также для приготовления вакцин и диагностикумов.

В куриных эмбрионах, поскольку они содержат четыре различных биологических субстрата: амнион, аллантоис, хорион- аллантоисную мембрану и желточный мешок,— способны размножаться многие вирусы. Они пригодны для выделения и титрования вирусов, получения антигенов, постановки реакции нейтрализации и т. д. В ряде случаев при инокуляции вирусосодержащего материала куриный эмбрион проявляет признаки данной инфекции, однако он не всегда свободен от посторонних вирусов и не образует антител. Преимущество куриных эмбрионов как биологической системы также в их сравнительно невысокой стоимости и доступности для любой диагностической лаборатории.

В лабораторно-диагностической работе чаще всего используются эмбрионы кур и сравнительно редко эмбрионы других птиц. Например, вирус гепатита утят значительно лучше размножается в утиных эмбрионах.

Яйца необходимо получать из благополучных по вирусным болезням хозяйств. В оплодотворенных яйцах даже от клинически здоровых кур могут находиться различные встречающиеся у этих птиц вирусы: ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита, инфекционного ларинготрахеита, энцефа-ломиелита, парагриппа-2, полиартрита, оспы, арбовирусы, аденовирусы и др. Присутствие этих вирусов может, с одной стороны, привести к диагностическим ошибкам, а с другой, на основе явления интерференции, к подавлению размножения вируса, находящегося в исследуемой пробе. Эмбрионы, не содержащие вируса, но полученные от кур, бессимптомно зараженных определенными вирусами, также могут быть менее чувствительны или абсолютно нечувствительны к действию данного вируса благодаря наличию специфических антител, полученных от матери с желтком. Типичным примером может служить бессимптомное заражение кур вирусом энцефаломиелита.

Для удачного выделения вируса необходимо, чтобы куры, эмбрионы которых используют в работе, не были вакцинированы против болезни, возбудителя которой ищут. Например, эмбрионы кур, подвергнутых вакцинации против ньюкаслской

Условия, влияющие на размножение вирусов в куриных эмбрионах. Температура от 35 до 37 °С является оптимальной для размножения вирусов гриппа. Возраст эмбриона. В зависимости от вида вируса, способа заражения и задач исследования используют эмбрионы в возрасте 8—12 дней. Для культивирования вирусов гриппа чаще берут 9—10-дневные эмбрионы.

Концентрация введенного вируса существенно влияет на размножение вируса. Наиболее активное накопление вируса гриппа А2 отмечается при введении 10000—100000 инфекционных доз. Введение неразведенного вируса вызывает менее обильное накопление инфекционного вируса. Оптимальные дозы заражения вирусами осповакцины — от 10⁻¹ до 10⁻³.

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

Яйца заражают при помощи стерильных шприца для туберкулинизации и специальных игл. Место заражения на яйце заливают парафином. Учитывая патогенность исследуемых вирусов, работы ведут в маске, резиновых перчатках и защитных очках.

Заражение в аллантоисную полость. Используют, как правило, 9—12-дневных эмбрионов. Эту методику часто используют для получения больших количеств вируса при изготовлении антигенов, вакцин и т. д.

Заражение в амнион. Применяют главным образом для выделения вирусов из материала клинических проб. Инфицированный материал, введенный в полость амниона, заглатывается эмбрионом, а также попадает в дыхательные пути. Заражение на хорионаллантоисную оболочку. Чаще всего используют для выделения и культивирования вирусов, образующих на оболочке бляшки или оспины (вирусы оспы, инфекционного ларинготрахеита птиц и др.), а также для титрования этих агентов, так как число инфекционных частиц можно рассчитать по количеству бляшек или оспин..

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

Внутриголовное заражение зародышей. Применяют для вирусов, размножающихся в нервной ткани (нейротропные вирусы).

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

Отрицательный результат заражения не исключает присутствия вируса в исследуемом материале. Он может свидетельствовать о том, что вируса ввели слишком мало или что к данному вирусу эмбрион нечувствителен.

Вопросы для самоконтроля

1. Куриные эмбрионы: характеристика.
2. Культуры клеток: виды, получение, методы исследования?
3. Перечислите живые системы для культивирования вирусов.
4. Перечислите недостатки различных живых систем для культивирования вирусов?
5. Дайте определение понятию «Культура тканей»?
6. Как подразделяются культуры тканей в зависимости от условий выращивания клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология.- 3-е изд., перераб. и доп /Госманов Р.Г., Колычев Н.М., Плешакова В.И.- М.: Лань, 2010.- 480 с. ISBN 978-5-8114-1073-6
2. Белоусова, Р. В. Ветеринарная вирусология : учебник / Р. В. Белоусова, Э. А. Преображенская, И. В. Третьякова ; Международная ассоциация "Агрообразование" . - М. : КолосС, 2007. - 424 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 978-5-9532-0416-3
3. Белоусова, Р. В. Практикум по ветеринарной вирусологии : учебное пособие / Р. В. Белоусова, Н. И. Троценко, Э. А. Преображенская. - 3-е изд., перераб. и доп. - М. : КолосС, 2006. - 248 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 5-9532-0307-1
4. Бакулов И.А. Особо опасные болезни животных: Справочник/Бакулов И.А., Котляров В.М., Донченко А.С. и др.- Покров – Новосибирск, 2002. 164 с.
5. Быков А.С. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии./Быков А.С., Воробьев Н.А., Зверева В.В.- М.: Медицинское информационное агентство, 2008.- 278 с. ISBN 5-89481-593-2
6. Гусев, М.В. Микробиология / М.В. Гусев, Л.А. Минаева– М.: Академия, 2008. – 464 с. – ISBN 5-7695-1403-5

ТАКСОНОМИЯ ВИРУСОВ.

12.1 Основные принципы современной таксономии и номенклатуры вирусов, их научное и практическое значение.

12.2 Классификация вирусов.

12.3 Семейства вирусов позвоночных.

12.4 Прионы и вириды, их место в таксономии

Номенклатура вирусов является международной и универсальной. Всем вирусам присвоены латинские названия. В настоящее время система использует иерархические уровни (таксоны), соответствующие порядку, семейству, подсемейству, роду и виду.

В основу классификации положены следующие основные свойства вирусов: тип нуклеиновой кислоты. В соответствии с этим все вирусы позвоночных подразделяют на два подтипа — ДНК- и РНК-содержащие), количество нитей в ДНК и РНК, наличие второй липопротеидной оболочки, чувствительность вирионов к органическим растворителям (к эфиру, хлороформу), тип укладки (симметрии) капсомеров в белковой оболочке вирионов, количество капсомеров в вирионах, диаметр (размер) вирионов в нанометрах, место репродукции вирионов, способность агглютинировать эритроциты.

Полное или частичное секвенирование вирусного генома увеличивает таксономическую информацию и очень часто используется с целью идентификации вируса.

В настоящее время насчитывается более 3600 вирусов позвоночных, беспозвоночных, простейших, растений, грибов, водорослей и бактерий, из которых 1550 классифицированы и входят в 3 порядка, 56 семейств, 9 подсемейств и 233 рода. С учетом штаммов и серотипов насчитывают свыше 30 тыс. разновидностей вирусов. Патогенные вирусы позвоночных (человека и животных) в соответствии с современной системой классификации вирусов объединены в 2 (Mononegavirales и Nidovirales) порядка и 28 семейств, из которых 10 являются ДНК-вирусами и 18 РНК-вирусами.

В составе семейств вирусы подразделены на подсемейства (покс-, герпес-, парво- и парамиксовирусы) и роды; некоторые семейства включают только один род. В составе семейств 7 родов не имеют международного названия. В последнее время МКТВ выделил два порядка, объединяющих семейства вирусов со сходной организацией генома и единой стратегией репликации. Порядок Mononegavirales включает семейство Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Filoviridae, Bornaviridae; порядок Nidovirales — Coronaviridae и Arteriviridae. Кроме того, выделены два «плавающих» рода вирусов: Deltavirus и вирусы, подобные вирусу гепатита E.

Вид вируса - класс вирусов, характеризующийся большим числом критериев, образующий реплицирующуюся линию и занимающий особую экологическую нишу. Этот уровень иерархии таксонов эквивалентен современному обиходному значению слова «вирус». Например, выражения «вирус свинки и полиовирус типа 1» полностью соответствуют смыслу слова «вирус» и должны считаться видовыми названиями.

Род - это группа видов с определёнными общими характеристиками, отличающимися от вирусов других родов. Критерии для выделения родов включают в себя: феномены генетических взаимодействий, круг восприимчивых хозяев, патогенность, географическое распространение, способ передачи, антигенные свойства.

Названия родов вирусов оканчиваются на *-virus*.

Семейство - это группа родов с общими характеристиками, отличающимися от вирусов других семейств. Критерии, используемые для деления на семейства, включают в себя фундаментальные свойства вирионов: тип и структуру нуклеиновой кислоты,

наличие липопротеиновой оболочки, стратегию вирусного генома, размер и морфологию вирионов.

Семейства вирусов обозначают словами, оканчивающимися на *-viridae*.

В зависимости от того, кого они поражают, все вирусы подразделяют на: вирусы позвоночных (человека, животных и птиц), вирусы растений, вирусы простейших (микроорганизмов), вирусы беспозвоночных (насекомых).

Современная классификация вирусов позвоночных охватывает более 4/5 (80%) известных вирусов.

Классификация вирусов

Вирусы составляют самостоятельное царство *Vira*, которое отличается от животных и растений тем, что в составе вириона находится только одна из двух нуклеиновых кислот (ДНК или РНК), отсутствуют клеточные структуры и автономный обмен веществ и вирусы имеют репродуктивный способ размножения, возможный только в живой клетке.

Международный комитет по таксономии вирусов (МКТВ) на III Международном конгрессе вирусологов (Мадрид, 1975) произвел группирование вирусов в роды и семейства на основании морфологии вириона, химического состава вирусов, характера репродукции их. Основные признаки, на которых базируется классификация вирусов:

- 1) характеристика нуклеиновой кислоты; тип (ДНК, РНК), число нитей в ней (одно- или двунитчатая), процентное содержание ее в вирионе, молекулярная масса, содержание гуанина и цитозина;
- 2) морфология вириона, тип симметрии, наличие внешних липопротеидных оболочек, форма и размер вириона;
- 3) биофизические свойства вирусов и их химический состав (белки, липиды);
- 4) особенности репликации вирусов. Большое значение также придают устойчивости вируса к физическим и химическим факторам, кругу поражаемых хозяев и антигенным свойствам вирусов. Как «вид» предложено рассматривать набор вирусов, имеющих сходные характеристики. Род — группа видов с определенными общими свойствами, а семейство — группа родов, имеющих общие свойства.

Все изученные в настоящее время вирусы сгруппированы в 14 семейств, помимо которых существует группа неклассифицированных вирусов, например вирус гепатита А (возбудитель инфекционного гепатита) и вирус гепатита В (возбудитель сывороточного гепатита).

Прионы (англ. prion от protein — «белок» и infection — «инфекция», слово предложено в 1982 году Стенли Прузинером) — особый класс инфекционных агентов, представленных белками с аномальной третичной структурой и не содержащих нуклеиновых кислот. Это положение лежит в основе прионной гипотезы.

Прион — это белок с аномальной трёхмерной (третичной) структурой, способный катализировать конформационное превращение гомологичного ему нормального клеточного белка в себе подобный (прион). Как правило, при переходе белка в прионное состояние его α -спирали превращаются в β -слои. Появившиеся в результате такого перехода прионы могут в свою очередь перестраивать новые молекулы белка; таким образом, запускается Цепная реакция (химия), в ходе которой образуется огромное количество неправильно свёрнутых молекул. Прионы — единственные известные инфекционные агенты, размножение которых происходит без участия нуклеиновых кислот. Все известные прионы вызывают формирование амилоидов — белковых агрегатов, включающих плотно упакованные β -слои. Амилоиды представляют собой фибриллы, растущие на концах, а разлом фибриллы приводит к появлению четырёх растущих концов. Инкубационный период прионного заболевания определяется скоростью экспоненциального роста количества прионов, а она, в свою очередь, зависит

от скорости линейного роста и фрагментации агрегатов (фибрилл). Для размножения приона необходимо исходное наличие нормально уложенного клеточного прионного белка; организмы, у которых отсутствует нормальная форма прионного белка, не страдают прионными заболеваниями.

Прионная форма белка чрезвычайно стабильна и накапливается в поражённой ткани, вызывая её повреждение и, в конечном счёте, отмирание. Стабильность прионной формы означает, что прионы устойчивы к денатурации под действием химических и физических агентов, поэтому уничтожить эти частицы или сдержать их рост тяжело. Прионы существуют в нескольких формах — штаммах, каждый со слегка отличной структурой.

Прионы вызывают заболевания — трансмиссивные губчатые энцефалопатии[en] (ТГЭ) у различных млекопитающих, в том числе губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота («коровье бешенство»). У человека прионы вызывают болезнь Крейтцфельдта — Якоба, вариант болезни Крейтцфельдта — Якоба (vCJD), синдром Герстмана — Штраусслера — Шейнкера, фатальную семейную бессонницу и куру. Все известные прионные заболевания поражают головной мозг и другие нервные ткани, в настоящее время неизлечимы и в конечном итоге смертельны.

Все известные прионные заболевания млекопитающих вызываются белком PrP. Его форма с нормальной третичной структурой называется PrP^C (от англ. common — обычный или cellular — клеточный), а инфекционная, аномальная форма называется PrP^{Sc} (от англ. scrapie — почесуха овец (скрейпи), одно из первых заболеваний с установленной прионной природой) или PrP^{TSE} (от англ. Transmissible Spongiform Encephalopathies).

Белки, образующие прионы, обнаружены и у некоторых грибов. Большинство прионов грибов не имеют заметного отрицательного влияния на выживаемость, но до сих пор идёт дискуссия о роли грибных прионов в физиологии организма-хозяина и роли в эволюции. Выяснение механизмов размножения прионов грибов оказалось важным для понимания аналогичных процессов у млекопитающих.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие основные свойства вирусов положены в их номенклатуру?
2. Что такое «род» и «вид» вируса?».
3. Чем отличаются прионы и вирионы от вирусов.
4. Прионы и вирионы, их место в таксономии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология.- 3-е изд., перераб. и доп /Госманов Р.Г., Колычев Н.М., Плешакова В.И.- М.: Лань, 2010.- 480 с. ISBN 978-5-8114-1073-6
2. Белоусова, Р. В. Ветеринарная вирусология : учебник / Р. В. Белоусова, Э. А. Преображенская, И. В. Третьякова ; Международная ассоциация "Агрообразование" . - М. : КолосС, 2007. - 424 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 978-5-9532-0416-3
3. Белоусова, Р. В. Практикум по ветеринарной вирусологии : учебное пособие / Р. В. Белоусова, Н. И. Троценко, Э. А. Преображенская. - 3-е изд., перераб. и доп. - М. : КолосС, 2006. - 248 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 5-9532-0307-1
4. Бакулов И.А. Особо опасные болезни животных: Справочник/Бакулов И.А., Котляров В.М., Донченко А.С. и др.- Покров – Новосибирск, 2002. 164 с.
5. Быков А.С. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии./Быков А.С., Воробьев Н.А., Зверева В.В.- М.: Медицинское информационное агентство, 2008.- 278 с. ISBN 5-89481-593-2

Лекция 13

СПЕЦИФИЧЕСКИЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУНИТЕТ.

13.1 Виды и строение антител.

13.2 Классы антител. Теория образования антител.

13.3 Современные методы серологических исследований (ИФА, РИА, ХЛА).

Гуморальный иммунитет обеспечивают лимфоциты, которые дифференцируются из стволовых клеток мозга не в тимуса, а в других местах (в тонкой кишке, лимфатических узлах, глоточных миндалинах и т.д.) и называются В-лимфоцитами. Такие клетки составляют до 15% всех лейкоцитов. При первом контакте с антигеном чувствительны к нему Т-лимфоциты интенсивно размножаются. Некоторые из дочерних клеток дифференцируют в клетки иммунологической памяти и на уровне лимфоузлов в λ -зонах превращаются в плазматические клетки, далее способны создавать гуморальные антитела. Способствуют этим процессам Т-хелперы. Антитела представляют собой большие протеиновые молекулы, имеющие специфическое родство к тому или иному антигену (на основе химической структуры соответствующего антигена) и называются иммуноглобулинами. Каждая молекула иммуноглобулина составлена из двух тяжелых и двух легких цепей связанных друг с другом дисульфидных связей и способных активизировать клеточные мембраны антигенов и присоединять к ним комплемент плазмы крови (содержит 11 протеинов, способных обеспечивать лизис или растворения клеточных мембран и связывание белков клеток-антигенов). Комплемент плазмы крови имеет два пути активизации: классический (от иммуноглобулинов) и альтернативный (от эндотоксинов или ядовитых веществ и от лекарств).

Антитела - это белки глобулиновой фракции сыворотки крови, образующиеся в организме под действием антигена и обладающие свойством специфично с ним связываться.

В зависимости от функции различают нейтрализующие, коагулирующие и лизирующие антитела. Коагулирующие в свою очередь делятся на агглютинирующие и преципитирующие иммуноглобулины.

Антитела имеют от 1 до 10 активных центров. Неполные антитела имеют 1 активный центр и видимых эффектов не обнаруживают. Молекула иммуноглобулина состоит из 4-х полипептидных цепей. Легкие цепи бывают 2-х типов: а тяжелые цепи 5-ти типов, от которых образуются классы иммуноглобулинов: IgA, IgG, IgD, IgE, IgM.

Существуют следующие классы иммуноглобулинов.

1. IgA делится на сывороточный и секреторный.
2. IgG участвуют в реакциях агглютинации, преципитации, лизиса бактериальных клеток, нейтрализации токсинов, составляют 70-85% от всех иммуноглобулинов сыворотки крови.
3. IgD. Роль иммуноглобулинов класса D в организме не ясна.
4. IgE Они играют защитную роль при протозойных заболеваниях и гельминтозах, а также участвуют в реакциях гиперчувствительности немедленного типа.
- 5). IgM вызывают реакции агглютинации, преципитации, лизиса бактериальных клеток, связывания комплемента. Они первыми появляются в сыворотке крови после заражения организма.

Для получения антител с одинаковой специфичностью используют метод гибридом. Качество связи антитела - антиген определяют понятиями авидность и аффинитет.

Радиоиммунный анализ (РИА).

Это сверхчувствительный метод измерения наиболее малых концентраций веществ в биологически активных жидкостях. Данный метод был разработан Розалин Сасмен Ялоу и Соломоном Берсоном в 50-х годах XX века, а широкое признание приобрел в 80-е годы. Радиоиммунному анализу до сих пор нет 100% альтернативы, поскольку исследование обладает очень высокой чувствительностью и специфичностью. Еще одно преимущество метода, о котором говорят специалисты, - это возможность автоматизации и стандартизации, а также получение ответов в цифровом выражении.

Спектр применения метода достаточно широкий, причем, часто именно он является «истиной в последней инстанции», поскольку без затруднений позволяет определить уровень содержания гормонов в миллионных частях миллионной части грамма.

При помощи радиоиммунного анализа диагностируют заболевания эндокринной и сердечно-сосудистой систем, применяют при онкологических диагнозах для определения маркеров опухолей и контроля эффективности лечения, для установления причин бесплодия у женщин и мужчин, выявляют «невидимые» для других методов нарушения развития плода, а также определяют концентрацию в крови ферментов, иммуноглобулинов и лекарственных веществ.

Указанный метод – один из современных анализов, но его постепенно вытесняют другие еще более современные методики диагностирования. Например, для количественного определения иммуноглобулинов РИА сегодня практически не применяется – его постепенно вытесняют модификации иммуноферментного анализа, которые позволяют добиться чувствительности РИА, но при этом этот анализ не требует взаимодействия с радиоактивными изотопами.

В основном для метки антител и антигенов применяют изотоп йода 125 – он имеет высокую удельную радиоактивность и период полураспада 60 дней. Меченый антиген добавляют в определенном количестве, что позволяет определить часть вещества, которая связалась с антителами и другую, которая в результате конкуренции с выявляемым немеченым антигеном, осталась несвязанной.

Имуноферментный анализ (ИФА)

Возможность использования ферментов в качестве метки в иммуноанализе обусловлена прежде всего их высокой каталитической активностью, позволяющей с помощью соответствующих субстратных систем определить концентрации фермента в растворе на уровне 1×10^{15} моль/л и ниже. Принципиально решена проблема введения ферментной метки в молекулы антигенов и антител.

Наиболее широкое применение находит твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Он основан на том, что белки прочно адсорбируются на пластинках, например из поливинил-хлорида. Один из наиболее распространенных на практике вариантов ИФА основан на использовании меченых ферментом специфических антител и иммобилизованных антител той же специфичности. К носителю с иммобилизованными антителами добавляют раствор с анализируемым антигеном. В процессе инкубации на твердой фазе образуются специфические комплексы антиген — антитело. Затем носитель отмывают от несвязавшихся компонентов и добавляют гомологичные антитела, меченные ферментом, которые связываются со свободными валентностями антигена в составе комплексов. После вторичной инкубации и удаления избытка этих меченых ферментом антител определяют ферментативную активность на носителе, величина которой будет пропорциональна начальной концентрации исследуемого антигена.

При другом варианте ИФА к иммобилизованному антигену добавляют исследуемую сыворотку. После инкубации и удаления несвязавшихся компонентов с помощью меченых ферментом антивидовых антител выявляют специфические иммунокомплекс-сы. Данная схема является одной из наиболее распространенных в ИФА.

С целью максимального упрощения использования ИФА разрабатываются так называемые «безреагентные» системы, в которых все необходимые компоненты иммобилизованы или импрегнированы в пористую поверхность. Для проведения анализа необходимо только нанести на носитель образец и визуально наблюдать изменение окраски носителя, происходящее вследствие образования продукта ферментативной реакции.

Области применения и чувствительность ИФА аналогичны РИА. Однако ИФА по сравнению с РИА обладает целым рядом преимуществ: не используются радиоактивные изотопы, стабильность конъюгатов позволяет хранить их в течение длительного времени, измерение оптической плотности проводят в оптическом диапазоне, результаты ИФА можно оценивать полуколичественно без применения аппаратуры (визуально). ИФА очень легко поддается автоматизации.

Чаще всего для ИФА используют полистироловые, поливиниловые пластинки с лунками, которые позволяют адсорбционно связывать АТ и АГ различной природы – белки, ЛПС, гликопротеиды и т.д. Связывание происходит путем адсорбции (т.е. нековалентно) за счет гидрофобных или ионных сил, или конъюгацией (ковалентно). Для получения иммуносорбентов путем ковалентной связи используют в основном такие сшивающие реагенты, как бромциан, глутаральдегид, изоцианаты, при этом в качестве твердой фазы применяют целлюлозу, биогель, сефадекс, агарозу и др.

Методы ТИФА применимы и при работе с корпускулярным АГ, например, клетками бактерий и эукариот. Клетки бактерий можно прикрепить к панели высушиванием и усилить прикрепление фиксатором.

Например, перед адсорбцией клеток бактерий панели обрабатывают поли-L-лизинном в течение 1 часа, лунки промывают и вносят бактериальную взвесь (100мкл взвеси 5×10^3 - 5×10^4 в мл), инкубируют 45 минут и фиксируют

Вопросы для самоконтроля

1. Теория образования антител.
2. Современные методы серологических исследований (ИФА, РИА, ХЛА).
3. Опишите строение и синтез антител.
4. Укажите классы иммуноглобулинов их отличия.
5. Раскройте современную теорию образования антител.
6. Раскройте понятия авидности и аффинитета. Как можно получить высокоспецифичные антитела?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология: Ч. 2 Иммунология: Учеб. пособие / В.Н. Кисленко. - М.: КолосС, 2007. – 224 с.
2. Руководство по микробиологии и иммунологии: Учеб. пособие / Н.М. Колычев [и др.] - Новосибирск: АРТА, 2010. - 256 с.
3. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии: учеб. пособие / А.А. Воробьев и др. / под ред. А.А. Воробьева и А.С. Быкова. – М.: Медицинское информационное агентство, 2003. – 236 с.
4. Ветеринарная микробиология и иммунология: Учебник / Н.А. Радчук [и др.] – М.: Агропропиздат, 1991. – 383 с.
5. Иммунология: Учебник / Е.С. Воронин [и др.] – М.: Колос-пресс, 2002. - 408 с.

МОЛЕКУЛЯРНО - ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В БИОТЕХНОЛОГИИ.

14.1 Стратегия выделения нового гена;

14.2 Секвенирование;

14.3 Плазмидный скрининг.

Стратегия выделения нового гена

Выделить требуемый ген и заставить его работать в новых для него генетических условиях проще всего в случае бактериальных и вирусных генов, поскольку геном этих микроорганизмов невелик. Кроме того, бактериальные гены, как правило, не содержат интронов и даже гетерологичные бактериальные гены хорошо экспрессируются в клетках *E. coli*. При клонировании эукариотического гена необходимо решить, нужна ли экспрессия рекомбинантного гена в клетках микроорганизмов или же можно ограничиться исследованием его структуры? Очевидно, что в первом случае нужно думать о создании клонотеки безинтронных кДНК, а во втором - клонотеки геномной ДНК исследуемого объекта, что технически менее сложно. Если отсутствуют сведения о первичной структуре клонируемого гена, то источником получения информации о последовательности его нуклеотидов может быть кодируемый этим геном белок.

Определив последовательность нескольких N-концевых аминокислот белка, можно в соответствии с генетическим кодом синтезировать ряд олигонуклеотидных зондов, которые далее используют для скрининга клонотеки генов. В этом случае удобнее использовать экспрессирующую клонотеку кДНК, так как для получения необходимой информации нужно будет исследовать меньшее количество клонов. Действительно, в клонотеках кДНК отсутствует большинство некодирующих последовательностей нуклеотидов, суммарная длина которых может значительно (на два-три порядка) превышать таковую значимых последовательностей. Однако при использовании таких клонотек встает вопрос об их репрезентативности, поскольку внутриклеточное содержание индивидуальных мРНК сильно различается в клетках разных тканей. После выделения рекомбинантной ДНК, гибридизующейся с олигонуклеотидными зондами, можно идентифицировать кодируемый кДНК белок после ее экспрессии с использованием специфических антител. Или кодирующий потенциал клонированной кДНК определяют после ее гибридизации с суммарной мРНК, выделяя фракцию мРНК, задерживаемой иммобилизованной кДНК на носителе, с последующей трансляцией мРНК в бесклеточной белоксинтезирующей системе. Кроме того, если клонированная кДНК кодирует мРНК исследуемого белка, то они и в растворе образуют специфический ДНК-РНК-гибрид, и мРНК перестает участвовать в трансляции в бесклеточной системе (метод прерванной трансляции). Наличие или отсутствие белкового продукта бесклеточной трансляции легко обнаружить с помощью специфических антител.

После проведения таких исследований можно точно идентифицировать клонированную кДНК и использовать ее в качестве зонда для выделения целого гена из клонотеки геномной ДНК. Одновременно возможна экспрессия клонированной кДНК в клетках микроорганизмов или в гомологичных эукариотических клетках.

Уникальной задачей является клонирование неизвестных генов, действие которых можно заметить по сложным фенотипическим признакам, например, симптомам системного наследственного заболевания. При выделении таких генов из генома человека

работа начинается с проведения анализа сцепления исследуемого фенотипического признака и какого-либо полиморфного молекулярного маркера, например, редкого аллеля HLA или минисателлитного локуса всех членов семьи больного. После обнаружения сцепленных маркеров задача сводится к клонированию крупных фрагментов ДНК, включающих эти маркеры, их секвенированию, выявлению открытых рамок считывания, в которых пытаются обнаружить мутации, отсутствующие у здоровых индивидуумов.

Секвенирование биополимеров (белков и нуклеиновых кислот — ДНК и РНК) — определение их аминокислотной или нуклеотидной последовательности (от лат. *sequentum* — последовательность). В результате секвенирования получают формальное описание первичной структуры линейной макромолекулы в виде последовательности мономеров в текстовом виде. Размеры секвенируемых участков ДНК обычно не превышают 100 пар нуклеотидов (next-generation sequencing) и 1000 пар нуклеотидов при секвенировании по Сенгеру. В результате секвенирования перекрывающихся участков ДНК, получают последовательности участков генов, целых генов, тотальной мРНК и даже полных геномов организмов.

Для секвенирования применяют методы Эдмана, Сэнгера и другие; в настоящее время для секвенирования генов обычно применяют метод Сэнгера с дидезоксинуклеозидтрифосфатами (ddNTP). Обычно до начала секвенирования производят амплификацию участка ДНК, последовательность которого требуется определить, при помощи ПЦР. Секвенирование полного генома обычно осуществляют при помощи технологий Next-generation sequencing.

Плазмидный скрининг успешно используют для решения различных практических задач, связанных с идентификацией и внутривидовым типированием патогенных микроорганизмов, дифференциацией штаммов по их эпидемиологической и эпизоотологической значимости.

Для проведения плазмидного скрининга применяют метод (С. I. Kado, S. T. Liu, 1981) в различных модификациях, включающий три основных этапа: 1) выращивание бактерий; 2) их сбор и лизис клеток для выделения ДНК; 3) очистка плазмидной ДНК. После этого плазмидные репликоны разделяют методом электрофореза в 0,7%-м агарозном геле. Для оценки результатов гель окрашивают раствором бромида этидия (0,5 мкг/мл) и просматривают его в ультрафиолете на трансиллюминаторе. Для регистрации результатов применяют специализированную систему обработки изображений (компьютерная гельдокументирующая система).

Простота и быстрота метода определения плазмидного профиля позволяют использовать его для дифференциации возбудителей инфекционных заболеваний.

Для получения рекомбинантной плазмиды ДНК одной из плазмид расщепляется выбранной рестриктазой. Ген, который нужно ввести в бактериальную клетку, выщепляют из ДНК хромосом человека с помощью той же рестрикционной эндонуклеазы, поэтому его "липкие концы" являются комплементарными нуклеотидным последовательностям на концах плазмиды. Ферментом лигазой "сшивают" оба куска ДНК (гена и плазмиды), в результате получается рекомбинантная кольцевая плазида, которую вводят в бактерию *E. coli*. (рис. 53). Все потомки этой бактерии, называемые клоном, содержат в плазмидах чужеродный ген и способны вырабатывать белок, кодируемый этим геном. Весь процесс получения таких бактерий, называемый клонированием, состоит из последовательных стадий:

1. Рестрикция - разрезание ДНК человека рестрикционной эндонуклеазой (рестриктазой) на множество различных фрагментов, но с одинаковыми липкими концами. Такие же концы получают при разрезании плазмидной ДНК той же рестриктазой.

2. Лигирование - включение фрагментов ДНК человека в плазмиды благодаря сшиванию липких концов ферментом лигазой.

3. Трансформация - введение рекомбинантных плазмид в бактериальные клетки, обработанные специальным образом - так, чтобы они на короткое время стали проницаемыми для макромолекул. Однако плазмиды проникают лишь в часть обработанных бактерий. Трансформированные бактерии вместе с плазмидой приобретают устойчивость к определенному антибиотику. Это позволяет их отделить от нетрансформированных бактерий, погибающих на среде, содержащей этот антибиотик. Для этого бактерии высевают на студнеобразную питательную среду, предварительно разведя их так, чтобы при расसेве клетки находились на значительном расстоянии друг от друга. Каждая из трансформированных бактерий размножается и образует колонию из многих тысяч потомков - клон.

4. Скрининг - отбор среди клонов трансформированных бактерий тех, которые содержат плазмиды, несущие нужный ген человека. Для этого все бактериальные колонии накрывают специальным фильтром. Когда его снимают, на нем остается отпечаток колоний, так как часть клеток из каждого клона прилипает к фильтру. Затем проводят молекулярную гибридизацию. Фильтры погружают в раствор с радиоактивно меченным зондом. Зонд - это полинуклеотид, комплементарный части искомого гена. Он гибридизуется лишь с теми рекомбинантными плазмидами, которые содержат нужный ген. После гибридизации на фильтр в темноте накладывают рентгеновскую фотопленку и через несколько часов ее проявляют. Положение засвеченных участков на пленке, образовавшихся из-за радиоактивной метки зонда, позволяет найти среди множества клонов трансформированных бактерий те, которые имеют плазмиды с нужным геном.

Не всегда удается точно вырезать нужный ген с помощью рестриктаз. Многие гены расщепляются этими ферментами на несколько частей, некоторые гены не содержат последовательностей, узнаваемых рестриктазами. Поэтому в ряде случаев процесс клонирования начинают не с вырезания из хромосом случайных фрагментов ДНК, а с целенаправленного получения нужного гена.

Вопросы для самоконтроля

1. В чем заключается стратегия выделения нового гена?
2. Плазмидный скрининг, и для чего его используют. ?
3. Что такое секвенирование?
4. Какие методы секвенирования вы знаете?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Альбертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К., Уотсон Дж. Молекулярная биология клетки: в трех томах. — 2. — Москва: Мир, 1994. — Т. 1. — 517 с. — 10 000 экз. — ISBN 5030019855
2. Кнорре Д. Г., Мызина С. Д. Биологическая химия. — 3. — Москва: Высшая школа, 2000. — 479 с. — 7000 экз. — ISBN 5060037207
3. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. — Москва: Мир, 2002. — 589 с

**МОЛЕКУЛЯРНО - ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ В
БИОТЕХНОЛОГИИ.****15.1 Методы амплификации сигнала;****15.2 ДНК – чипы.****ДНК – чипы**

ДНК-микрочип (англ. DNA microarray) — это технология, используемая в молекулярной биологии и медицине. Современный ДНК-микрочип состоит из тысяч дезоксиолигонуклеотидов (зондов, или проб), сгруппированных в виде микроскопических точек и закреплённых на твёрдой подложке. Каждая точка содержит несколько пикомолей ДНК с определённой нуклеотидной последовательностью. Олигонуклеотиды ДНК-микрочипа могут быть короткими участками генов или других функциональных элементов ДНК и используются для гибридизации с кДНК или мРНК (кРНК). Гибридизация зонда и мишени регистрируется и количественно характеризуется при помощи флуоресценции или хемилюминесценции, что позволяет определять относительное количество нуклеиновой кислоты с заданной последовательностью в образце.

ДНК-микрочипы используют для анализа изменения экспрессии генов, выявления однонуклеотидных полиморфизмов, генотипирования или повторного секвенирования мутантных геномов. Микрочипы отличаются по конструкции, особенностям работы, точности, эффективности и стоимости. Коротко можно сказать о том, что существуют два основных направления создания ДНК-чипов. Исторически первыми были методы размещения на чипах предварительно химически синтезированных олигонуклеотидов или полученных с помощью ПЦР одно-цепочечных фрагментов ДНК. Эти методы просты в использовании, необходимое оборудование доступно и относительно дешево. Самым главным преимуществом является высокая гибкость этих методов, позволяющая создать чип с любыми требуемыми последовательностями, но этот подход имеет труднопреодолимые недостатки, сильно ограничивающие его использование. Прежде всего, это огромные затраты труда, времени и средств на синтез требуемого количества различных олигонуклеотидов или ДНК. Плотность размещения ДНК на таких чипах не может превышать десятков тысяч на 1 см^2 .

Готовый чип гибридизируется с меченым различными способами ДНК-субстратом, представляющим собой обычно к-ДНК, синтезированную с помощью обратной транскрипции с м-РНК изучаемых тканей. Далее производится детекция меченных нуклеотидов с помощью специальных устройств, при этом строится паттерн гибридизации, учитывающий те олигонуклеотиды или ДНК фрагменты, с которыми гибридизировалась меченая ДНК и интенсивность сигнала, отражающую количество меченых молекул в данной ячейке чипа. Таким образом, можно получить информацию о последовательности исследуемых ДНК (так как каждой определенной последовательности исследуемой ДНК соответствует известная последовательность иммобилизованной на чипе ДНК) и о количестве каждой исследуемой последовательности. Детали технологии детекции приведены в соответствующем разделе сайта.

Уникальные возможности ДНК-чипов, как новой универсальной исследовательской платформы делают особенно привлекательным использование на их основе самых разнообразных ранее разработанных методов ферментативной и неферментативной трансформации ДНК, таких как лигазные и полимеразные реакции.

Благодаря своим особенностям технология ДНК-чипов находит все более широкое применение в фундаментальных и прикладных исследованиях. Главной отличительной чертой этой технологии является возможность одновременного анализа огромного количества различных ДНК-последовательностей. Появилась ранее недоступная

возможность изучать геном как целое. Это новое направление получило название "геномика". Применение ДНК-чипов позволяет количественно определить уровень экспрессии всех генов любого генома. Особенно важным является установление функциональной роли генов - функциональная геномика. Установление функций генов позволяет разработать методы этиологической диагностики патологических состояний, например злокачественного роста и способы управления функцией генов, которые ответственны за их развитие, в том числе и с помощью такого наиболее перспективного метода как генная терапия. Количественному определению экспрессии и функциональной геномике посвящены соответствующие разделы нашего сайта.

Благодаря появлению ДНК-чипов появилась возможность производить анализ мутаций во всех генах генома одновременно. Так для анализа всех возможных мутаций во всех генах человека достаточно ДНК-чипа с количеством ячеек равным 100-200 млн., что технически достижимо.

Полимеразная цепная реакция

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК) в биологическом материале (пробе).

Преимущества полимеразной цепной реакции:

1. Позволяет выявлять микроорганизмы независимо от фенотипической изменчивости (измененные культурально – морфологические, биохимические и антигенные признаки, сферопласты, протопласты, L – формы микроорганизмов).
2. Позволяет обнаруживать некультивируемые формы микроорганизмов.
3. Высокая чувствительность: 10³ – 10⁴ КОЕ /мл.
4. Высокая специфичность: до 100 %.
5. Быстрота проведения анализа: 4 – 6 часов.
6. Возможность полной автоматизации.
7. Высокая информативность: позволяет выявлять одновременно нескольких возбудителей и разносторонне изучить микроорганизм (индикация с одновременной идентификацией и определением чувствительности к химиопрепаратам).
8. Полифункциональность: используется не только для выявления микроорганизмов, но и для обнаружения генетически модифицированного сырья и продуктов, изучения генетического профиля любых объектов и т.д.

Принцип ПЦР.

ДНК – одна из самых длинных молекул, состоящая из двух цепей азотистых оснований, соединенных водородными связями по принципу комплементарности: А – Т, Г – Ц. Двухцепочечная ДНК при нагревании до 92 - 100°C подвергается денатурации с образованием двух отдельных цепей. При снижении температуры до комнатной происходит ренатурация – восстановление первичной структуры по принципу комплементарности.

Для проведения полимеразной цепной реакции необходимо наличие в реакционной смеси ряда компонентов:

Праймеры - искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 п.н., идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени

Taq-полимераза - термостабильный фермент [выделенный из термофилов — *Thermus aquaticus* (Taq-полимераза), *Pyrococcus furiosus* (Pfu-полимераза), *Pyrococcus woesei* (Pwo-полимераза) и другие.], обеспечивающий достраивание 3'-конца второй цепи ДНК согласно принципу комплементарности. ДНК-полимеразы - группа ферментов, которые синтезируют цепи полинуклеотидов из нуклеозидтрифосфатов.

Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (дНТФ) - дезоксиаденозинтрифосфата (дАТФ), дезоксигуанозинтрифосфата (дГТФ), дезоксицитозинтрифосфата (дЦТФ) и дезокситимидинтрифосфата (дТТФ) - "строительный материал", используемый Taq-

полимеразой для синтеза второй цепи ДНК. Концентрация дНТФ в реакционной смеси – 0,2 мМ.

Анализируемый образец - подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК.

Циклический температурный режим

ПЦР проводят в амплификаторе — приборе, обеспечивающем периодическое охлаждение и нагревание пробирок, обычно с точностью не менее 0,1°C. Если в анализируемом образце присутствует искомая ДНК, то в процессе реакции амплификации с ней происходит ряд событий, обеспечиваемых определенными температурными циклами. Каждый цикл амплификации состоит из трех этапов:

1. Денатурация. На первом этапе необходимо расплести двойную цепь ДНК, находящуюся в образце. Для этого реакционную смесь нагревают до 92-95° С, в результате чего двухцепочечные молекулы ДНК расплетаются с образованием двух одноцепочечных молекул.

2. Отжиг. На втором этапе праймеры присоединяются к одноцепочечной ДНК-мишени. Этот процесс носит название "отжиг".

Праймеры подбирают так, что они ограничивают (фланкируют) искомый фрагмент и комплементарны противоположным цепям ДНК.

Отжиг происходит в соответствии с правилом комплементарности Чаргаффа, означающим, что в двухцепочечной молекуле ДНК напротив аденина всегда находится тимин, а напротив гуанина - цитозин. Если это условие не соблюдено, то отжига праймеров не происходит.

После отжига праймеров Таq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера.

3. Элонгация (синтез). На третьем этапе температуру в реакционной смеси доводят до оптимума работы Таq-полимеразы, и синтез второй цепи продолжается с максимальной эффективностью.

Иногда, в случае близкого значения температуры отжига праймеров и температуры оптимума работы фермента, становится возможным использовать двухэтапный ПЦР, совместив отжиг и элонгацию.

Температурный цикл амплификации многократно повторяется (30 и более раз). На каждом цикле количество синтезированных копий фрагмента ДНК удваивается.

Результатом циклического процесса является экспоненциальное увеличение количества специфического фрагмента ДНК, которое можно описать формулой:

Вопросы для самоконтроля

1. Типы микрочипов?
2. Для чего используют ДНК-микрочипы?
3. Какие методы амплификации сигнала вы знаете?
4. В чем заключается суть ПЦР?

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Патрушев Л. И. Экспрессия генов. — М.: Наука, 2000.
2. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение.. — М.: Мир, 2002.
3. Егорова Т. А., Клунова С. М., Живу хин Е. А. Основы биотехнологии.. — М., 2003.
4. Сельскохозяйственная биотехнология.. — М., 2003.