

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение

высшего образования

«Саратовский государственный аграрный университет

имени Н.И. Вавилова»

ВИРУСОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

Методические указания по выполнению лабораторных работ

для студентов III курса

Специальность

36.05.01 Ветеринария

Саратов 2017

Учебно-методическое пособие для выполнения лабораторных работ по дисциплине «Вирусология и биотехнология» студентами 3 курса факультета ветеринарной медицины пищевых и биотехнологии очной формы обучения специальности 36.05.01 Ветеринария ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ.- Саратов, 2017.

Учебно-методическое пособие содержит теоретическую информацию и практические рекомендации по сбору патологического материала от животных, больных вирусными инфекционными заболеваниями, способах его подготовки для вирусологических исследований, транспортировки в вирусологическую лабораторию и проведению вирусологических исследований для прямого выявления, культивирования вирусов, серологических и генетических исследований, а также по применению современных достижений биотехнологии в ветеринарии.

Предназначены для студентов, специализирующихся в области ветеринарной фармации.

Занятие 1. Вирусологическая лаборатория. Техника безопасности и правила работы с вирусосодержащим материалом. Взятие и транспорта патологического материала для вирусологических исследований

Цель занятия: узнать цели, задачи и структуру вирусологической лаборатории, а также изучить правила и технику безопасности при работе с вирусосодержащим материалом.

Оборудование и материалы: вирусологическая лаборатория кафедры с оборудованием, журнал по технике безопасности, шаблоны сопроводительных записок на патологический материал.

Теоретическая часть.

Вирусологические лаборатории или вирусологические отделы осуществляют следующие задачи:

- 1) лабораторную диагностику вирусных инфекций;
- 2) контролируют заболеваемость животных, вызываемую вирусами в межэпизоотический период;
- 3) учитывают состояние и напряженность постинфекционного и поствакцинального противовирусного иммунитета;
- 4) участвуют в организации и проведении профилактических мероприятий в борьбе с вирусными заболеваниями животных в регионе.

Лабораторию размещают в отдельно стоящем здании, а вирусологический отдел - в изолированном отсеке ветеринарной лаборатории, состоящем не менее чем из 5-6 комнат. Комнаты должны быть отдельными: для работы с вирусосодержащим материалом, для постановки серологических реакций, для работы с культурой клеток, термостатная, моечная, склад. Комнаты должны быть оборудованы боксами с предбоксами и, разделенными стеклянной перегородкой и дверью. Их оборудуют в зависимости от назначения. В боксах на столах размещают только принадлежности для работы. Поверхность столов покрывают пластиком, стеклом. Над рабочим местом устанавливают бактерицидные лампы типа БУВ-30. У входа в бокс размещают дезковрик, пропитанный дезраствором. В предбоксе размещают оборудование, соответствующее назначению бокса (микроскоп, термостат, центрифугу), здесь же хранится стерильная спецодежда, которую одевают перед работой в боксе.

Обязательным оборудованием для вирусологической лаборатории должен быть настольный бокс или бокс с ламинарной подачей стерильного воздуха - для защиты работающего от инфицированного материала.

Помещения лаборатории должны быть светлые, полы делают из плотного влагонепроницаемого материала, устойчивого к дезинфицирующим средствам (метлахская плитка, пластик, линолеум), стены, потолки покрывают легко моющимся материалом, лучше кафельной плиткой. Окна заделывают сетками для предупреждения проникновения мух и других насекомых.

При работе с вирусосодержащим материалом необходимо выполнять следующие требования:

- 1) не допускать рассеивания вирусов во внешней среде;
- 2) предотвратить контаминацию (загрязнение) вирусосодержащего материала посторонней микрофлорой;
- 3) обеспечить личную безопасность.

Работу с вирусосодержащим материалом в лаборатории проводят только в спецодежде, выход за пределы лаборатории в спецодежде; вынос оборудования, инвентаря и т. д. без дезинфекции запрещен.

Весь материал, поступающий в лабораторию на исследование, должен рассматриваться как инфицированный. При распаковке поступившего материала банки обтирают снаружи дезинфицирующим средством, ставят в кюветы.

Рабочее место на столе покрывают марлей, увлажненной 5% раствором хлорамина. Переливание жидкостей, содержащих вирусы, - только над кюветой с дезереством. Использованные пипетки, предметные покровные стекла, резиновые перчатки и т. д., бывшие в употреблении, помещают в 5% раствор хлорамина, лизола, серной кислоты. Вирусосодержащий материал тщательно маркируется, хранится в холодильнике и опечатывается. На этикетке указывают вирус, штамм, дату получения, объем и др. сведения, соответствующие записям в журнале.

Вирусологическая лаборатория имеет основную *документацию*:

- журнал вирусологических исследований;
- журнал учета выделенных вирусов и их уничтожения;
- журнал учета зараженных животных;
- журнал учета движения производственных или музейных штаммов вирусов.

Регистрируют поступающий на исследование патологический материал по сопроводительным документам в приемной.

Патологический материал поступает непосредственно в комнату для предварительной обработки (вскрывочную), там вскрывают трупы и отбирают материал для дальнейшего исследования, распределяя его по отделам, в зависимости от вида исследования. Помещение должно быть оборудовано специальным столом, инструментами для вскрытия, стерильной посудой для сбора материала, спецодеждой.

Виварий - помещение для содержания лабораторных животных; должен иметь карантинное отделение, а также изолированные друг от друга помещения для здоровых и экспериментальных животных с самостоятельными выходами. Клетки с животными снабжаются паспортом, в котором указывают дату поступления или дату заражения животного, массу, номер экспертизы и т. д.

Режим работы в вирусологической лаборатории

При работе в вирусологической лаборатории сотрудники должны строго соблюдать правила асептики и антисептики.

Асептика - система мероприятий, предупреждающих попадание микроорганизмов и вирусов в организм человека или в исследуемый материал из окружающей среды. Для этого используют стерильные инструменты и материалы, соблюдают особые санитарно-гигиенические правила работы, проводят обработку рук.

Антисептика - мероприятия, направленные на уничтожение патогенных микроорганизмов и вирусов при попадании их на кожу и слизистые оболочки. В качестве антисептиков используют различные химические вещества: 70% этиловый спирт, 5% спиртовой раствор йода, 0,5-3% раствор хлорамина, 0,5-1% раствор формалина, 0,1% раствор перманганата калия.

В помещениях боксов ежедневно делают влажную уборку с дезсредствами (раствор хлорамина, гидроксида натрия и др.) и не реже 1 раза в неделю дезинфекцию парами формалина (30 мин 40% раствора на 1м³ помещения) или карболовой кислоты. Для работы используют только стерильные инструменты, материалы и посуду (препаровальные иглы, пинцеты, мелкий хирургический инструмент, предметные стекла, стеклянную посуду, питательные среды и т.д.). Для этого используют физические и химические методы стерилизации, а также стерильные одноразовые материалы и инструменты.

Правила техники безопасности для студентов в вирусологическом практикуме:

1. В лабораторию входить в халате, шапочке, косынке.
2. Личные вещи на рабочий стол не класть.
3. На рабочем месте соблюдать чистоту и порядок, начинать работу только с разрешения преподавателя.
4. Пользоваться только стерильными инструментами, посудой.
6. Открывать и закрывать пробирки, флаконы у пламени горелки.
7. Все отходы после занятий собирать в специально подготовленную посуду.

8. Запрещается выливать и сбрасывать отходы в раковину.
9. Если студент случайно разольет вирусосодержащий материал, он обязан немедленно сообщить преподавателю и вместе с ним принять меры.
10. В конце занятия студент должен привести в порядок рабочее место, сдать дежурному весь материал, инструменты, вымыть руки и обработать дезинфицирующим материалом.

Взятие, получение и обработка патологического материала

Обнаружение вируса в организме больного животного начинают со взятия патологического материала. Патологический материал берут от больных, вынужденно убитых и павших животных. Материал берут как можно быстрее после проявления клинических признаков или не позднее 2-3 часов после смерти или убоя животного. При взятии патологического материала необходимо учитывать патогенез инфекции и тропизм вируса. От больных животных берут тот материал, в котором можно большую концентрацию вируса. Материалом для выделения вируса могут служить кровь, смывы, моча, слюна, фекалии, везикулярная жидкость, стенки афт, корочки, трахеальная слизь, конъюнктивальные выделения. От павших или вынужденно убитых животных берут: кусочки, имеющие видимые отклонения от нормы, лимфоузлы, спинной и головной мозг. Количество патологического материала должно быть достаточным для обнаружения в нем вируса (10-20 г) за исключением случаев подозрения на бешенство, когда в лабораторию отправляют голову животного. Патологический материал берут только стерильными инструментами в стерильную посуду. Взятый патологический материал необходимо законсервировать, чтобы предохранить содержащиеся в нем вирусы от инактивирования ферментами и другими агентами и защитить от действия физических факторов среды. Материал для вирусологических исследований должен быть этикетирован. На пробирки, флаконы, баночки наклеивают пластырь и пишут простым карандашом, составляют сопроводительную записку.

Этапы выполнения лабораторной работы:

1. Расписаться в журнале по технике безопасности.
2. Заполнить сопроводительную (приложение 1) на материал для вирусологических исследований.

Занятие 2. Приготовление вирусосодержащего материала, очистка и концентрирование вирусов. Общие принципы лабораторной диагностики вирусных болезней

Цель занятия: освоить методику приготовления вирусосодержащего материала для исследования.

Оборудование и материалы: коллекция твердых фильтров, патологический материал, раствор Хенкса, ступки, пестики, стерильный песок, центрифуга, центрифужные пробирки, стерилизатор со стерильными ножницами и пинцетами, спиртовки, стерильные ватные тампоны, пробирки типа Эппендорф.

Теоретическая часть.

В комплексную диагностику при вирусных заболеваниях включаются:

1. Эпизоотологический метод, при котором учитывают данные о заболеваемости, сезонности, наличие данного заболевания в предшествующие годы, о массовых прививках скота и его перегруппировках, о предшествующих контактах животных с источником инфекции, наличии в данной местности переносчиков возбудителя (дикие животные, насекомые, грызуны) и т. д.

2. Клинический метод, позволяющий ставить предварительный диагноз на основании типичных признаков болезни. Однако не во всех случаях можно наблюдать четко выраженные клинические признаки, иногда болезнь может протекать скрытно (лейкоз, инфекционная анемия, плазмцитоз и др.). При ряде вирусных болезней клинические признаки могут быть сходными, что не позволяет правильно поставить диагноз. Клинический метод диагностики нередко дополняют гематологическими исследованиями и особенно это ценно при диагностике лейкоза и инфекционной анемии.

3. Патологоанатомический метод, при котором учитывают результаты вскрытия павших животных, т. е. наличие наиболее характерных изменений в органах или тканях. Результаты вскрытия нередко дополняют данными гистологического исследования материалов.

4. Лабораторные методы диагностики. Лабораторную диагностику при вирусных болезнях проводят независимо от точности поставленного предварительного диагноза. Особенно велико значение лабораторных методов диагностики тогда, когда заболевание протекает атипично, скрытно или как смешанная инфекция.

На основании лабораторных методов диагностики ставят окончательный диагноз. При проведении лабораторной диагностики преследуют три цели:

а) обнаружить вирус в исследуемом патологическом материале, обычно путем выявления телец-включений или элементарных телец, с помощью микроскопии мазков или мазков-отпечатков в обычном световом или люминесцентном микроскопах. Иногда для этих целей применяют электронную микроскопию;

б) выделить вирусы из патологического материала путем заражения чувствительных лабораторных животных, развивающихся куриных эмбрионов и культур тканей. При необходимости проводят не менее трех пассажей;

в) идентифицировать выделенные вирусы путем постановки различных серологических реакций (РСК, РДП, РНГА, реакция нейтрализации вируса и др.) с использованием в них стандартных (биофабричных) специфических или типоспецифических иммунных сывороток. Постановкой этих же серологических реакций можно исследовать присылаемые из хозяйств сыворотки крови животных на наличие в них антител, но для этого в лаборатории нужно иметь стандартные (биофабричные) антигены - диагностикумы.

В лаборатории патологический материал освобождают от консерванта, взвешивают, измеряют и делят на 4 части: для вирусологических, бактериологических, микологических и дополнительных исследований. Затем, приняв во внимание содержимое

сопроводительного письма, количество материала, его состояние и качество, составляют план исследований.

Все методы лабораторной диагностики можно разделить на три группы: экспресс методы, вирусологические методы и методы ретроспективной диагностики.

Первым этапом лабораторной диагностики является обнаружение и выделение вируса, затем его идентификация и доказательство этиологической роли. Окончательный диагноз ставится только после лабораторных исследований патологического материала.

Вирусосодержащий материал очищают от крупных клеток, органов и тканей и от микрофлоры. Существует несколько распространенных методов очистки и концентрирования вирусосодержащего материала:

- стерилизующее фильтрование (фильтры Беркефельда, Шамберлана, Зельца);
- центрифугирование (простое, дифференциальное, в градиенте плотности сахарозы);
- метод адсорбции;
- метод электрофореза;
- высаливание нейтральными солями.

Основные методы консервации вирусов

Вирусы выделенных или музейных штаммов следует хранить в условиях, обеспечивающих их максимальную длительную жизнеспособность. Существует несколько методов консервации вирусов:

1. Вирус хранится несколько месяцев при 4°C в 50% растворе глицерина на физиологическом растворе, который обладает бактериостатическим и защитным действием.

2. При замораживании до - 196°C (жидкий азот) с последующим хранением при этой же температуре вирус хранится несколько месяцев. При замораживании и хранении при - 20°C - 70°C вирусы быстро теряют свою инфекционность. Хорошее защитное действие при этом оказывает добавка желатина (0,5-1,5%), инактивированной сыворотки крови или обезжиренного молока.

Не допустимо повторно замораживать и размораживать вирусы, поэтому лучше их хранить маленькими порциями. Скорость оттаивания вируса (температура комнатная или на водяной бане) не влияет на его активность.

2. Вирус хранится несколько лет в лиофилизированном состоянии (высушивание в замороженном состоянии в условиях вакуума), это наилучший способ консервации.

Методика подготовки вирусосодержащего материала для исследования.

Для вирусологических исследований из органов и тканей готовят вирусосодержащий материал. Вирус - внутриклеточный паразит, его необходимо высвободить из клеток, перевести в суспензию. Для этого 1грамм материала измельчают ножницами, растирают в ступке со стерильным песком или битым стеклом, добавляя постепенно 10 мл физиологического раствора, фосфатного буфера или раствора Хенкса. Материал для фильтрования необходимо очистить от крупнодисперсных элементов путем предварительного фильтрования через стерильные бумажные фильтры или центрифугирования при небольших скоростях (2000-4000 об./мин). Растворы, содержащие высокие концентрации белка, перед фильтрованием целесообразно развести. Полученную 10% суспензию центрифугируют, надосадочную жидкость отбирают в стерильную пробирку, добавляют антибиотик широкого спектра действия в рабочей концентрации 0,2 мл на 1 мл вирусосодержащего материала.

Этапы выполнения лабораторной работы:

1. Студенты работают в парах: получают патологический материал и из него готовят по методике вирусосодержащую взвесь.

2. Проводят очистку и концентрирование вирусосодержащего материала.

3. Консервируют полученную суспензию методом замораживания при -18°C.

Занятие 3. Микроскопия элементарных и внутриклеточных телец включений

Цель занятия: ознакомить студентов с методами прямого обнаружения вирусов при световой микроскопии.

Оборудование и материалы: микроскопы, вирусосодержащий материал, предметные стекла, спиртовки, фильтровальная бумага, эксикаторы, мостики промывалка с дистиллированной водой, песочные часы, жидкость Руге, протрава, красящий раствор аммиачного серебра, краска Гимзе, синьки Мансона, раствор танина, спирт – ацетоновая смесь.

Теоретическая часть.

Вирион каждого вируса имеет свою форму, размеры, свойства. Встречаются вирусы, имеющие форму вирионов округлую или овальную, пулевидную (в вирионах таких вирусов нуклеопротеидный тяж свернут в клубок, одетый оболочками). Большинство вирусов животных имеют вирионы в форме многогранника, икосаэдра (в таких вирионах капсомеры уложены по кубическому типу симметрии). У некоторых вирусов вирионы не имеют четко выраженной симметрии (оспепные вирусы, Т-четные фаги). Размеры вирионов колеблются от 10 до 350 нм, поэтому они не видны в световом микроскопе (кроме вируса оспы), предельная разрешающая способность которого 300-400 нм.

Изучение морфологии вирусов - важный этап при определении таксономической принадлежности вирусов. Обнаружение (или индикация) в материале от больных животных вирионов вирусов может служить доказательством наличия вирусов в этом материале.

Обнаружение вирионов вируса в световом микроскопе называется *вирусоскопией*. Вирионы вирусов оспы являются гигантами среди вирионов других вирусов. Их размеры от 300 до 390 нм, поэтому их, хотя и на пределе видимости, удастся увидеть в световом микроскопе.

Обнаружение в патологическом материале внутриклеточных телец-включений с определенными характеристиками позволяет судить о присутствии данного вируса в изучаемом материале. *Вирусные внутриклеточные тельца-включения* представляют собой либо скопление многих тысяч вирионов, либо клеточный материал, изменившийся под действием репродукции вирионов, либо избыток вирусных белков, не вошедших в состав вирионов, или комбинация всех этих элементов (чаще всего). Образуются тельца-включения при репродукции многих вирусов в клетках. Размеры их составляют от еле различимых до размера клеточного ядра. Количество их в клетке может быть от 1 до 12. Некоторые тельца-включения получили специальные названия. Так, включения, что формирует вирус бешенства в цитоплазме, принадлежащей нервным клеткам, именуемых тельцами Бабеша-Негри; образуемые в цитоплазме эпителиальных клеток вирусом оспы птиц - тельца Боллингера; оспы млекопитающих - тельца Гварниери; образуемые вирусом чумы плотоядных - тельца Лентца; образуемые вирусом инфекционного ларинготрахеита кур - тельца Зейфреда.

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

Для обнаружения телец-включений готовят мазки или отпечатки (посмертно или прижизненно), окрашивают различными специальными методами окраски и микроскопируют. Помимо специальных способов окраски для телец-включений разных вирусов разработаны универсальные методы, например, окраска гематоксилин-эозином. Способность к окраске, размеры, форма, структура и местоположение в клетке телец-включений специфичны у разных вирусов. Для некоторых вирусных болезней обнаружение телец-включений настолько специфично, что позволяет судить о виде

инфекции и имеет значение для постановки диагноза (бешенство). В большинстве случаев это лишь вспомогательный метод диагностики вирусных инфекций.

Существует много методов окраски мазков, мазков-отпечатков. Окраска по Муромцеву. Мазки фиксируют в метиловом спирте или спирт + эфир 1-2 часа, или ацетоном 10-12 часов. Затем промывают дистиллированной водой и на 5-10 минут погружают в раствор синьки Мансона (2,0 синьки и 5,0 буры растворяют в 100 мл кипящей дистиллированной воды), разведенной водой 1:40. После этого краску сливают и тут же мазки, не промывая водой, погружают в 10% водный раствор таннина на 8-10 минут до появления голубоватой окраски. Затем промывают водой, высушивают фильтрованной бумагой, проводят через смесь из равных частей спирта с ацетоном или спирта с ксилолом и снова высушивают фильтровальной бумагой. Заливают в канадский бальзам. Окрашенный мазок должен иметь светло-голубой фон. Ядра нервных клеток окрашиваются в синий цвет, цитоплазма клеток бледно-голубая, а тельца Бабеша-Негри - в бледно-фиолетовый с розоватым оттенком и с темными включениями.

Окраска по Михину. Фиксированные химическим способом мазки окрашивают (после высушивания) 30-40 минут краской Гимза, разведенной 1:10 (1-2 капли краски на 1 мл дистиллированной воды). Затем быстро промывают подкисленным спиртом (1 капля ледяной уксусной кислоты на 30 мл 96° спирта), а затем водой, просушивают фильтрованной бумагой и исследуют. Фон мазка должен быть красным с фиолетовым оттенком, нервные клетки синеватые, ядро клеток черные, а тельца Бабеша-Негри розово-красные с точечными включениями темно-синего цвета.

Самым распространённым является метод окраски по Морозову. Мазки сушат на воздухе, помещают в вертикальном положении в дистиллированную воду на 10-15 минут и красят. Для этого на фиксированный мазок на 1-2 минуты наносят жидкость Руге, затем промывают дистиллированной водой. Наносят протраву на 1-2 минуты, нагревая до отхождения паров, снова промывают. Докрашивают раствором аммиачного серебра при легком подогревании. Рассматривают препарат в иммерсионной системе. Элементарные тельца на светло - коричневом фоне препарата имеют вид темно - черных мелких зерен, образований.

Этапы выполнения лабораторной работы:

1. Каждый студент готовит мазок из вирусосодержащего материала, окрашивает одним из предложенных методов, рассматривает в микроскоп.
2. Студент рассматривает готовый препарат вируса бешенства, внутриклеточные тельца Бабеша - Негри.

Занятие 4. Методы электронной микроскопии в вирусологии

Цель занятия: ознакомиться с устройством и принципом работы электронного микроскопа. Изучить приготовление препаратов для просмотра в электронном микроскопе.

Оборудование и материалы: электронный микроскоп, схема строения электронного микроскопа, вирусодержащая суспензия, сеточки с подложкой, реактивы для контрастирования, микротом, фотографии вирусов под электронным микроскопом.

Теоретическая часть.

При диагностике некоторых вирусных болезней и для изучения морфологии вирусов в настоящее время применяют электронную микроскопию. Разрешающая способность электронных микроскопов достигает 2 А (у световых микроскопов 2500 А и больше), что практически дает возможность видеть все вирусы (объекты размером до 0,2-0,4 нм). В отличие от светового в электронном микроскопе освещение идет сверху вниз, и изображение получается за счет потока электронов, длина волны которых во много раз меньше длины волны света.

С целью выявления вируса в исследуемом материале препараты для электронной микроскопии готовят методом негативного контрастирования (применяется для выявления свободных частиц вируса и изучения его морфологии после очистки и концентрации вирусодержащей суспензии). Для этого медные электронно-микроскопические сеточки с коллодиевой пленкой-подложкой помещают на несколько секунд в каплю вирусодержащей суспензии. Затем промывают 2-3 каплями дистиллированной воды и подвергают негативному контрастированию. Для этого на препарат наносят каплю 10%-ного раствора фосфорновольфрамовой кислоты (рН-7,0) или 5%-ного раствора уксуснокислого уранила. Фильтровальной бумагой удаляют лишний контрастирующий раствор и сеточку просматривают в электронном микроскопе.

Используют также методы напыления с применением тяжелых металлов (золото, палладий, уран), которые распыляют в парообразном состоянии под определенным углом на поверхность исследуемого препарата. Для обнаружения вируса в клетках используют метод ультратонких срезов. Для этого вирусодержащий материал предварительно фиксируют химическими или физическими методами. Основным химическим фиксатором является четырехокись осмия, из физических фиксаторов часто применяют высушивание на воздухе и лиофилизацию. Фиксированные кусочки ткани обезвоживают в спирте или ацетоне и заливают в эпоксидные смолы (эпон, аралдит др.). Срезы толщиной 50-200 А из залитых кусочков ткани готовят на ультрамикротоме с помощью алмазных или стеклянных ножей.

Материалом для электронно-микроскопических исследований вирусов могут быть смывы из глаз, со слизистых оболочек носовой и ротовой полостей, содержимое кишечника, срез пораженного участка эпидермиса кожи или оспенные корочки, кусочки органов и тканей больных и павших животных. При работе с вирусами в лаборатории исследуют вирусодержащую культуральную жидкость культуры клеток, аллантоисную жидкость куриного эмбриона, кусочки органов и тканей зараженных животных.

Этапы выполнения лабораторной работы:

1. Ознакомиться с устройством и принципом работы электронного микроскопа.
2. Работая в парах, приготовить препараты для электронной микроскопии на сеточках с подложкой.
3. Контрастировать препараты и изучить в электронный микроскоп.

Занятие 5. Методы люминесцентной микроскопии в вирусологии

Цель занятия: ознакомиться с устройством и принципом работы люминесцентного микроскопов. Изучить методы приготовления препаратов для просмотра в люминесцентном микроскопе.

Оборудование и материалы: люминесцентный микроскоп, вирусодержащая суспензия, патматериал, набор красок для флюорохромирования, предметные и покровные стекла, фиксатор, набор сывороток для прямого и непрямого МФА.

Теоретическая часть.

Сущность явления люминесценции состоит в том, что, поглощая различные виды энергии (световую, электрическую), атомы некоторых веществ переходят в возбужденное состояние, а затем, возвращаясь в исходное состояние, выделяют поглощенную энергию в виде светового излучения. Люминесценция наблюдается в виде флуоресценции или фосфоресценции.

Люминесцентная микроскопия осуществляется с помощью специальных микроскопов, в которых используют ближнюю ультрафиолетовую или сине - фиолетовую часть спектра. В люминесцентном микроскопе используют систему светофильтров для выделения сине-фиолетовой части спектра, теплозащитные фильтры для предохранения оптики от перегрева и выцветания препаратов и запирающий фильтр на окуляре для снятия возбуждающего света и пропускания света люминесценции. Люминесцентный микроскоп устанавливают в затемненной части комнаты на прочном столе. Следует исключить вибрацию, которая создаст помехи, что особенно сказывается при микрофотографировании. В помещении должна быть хорошая вентиляция, устраняющая вредные газы от источника света. Лампа достигает полной силы света через 5-10 мин после включения, если сила тока при работе равна 4-5 А. Повторное включение лампы возможно только после ее охлаждения.

При люминесцентной микроскопии используют нефлуоресцирующее иммерсионное масло высокого качества. В вирусологической практике люминесцентную микроскопию используют в двух основных методах: флуорохромировании и методе флуоресцирующих антител.

Метод флуорохромирования - это обработка препарата флуорохромом с целью увеличения силы и контрастности свечения препарата. Отечественная промышленность выпускает специальные наборы флуорохромов. Наиболее широко применяется акридиновая группа (акридин оранжевый, акридин желтый и др.) и тиозиловая группа (примулин). Флуорохром чаще всего используют в водных растворах очень низкой концентрации (от 1: 1000 до 1: 1 000 000). Метод флуорохромирования может быть использован при изучении некоторых вирусов (оспы, болезни Борна, аденовирусной инфекции и др.).

Наибольший интерес представляет акридиновый оранжевый, который вызывает полихроматическую флуоресценцию нуклеиновых кислот. Так, при обработке препаратов этим флуорохромом дезоксирибонуклеиновая кислота ярко флуоресцирует желто-зеленым цветом, а рибонуклеиновая кислота - рубиново-красным.

Препараты для метода флуорохромирования можно готовить двумя способами:

а) на свежий мазок-отпечаток (из органов, соскобов со слизистых оболочек или суспензии инфицированных клеток) наносят 1-2 капли рабочего раствора (1:10 000) акридинового оранжевого, накрывают покровным стеклом. Приготовленный таким образом свежий (в течение 10-20 мин после его приготовления) препарат рассматривают в люминесцентном микроскопе;

б) мазки отпечатки, полученные из патологического материала, или инфицированные культуры клеток (на покровных стеклах) фиксируют 96° этиловым спиртом в течение 15-30 мин, промывают раствором Хенкса, наносят на препарат 1-2

капли раствора акридинового оранжевого (1:10 000), через 5-10 мин накрывают покровным стеклом и исследуют.

В результате окрашивания ДНК, содержащаяся в ядрах клеток, дает изумрудно зеленое свечение, РНК, находящаяся в цитоплазме, светится красным или оранжевым цветом. В препаратах ДНК содержащих вирусов, например, аденовируса, вирусный материал светится зеленым цветом в ядре в виде гранул различной величины. При наличии в препарате РНК, содержащего вирус, например, вируса гриппа, вирусный материал обнаруживается в виде ярко красных гранул в цитоплазме клеток.

Чтобы различить происхождение ДНК или РНК (клеточное или вирусное), применяют обработку препаратов 0,5 % раствором РНК-азы или ДНК-азы в течение 5-10 мин или облучение УФ лучами. При этом свечение клеточных РНК или ДНК сразу исчезает, а вирусные продолжают светиться еще 20-30 мин, что служит доказательством специфичности вирусных нуклеиновых кислот. Метод простого флуорохромирования несложен, однако в большинстве случаев он не дает возможности полно дифференцировать возбудителей болезни.

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

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

Хранить конъюгаты рекомендуется при температуре минус 20°C или при более низких температурах в герметически закрытых сосудах. Можно также консервировать конъюгат путем добавления тиомерсала 1:10000 и хранить при температуре 4°C. Флуоресцирующие сыворотки или их глобулиновые фракции длительное время сохраняют специфическую активность в лиофилизированном состоянии.

Для исследования иммунофлуоресцентным методом используют мазки, отпечатки (отпечаток должен быть тонким и равномерным), гистологические срезы и культуры клеток. Мазки готовят из смывов, органов и тканей, в которых предполагается наибольшая концентрация вируса. Для выявления вируса гриппа или других возбудителей респираторных болезней очищают носовой ход от слизи и берут смыв со слизистой оболочки ватным тампоном, который помещают в пробирку с забуференным физиологическим раствором или питательной средой для культур клеток (3 мл). Тампон встряхивают, отжимают и удаляют, раствор центрифугируют из осадка, делают мазки. Исследование слизистых оболочек, выстланных многослойным плоским эпителием (например, глотки, конъюнктивы, влагалища), требует приготовления соскобов после очистки слизистой оболочки. Поверхностные ороговевшие клетки таких эпителиев обладают сильной аутофлуоресценцией и не годятся для исследования. Поэтому препараты готовят из клеток скарифицированных участков, содержащих базальные слои эпителия. Препараты из культуры клеток (в случае, если вирусы предварительно накапливают в культурах клеток) выращивают на узких пластинках покровного или такого же размера обрезках предметного стекла. Извлеченные в разные сроки после заражения из пробирок с культурой клеток эти пластинки осторожно отмывают от питательной среды физиологическим раствором или фосфатным буфером. Затем сушат

при комнатной температуре на воздухе на чистом листе фильтровальной бумаги, положив клеточным слоем вверх, и фиксируют.

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

Наилучший фиксатор для вирусных антигенов - чистый ацетон, охлажденный до минус 10-15°C; можно также использовать метиловый спирт. Фиксируют препараты 10-20 мин. Продолжительность и температура фиксации могут колебаться в зависимости от вида вируса. При особо опасных инфекциях время фиксации увеличивают. Например, при работе с уличным вирусом бешенства препараты фиксируют не менее 4 ч.

С целью уменьшения неспецифической фоновой флуоресценции исследуемых препаратов применяют так называемое контрастирование неспецифического свечения. Для этого непосредственно перед обработкой препаратов в специфическую флуоресцирующую сыворотку добавляют альбумин нормальной сыворотки лошади или быка, окрашенный родамином (излучающим красный цвет). В таком препарате специфический антиген будет светиться зеленым, а фон препарата (свободные от вируса клетки и т.п.), адсорбируя альбумин, окрашивается в оранжево-красный или бурый цвет (контрольный по отношению к зеленому). Различают два основных способа применения МФА; прямой и непрямой.

Прямой или одноступенчатый метод заключается в том, что на приготовленный препарат наносят конъюгат и выдерживают в течение 20-60 мин при температуре 37°C во влажной камере (или более длительное время при 4°C). Затем препараты отмывают физиологическим раствором (рН 7,2-7,5) от несвязанного с антигеном конъюгата. Затем их подсушивают на воздухе, наносят нефлуоресцирующее масло и исследуют под микроскопом.

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

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

В качестве обязательного контроля берут препараты из материалов, не содержащих искомого вируса (нормальные тканевые культуры, отпечатки органов здоровых животных). Их обрабатывают так же, как опытные препараты, и одновременно с ними. Прямой метод позволяет выявить и идентифицировать антиген. Для этого нужно иметь на каждый вирус флуоресцирующую сыворотку. МФА особенно широко используется в вирусологии для диагностики большинства вирусных болезней животных. Благодаря специфичности, высокой чувствительности, доступности, скорости и относительной простоте, МФА используется с целью индикации и идентификации вирусных антигенов (особенно для вирусов, не обладающих цитопатогенными, гемагглютинирующими и гемадсорбирующими свойствами); выявления и титрования противовирусных антител, а также аутоантител. МФА делает возможным морфологическое изучение процессов взаимодействия вирусов с клетками, динамики накопления вирусных антигенов в клетке, антигенных связей вирусов, а также патогенеза вирусных инфекций. Особенно большое значение этот метод имеет при изучении смешанных и хронических инфекций.

МФА относится к экспресс-методам диагностики, так как в течение короткого времени (нескольких часов) он позволяет обнаруживать вирусные антигены даже при наличии их малых доз.

Непрямой метод предполагает предварительную обработку препарата нефлуоресцирующей специфической сывороткой. А затем, после промывки, препарат обрабатывают антивидовой люминесцирующей сывороткой. Это позволяет значительно снизить затраты на проведения анализа, так как флуоресцирующие сыворотки не предназначены для длительного хранения и их стоимость на много выше, чем у нелюминесцирующих.

Самостоятельная работа студентов:

1. Ознакомление с устройством люминесцентного микроскопа.
2. Студенты зарисовывают схему прямого и непрямого метода РИФ.
3. Работая в парах, студенты готовят препараты для просмотра в люминесцентном микроскопе.
4. Один мазок флюорохромируют, другие окрашивают прямым и непрямым методом и микроскопируют.

Занятие 6-7. Использование лабораторных животных в диагностических вирусологических исследованиях

Цель занятия: изучить цели и способы применения лабораторных животных для вирусологических исследований. Ознакомить студентов с методами заражения лабораторных животных (белых мышей).

Оборудование и материалы: набор инструментов в стерилизаторе (ножницы, иглы, шприцы, пинцеты), белые мыши, ватные спиртовые тампоны, краски для мечения мышей, вирусосодержащий материал, эфир, ксилол.

Теоретическая часть:

В настоящее время вирусологические исследования выполняются на 250 видах животных. К ним предъявляют определенные требования по возрасту, полу, весу, физиологическому состоянию и восприимчивости. Широко используют мини – животных, гнотобионтов (СПФ- животные, безмикробные, моно-, ди- и поликонтаминированные животные). Наиболее часто в качестве подопытных животных используют белых мышей, белых крыс, морских свинок, хомяков и хорьков, реже применяют голубей, кур и в ряде случаев используют для биопробы собак, поросят, телят, овец и др. животных. Выбор лабораторных или других животных и способов заражения зависят от вида вируса, который предполагается выделить. В случаях, когда невозможно установить вид предполагаемого вируса, заражают несколько видов животных. Если лабораторные животные нечувствительны к данному вирусу (чума свиней, инфекционная анемия лошадей и др.) заражают основного хозяина.

Для проведения биопробы животных берут здоровых, приобретенных из заведомо благополучного хозяйства или питомника, восприимчивых к изучаемому заболеванию. Большое значение имеет возраст, т. к. к вирусам наиболее чувствительны молодые животные, а в некоторых случаях используют даже сосунов. Животные должны получать полноценный рацион и содержаться в надлежащих санитарных условиях, имеет значение в некоторых случаях и пол. Приобретенных животных перед использованием их для заражения обязательно выдерживают в карантине, а перед опытом тщательно осматривают и иногда измеряют температуру тела (нормальная температура тела у белых мышек 37.0-39.0°C, у кроликов 38.7°-39.5°C, у морских свинок и белых крыс 38.5°-39.5°C, у кур и голубей 41.5°-41.8°C, у собак и кошек 38.0°-38.5°C). Содержат лабораторных животных в специальных клетках и в отдельном помещении. После заражения животных маркируют (метят) и содержат отдельно от здоровых. Одним и тем же материалом в каждом опыте обычно заражают несколько животных с тем, чтобы исключить возможную индивидуальную резистентность подопытных животных.

Вирусы обладают тропизмом к определенным тканям в организме. Этим и определяется выбор способа введения. Так, например, для выделения нейротропных вирусов заражение проводят в мозг, при выделении респираторных - интраназально, дерматропных - на кожу или внутрикожно и т. д. Поскольку при первичном заражении животных они могут не заболеть, то через 6-8 дней здоровых на вид зараженных животных убивают, а их органы используют затем для заражения следующей партии животных, делают обычно три бессимптомных (слепых) пассажа. Результаты выделения вируса считают положительными в тех случаях, когда у животных после соответствующего инкубационного периода развиваются клинические признаки болезни и когда это заболевание удастся передавать от одного животного к другому при пассажировании.

При заражении подопытных животных нужно обеспечить соответствующую их фиксацию. Это достигается при помощи специальных приспособлений (доски, стенки и т. д.) или же животное держит помощник. Кролика помощник берет правой рукой за кожу спины, поднимает и закладывает его задние лапы под мышку левой руки. В таком положении кролик оказывается крепко зафиксированным. Можно фиксировать кролика и

другим способом: сидя на стуле, взять его задние лапы, поднять, а голову и передние лапы зажать между ногами. Для фиксации морских свинок в одной руке зажимают задние лапы, а в другой - передние и голову. Мышей для фиксации одной рукой берут за хвост, а другой захватывают за кожу в области верхней части шеи, поднимают и в таком положении держат в момент заражения. При работе с мышами можно обходиться и без помощников, используя пинцеты Пиана.

Место введения материала тщательно обрабатывают: шерсть выстригают, кожу протирают спиртом и смазывают йодом.

В лабораторных исследованиях наиболее часто пользуются следующими методами (способами) введения вируссодержащего материала:

а) подкожный метод - материал вводят под кожу в области спины, области бедра, мышкам в области поясницы у корня хвоста. Кожу на месте введения оттягивают пальцами и вводят материал;

б) внутримышечный метод - материал вводят в толщу мышц в области бедра или груди (у птиц);

в) внутрикожное заражение - материал тонкой и острой иглой вводят в толщу кожи и на месте введения образуется бугорок;

г) внутрибрюшинный метод - животное фиксируют в вертикальной положении вниз головой и материал вводят в области паха (лучше, если животное перед заражением было долго не кормленным);

д) внутривенное заражение (интравенозный метод) - материал вводят тонкой иглой мышам и крысам в хвостовую вену, кроликам - в краевую вену уха, морским свинкам в сердце. Материал не должен содержать крупных частиц и пузырьков воздуха. Чтобы лучше вырисовывалась вена, рекомендуется протирать ксилолом или бензолом;

е) заражение животных в нос (интраназальный метод) - для введения материала лабораторных животных предварительно наркотизируют в банке с эфиром, и в результате наступает глубокий сон, но не продолжительный. Материал вводят в обе ноздри по 2-3 капли;

ж) заражение в мозг (интрацеребральный метод) - материал вводят в мозг головной в толщу или под твердую мозговую оболочку. У крупных животных делают предварительно трепанацию черепа, мышкам вводят иглой выше и левее или правее точки пересечения линий: средней сагитальной и линии, соединяющей верхние углы орбиты глаз. Доза для мышей 0,02-0,03 мл, для кроликов 0,3-0,5 мл;

з) заражения в переднюю камеру глаза - материал вводят тонкой иглой, после предварительного обезболивания глаза кокаином, через роговицу на границе с белочной оболочкой и после того как стечет несколько капель жидкости из передней камеры глаза. Вводят материал в дозе 0,05-0,1 мл в один глаз, другой остается в качестве контроля;

и) заражение в кончик носа (в верхнюю губу) мышек - при бешенстве.

Кроме перечисленных методов, в ряде случаев экспериментальным животным скармливают зараженные корма (алиментарный метод), наносят инфицированный материал на кожу, на конъюнктиву или роговицу глаза, заражают субокципитально в спинномозговую жидкость и т.д.

Гибель зараженных животных в первые сутки возможна от травмы. Срок наблюдения за зараженными животными устанавливают из расчета в 2-3 раза превышающий максимальную длительность инкубационного периода при этом заболевании. В это время, при необходимости, можно выполнять серологические прижизненные обследования их.

Животных, павших при экспериментальном заражении, немедленно вскрывают, проводят патологоанатомическое исследование и собирают материал для других вирусологических исследований или для перезаражения. Вскрытие проводят стерильными инструментами со строгим соблюдением асептики и личной профилактики. Для исключения бактериальной инфекции проводят посевы материала на питательные

среды для аэробов и анаэробов. Трупы после вскрытия и взятия материала утилизируют сжиганием в печах или автоклавированием.

Кроме выделения вирусов лабораторные животные широко применяются и для других целей: изучение патогенеза и патоморфологии при вирусных инфекциях, для титрования вирусов, для получения живых ослабленных противовирусных вакцин и гипериммунных сывороток, для аттенуации (ослабления вирулентности) вирусов, для сохранения и поддержания вирусов в условиях лаборатории и т. д.

Вскрытие лабораторных животных проводят сразу же после их гибели. Если не погибло зараженное животное, то его убивают, когда максимально проявляются симптомы болезни или при отсутствии их на 8-10-й день после заражения. Убить животное можно избыточной дозой наркоза, декапитацией (отрезанием головы), мелких животных - путем разрыва спинного мозга, растягивая за голову и хвост быстрым коротким движением. Трупы мелких животных в спинном положении фиксируют на кювете, залитой парафином с помощью инъекционных игл, более крупных - на специальных вскрывочных столах. Используют стерильные инструменты, а шерсть животного по линии разреза обрабатывают дезинфицирующим раствором.

Разрез кожи делают по белой линии от лонной кости до шеи, приподнимая пинцетом кожу. После чего кожу разрезают по направлению к каждой из четырех конечностей, отпрепаровывают и фиксируют иглами в парафине.

Вначале вскрывают брюшную полость от разреза под линией диафрагмы до лонной кости, заменив инструменты. В качестве вирусосодержащего материала из брюшной полости берут кусочки печени, селезенки, почки, брыжеечные лимфоузлы, участок кишечника при наличии патологоанатомических изменений.

Грудную полость вскрывают путем удаления ребер вместе с грудной костью. Череп вскрывают, укрепив животное в брюшном положении, обрабатывают кожу головы дезраствором. Разрез кожи делают перпендикулярно оси тела за ушами, продолжают слева и справа вперед к глазницам. Кожу вместе с ушами отпрепаровывают и отбрасывают вперед, оголяя черепную коробку. Браншу ножниц вставляют в большое черепное отверстие и режут кости черепа влево и вправо по направлению к глазницам. Затем разрезают кости черепа между глазницами и удаляют весь вырезанный участок. Толстые кости черепа распиливают. Мозг извлекают из основания черепа, подрезав черепно-мозговые нервы.

При вскрытии в качестве вирусосодержащего материала отбирают органы, имеющие патологоанатомические изменения, и регионарные пораженному органу лимфоузлы. Каждую пробу материала размещают в двух стерильных пробирках под резиновыми пробками. Содержимое одной пробирки, предназначенное для вирусологических исследований, заливают соответствующим фиксирующим раствором. Если предполагаются микроскопические методы обнаружения вируса (световая, люминесцентная микроскопия), из патологического материала делают мазки и мазки-отпечатки.

Для приготовления отпечатков орган или головной мозг выкладывают на фильтровальную бумагу и прочно фиксируют. По вертикальной плоскости, не нарушая структуры органа, отрезают небольшой кусочек, выкладывают его срезом вверх и прикладывают сверху обезжиренное предметное стекло. Полученные отпечатки высушивают на воздухе.

Самостоятельная работа студентов.

1. Студенты работают по 2 человека на подготовленных рабочих местах: заражают белых мышей: внутривенно (в боковую вену хвоста), внутримышечно, подкожно, интраназально, внутрибрюшинно.
2. Проводят мечение зараженных лабораторных животных.
3. Работая в парах, студенты вскрывают зараженных лабораторных животных. При этом непогибших умерщвляют смещением шейных позвонков.

Занятие 8. Культивирование вирусов на куриных эмбрионах

Цель занятия: определить цели и способы применения куриных эмбрионов в вирусологии, ознакомить студентов с методами заражения и вскрытия куриных эмбрионов для культивирования вирусов.

Оборудование и материалы: куриные эмбрионы 9-12 дневные (КЭ), овоскоп, спиртовые тампоны, подставки для эмбрионов, пастырь, иглы, шприцы, простой карандаш, пробойники, иголки.

Теоретическая часть.

Преимущества куриных эмбрионов перед лабораторными животными:

- эмбрион защищен от бактериального заражения со стороны внешней среды скорлупой и подскорлупной оболочкой;
- высокая чувствительность к широкому спектру вирусов, т. к. у эмбрионов не развита система защитных механизмов;
- легкодоступность в связи с развитием широкой сети птицефабрик;
- экономичность (не требуют ухода и кормления).

К недостаткам следует отнести отсутствие гарантии стерильности куриных эмбрионов. Присутствие патогенных агентов и вирусов в них могут исказить результаты исследований.

Требования к куриным эмбрионам, используемым в вирусологических исследованиях, следующие:

- возраст эмбриона должен соответствовать избранному методу заражения;
- скорлупа яиц должна быть чистой (мыть нельзя), непигментированной;
- хозяйство, из которого получены эмбрионы, должно быть благополучным по инфекционным болезням;
- эмбрионы не должны охлаждаться при доставке их из инкубатория. В лаборатории эмбрионы инкубируют в термостате при температуре 37°C и влажности 60-70 %, размещая их в специальных штативах камерой вверх.

Подготовка эмбрионов к заражению включает овоскопирование и дезинфекцию скорлупы. Овоскопирование - это просмотр яиц против достаточно яркого источника света, лучше в затемненном помещении, в результате чего на неосвещенной стороне скорлупы образуются тени от внутренних структур. Для этого используют овоскоп. Определяют, жив зародыш или погиб. Живой зародыш, как правило, активно двигается, сосуды на ХАО достаточно кровенаполнены.

На скорлупе карандашом отмечают границу воздушной камеры, место расположения зародыша и участок бессосудистой зоны размером 0,5х0,5 см. Эти отметки являются ориентиром при выборе места введения вируссодержащего материала.

Заражение проводят в асептических условиях, лучше в боксе. Для этого в предбоксе скорлупу эмбрионов обрабатывают йодированным спиртом, затем повторно протирают в боксе. Можно для этих целей использовать и фламбирование - обработку пламенем смоченного спиртом тампона. В работе также используют стерильные инструменты. Их ставят в баночку со спиртом и обжигают пламенем горелки перед каждым повторным использованием. Эмбрионы фиксируют на подставке, которую устанавливают в кювете на смоченной дезинфицирующим раствором марлевой салфетке.

Методика заражения куриных эмбрионов

Выбор метода определяется тропизмом вируса и целью заражения. Разработано шесть методов заражения эмбрионов. Заражение в аллантоисную полость и на ХАО используют более часто. Реже заражают в амниотическую полость и в желточный мешок, и совсем редко - в тело зародыша и в кровеносные сосуды ХАО. Объем инфекционного материала для заражения при любом методе составляет 0,1-0,2 мл.

Заражение в аллантоисную полость

При заражении этим методом хорошо размножаются вирусы гриппа, ньюкаслской болезни, ринопневмонии лошадей и др. Существует несколько вариантов этого метода. Первый вариант: эмбрион фиксируют вертикально тупым концом вверх. В скорлупе на стороне зародыша на 5-6 мм выше границы воздушной камеры делают отверстие диаметром около 1 мм. Иглу вводят параллельно продольной оси на глубину 10-12 мм. После инъекции вирусосодержащего материала иглу извлекают, а отверстие в скорлупе закрывают каплей расплавленного стерильного парафина.

Второй вариант: эмбрион фиксируют в горизонтальном положении и делают в центре над воздушной камерой отверстие для выхода воздуха. Отверстие же для самого заражения делают на участке бессосудистой зоны хорионаллантоисной оболочки (ХАО) со стороны зародыша. Иглу вводят на глубину не более 2-3 мм, после инъекции закрывают отверстие парафином.

Заражение на хорионаллантоисную оболочку

Часто этот метод используют для культивирования эпителиотропных и пантропных вирусов оспы, инфекционного ларинготрахеита птиц, чумы плотоядных, болезни Ауески. Такое заражение также выполняют в разных вариантах. В первом варианте для заражения через естественную воздушную камеру эмбрион помещают вертикально тупым концом вверх и в скорлупе против центра воздушной камеры вырезают круглое окно диаметром 15-20 мм. Через него пинцетом снимают подскорлупную оболочку и на обнажившийся участок ХАО наносят вирусосодержащий материал. Отверстие закрывают лейкопластырем или покровным стеклом с использованием расплавленного парафина. Заражение через искусственную воздушную камеру применяют чаще первого, поскольку обеспечивается контакт вирусосодержащего материала с большей поверхностью ХАО, и поэтому больше накапливается вируса. При этом эмбрион фиксируют горизонтально зародышем вверх. В скорлупе делают два отверстия: одно небольшое над центром воздушной камеры - для отсасывания воздуха, а другое - сбоку со стороны зародыша, диаметром 0,2-0,5 см. Сложность этого варианта заражения в том, что делать второе отверстие нужно осторожно - снять кусочек скорлупы и, не повреждая ХАО, сдвинуть подскорлупную оболочку в сторону так, чтобы через образовавшийся дефект мог пройти воздух. После этого резиновой грушей через первое отверстие отсасывают воздух из естественной воздушной камеры. В результате через боковое отверстие наружный воздух устремляется внутрь, образуя искусственную воздушную камеру, дном которой является ХАО. На поверхность ХАО и наносят вирусосодержащую жидкость, а отверстие закрывают лейкопластырем. Первое отверстие над воздушной камерой не закрывают, так как внутренний листок подскорлупной оболочки не нарушен и играет роль защитного барьера. Инкубацию эмбрионов проводят в горизонтальном положении.

Заражение в желточный мешок

Этот метод используют для культивирования хламидий, вируса болезни Марека, ринопневмонии лошадей, катаральной лихорадки овец. Также существует несколько вариантов. В первом варианте эмбрион фиксируют вертикально тупым концом вверх. Делают отверстие над центром воздушной камеры и вводят иглу на глубину 3,5-4,0 см под углом 45°С в направлении, противоположном от зародыша.

Второй вариант заключается в том, что эмбрион фиксируют горизонтально, при этом зародыш находится внизу, а желток - над ним. Через отверстие в скорлупе в желток, который находится сверху, вводят инфицированный материал.

Заражение в амниотическую полость

Заражение в амниотическую полость проводят закрытым и открытым способом. Таким образом, культивируют вирус гриппа, ньюкаслской болезни, ринопневмонии лошадей. Закрытый способ: заражение проводят в затемненном боксе, фиксируя эмбрион на овоскопе в горизонтальном положении зародышем вверх. Через отверстие в скорлупе над воздушной камерой вводят иглу с затупленным концом по направлению к зародышу. При правильном введении тело зародыша движется в направлении передвижения иглы.

Открытый способ: эмбрион фиксируют горизонтально и срезают скорлупу над воздушной камерой размером 1,5-2,5 см в диаметре. Пинцетом снимают подскорлупную оболочку. Затем анатомическим пинцетом (14 см) с сомкнутыми браншами продавливают ХАО по направлению к зародышу и захватывают амниотическую оболочку, подтягивая ее к отверстию. Удерживая левой рукой пинцет с фиксированной оболочкой амниона вводят вирусосодержащий материал. После инъекции все оболочки опускают, отверстие закрывают лейкопластырем.

Заражение в тело зародыша

Заражение в тело зародыша проводят так же, как в амнион, закрытым и открытым способом. Разница в том, что подтягивают тело зародыша и используют острую иглу, проследив подчинение зародыша движению иглы. Материал можно вводить в головной мозг или определенные участки тела. При этом может быть значительный процент неспецифической гибели эмбрионов.

Заражение в кровеносные сосуды ХАО

При овоскопировании 11-13-дневных эмбрионов отмечают крупный кровеносный сосуд. По его ходу удаляют участок скорлупы, наносят каплю спирта, что делает прозрачной подскорлупную оболочку. Иглу вводят в сосуд, под контролем глаза на овоскопе. При этом сосуд будет двигаться при небольших боковых движениях иглы.

Описанные технические приемы экспериментального заражения куриных эмбрионов не единственные, имеют различные варианты. Зараженные эмбрионы помещают для дальнейшей инкубации в термостат (как правило, 37°C) для дальнейшей инкубации, при которой происходит репродукция внесенного вируса и накопление его. За эмбрионами ведут постоянное наблюдение, просматривая на овоскопе, отбирают павшие. Гибель в первые 24 часа после заражения считается неспецифической (обусловленной травмированием или размножением бактерий). Погибших в более поздние сроки эмбрионов переносят в холодильник с температурой 4°C, при этом сохраняется активность вируса и уплотняются ткани эмбриона.

Эмбрионы инкубируют до момента максимального накопления вируса, для каждого вируса и даже штамма эти сроки варьируют от 2 до 7-8 суток (вирус инфекционного ларинготрахеита - 5 дней, ньюкаслской болезни штамм Н - 2-3 дня, штамм В, - 5 дней). Затем всех эмбрионов умерщвляют охлаждением при 4°C в течение 3-4 часов и вскрывают.

Признаки размножения вируса в курином эмбрионе

Обнаружить вирус в курином эмбрионе можно по следующим признакам. Во-первых, это гибель куриного эмбриона в характерные для данного вируса сроки. Во-вторых, иногда, даже если гибели зараженного эмбриона не происходит, при вскрытии его обнаруживаются патологоанатомические изменения, появляющиеся в различных структурах эмбриона. Поражения ХАО в виде отека, кровоизлияний, узелков (оспин) наблюдают при заражении куриных эмбрионов вирусами оспы птиц, инфекционного ларинготрахеита птиц, болезни Ауески и некоторыми другими. Размер и морфология оспин могут заметно различаться при размножении разных вирусов. Кроме того, патологоанатомические изменения наблюдаются в самом зародыше: он может отставать в росте и развитии от незараженных (феномен карликовости), обезживаться и мумифицироваться, у него характерно перекручивается шея. Эти изменения в зараженном эмбрионе проявляет вирус инфекционного бронхита кур. Кожа зародыша может быть гиперемирована, с кровоизлияниями. Изменения могут наблюдаться и во внутренних органах: набухшая желто-зеленого или темно-зеленого цвета печень зародыша является результатом действия вируса гепатита утят. Некоторые вирусы, размножаясь в курином эмбрионе, не вызывают ни их гибели, ни патологических изменений в органах. Такие вирусы, если они обладают способностью агглютинировать эритроциты, можно обнаружить при помощи реакции гемагглютинации (РГА).

Вскрытие куриного эмбриона и получение вирусосодержащего материала

С целью обнаружения признаков размножения вируса в эмбрионе и получения вирусосодержащего материала эмбрион вскрывают, соблюдая правила асептики. Перед вскрытием скорлупу эмбриона обрабатывают йодированным спиртом или фламбируют. Вскрытие проводят в боксе, пользуясь стерильными инструментами и посудой. Скорлупу срезают над той воздушной камерой, через которую заражали. Яйцо необходимо держать под наклоном, чтобы скорлупа не лопнула вовнутрь. Ножницы не должны касаться и повреждать оболочку под воздушной камерой. Вирусосодержащим материалом могут служить те структуры эмбриона, где накопился вирус - ХАО, ткани зародыша, стенки желточного мешка, аллантоисная и амниотическая жидкости.

ХАО осматривают, особенно ту часть, на которую провели заражение. В качестве вирусосодержащего материала эту часть ХАО вырезают или берут всю ХАО. Для этого зародыш, желток и белок удаляют, а ХАО отслаивают от внутренней поверхности скорлупы, извлекают в стерильную чашку Петри, где ополаскивают её с физиологическим раствором и расправляют в один слой. Осматривать лучше на черном фоне, так более отчетливо видны патологоанатомические изменения.

Аллантоисная и амниотическая жидкости представляют собой готовую суспензию вируса. Аллантоисную жидкость до 10 мл отсасывают пипеткой, которой прокалывают подскорлупную оболочку и ХАО над телом зародыша. Амниотическую жидкость (до 1 мл) можно собрать, удалив аллантоисную жидкость. Пипетку вводят при этом в амнион между головой и телом зародыша.

Стенки желточного мешка получают путем извлечения желтка, разрезания его стенки и ополаскивания его в чашке Петри с физиологическим раствором. Тело зародыша извлекают пинцетом за шею.

Весь полученный вирусосодержащий материал подвергают бактериологическому контролю путем посева на МПА, МПБ, МППБ и среду Сабуро. Хранят при температурах минус 25°C или ниже.

Самостоятельная работа студентов.

1. Изучить строение куриного эмбриона по схеме.
2. Провести овоскопирование КЭ.
3. Работая в парах, студенты заражают КЭ одним из способов.
4. Работая в парах, студенты умерщвляют охлаждением и вскрывают куриный эмбрион через 5-7 дней после заражения.
5. Отбирают патматериал, извлекают и рассматривают ХАО, отбирают оболочки КЭ, отсасывают амниотическую и аллантоисную жидкости. Делают мазки из патматериала, замораживают вирусосодержащий материал для дальнейших исследований.

Занятие 9-10. Культивирование вирусов на культурах клеток

Цель занятия: изучить виды и методики получения культур клеток, получить первично трипсинизированную культуру клеток из тканей КЭ.

Оборудование и материалы: методические указания по теме «Культивирование вирусов в клеточных культурах», растворы Хенкса и Эрла, питательные среды 199 и Игла, гидролизат лактальбумина, матрасы, флаконы, 9-12 дневные КЭ, лабораторная посуда, трипсин, центрифуга, магнитная мешалка, лед, камера Горяева, овоскоп, микроскопы.

Теоретическая часть.

Культура клеток - это клетки многоклеточного организма, живущие и размножающиеся в искусственных условиях вне организма (in vitro). Культуру клеток можно получить практически из любого органа или ткани человека или животного (взрослого или эмбриона), лучше - из эмбриональных органов, так как клетки эмбрионов обладают более высокой потенцией роста. Чаще всего для этих целей используют почки, легкие, кожу, тимус, тестикулы эмбрионов или молодых животных.

Культуры клеток - наиболее совершенная из лабораторных система для культивирования вирусов. В вирусологической практике культуры клеток чаще всего используют для:

- первичного обнаружения вирусов и их выделения из патологического материала;
- накопления вируса при изготовлении вакцин и диагностикумов, поддержания вирусных штаммов в лаборатории;
- титрования вирусов;
- как тест-объект в реакции нейтрализации.

Различают следующие виды культур клеток: первично-трипсинизированные, субкультуры, перевиваемые, диплоидные, суспензионные и культуры клеток на микроносителях (сефадекс, силикагель и т.д.).

Первично-трипсинизированные культуры клеток - клетки, полученные непосредственно из органов или тканей организма, растущие in vitro в один слой. Субкультуры получают из первичных клеток, выращенных в матрасах, путем снятия их со стекла раствором версена (трипсина) и ресуспендирования в новой питательной среде. Через 2-3 суток вырастает новый монослой. Перевиваемые культуры клеток - клетки, снятые, перевитые, пассажированные из первичных клеток с повышенной активностью роста более 10 раз. Они способны размножаться вне организма неопределенно длительное время.

Диплоидные культуры клеток - клетки, стабилизированные в процессе культивирования и сохранившие в процессе пассирования кариотип, свойственный исходной ткани, но имеющие ограниченные возможности пассирования (до 50 раз). Их получают также из первичных культур клеток.

Суспензионные - это культуры клеток, выращенные в свободно суспендированном состоянии. Таким образом, культивируются только перевиваемые клетки. Культуры клеток, полученные методами суспензионного культивирования и формирующие монослой на микроносителях (силикагель, сефадекс), называют поверхностно-зависимые, их можно выращивать из первичных, субкультур и диплоидных клеток.

Фазы развития культуры клеток

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

Обычно монослой формируется через 3-5 дней. Скорость его формирования зависит от вида ткани, возраста животного, качества питательной среды, посевной

концентрации клеток и других факторов. Питательную среду меняют по мере загрязнения ее продуктами жизнедеятельности клеток. Монослой сохраняет жизнеспособность в течение 7-21 дня (в зависимости от вида клеток и состава питательной среды). Интенсивность размножения клеток и состояние монослоя контролируют визуально под малым увеличением микроскопа (объектив x 10). Для культивирования вирусов используют молодые культуры клеток (как только сформировался монослой). Для получения первично-трипсинизированной культуры клеток можно использовать куриные эмбрионы 9-11-дневной инкубации.

Методика получения первично-трипсинизированной культуры клеток из тканей, органов и куриных эмбрионов

Для получения первичных клеток от здорового животного не позднее 2-3 ч после убоя берут соответствующие органы или ткани, измельчают их на кусочки (1-4 мм) и обрабатывают ферментами: трипсином, панкреатином, коллагеназой и другими (чаще трипсином). Ферменты разрушают межклеточное вещество в клетке. Перед трипсинизацией измельченную ткань 2-3 раза отмывают раствором Хенкса от слизи и кровяных элементов до получения прозрачных сливных вод и переносят в колбу для трипсинизации. В колбу наливают 0,15 % раствор трипсина, подогретого до 35-37°C (соотношение ткани и трипсина 1:3), вносят стерильный магнитик и ставят на магнитную мешалку. Трипсинизацию проводят дробно, т.е. через каждые 3-5 мин отделившиеся клетки вместе с трипсином сливают в центрифужные флаконы и помещают на лед или в холодильник для прекращения действия трипсина на клетки. К оставшемуся в колбе содержимому добавляют новую порцию трипсина. Скорость вращения на магнитной мешалке регулируют так, чтобы не было пены. Процесс повторяют несколько раз (3-5) до полного истощения ткани.

После трипсинизации суспензию клеток в растворе трипсина центрифугируют при 1000 мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость сливают (выбрасывают), а осадок клеток ресуспендируют в теплой (37°C) питательной среде (в заведомо известном объеме) и фильтруют через 3-слойный марлевый фильтр.

После тщательного перемешивания клеток берут 1 мл для подсчета клеток. Успех культивирования клеток в значительной степени зависит от посевной дозы. При малом количестве клеток не наблюдается образование монослоя даже при длительном культивировании. При слишком большой дозе клеток происходит интенсивная их пролиферация, и образованный слой клеток значительно раньше подвергается старению и неспецифической дегенерации. Клетки подсчитывают в камере Горяева. К 1 мл взвеси клеток добавляют равный объем 0,1 % раствора кристаллвиолета, приготовленного на 0,1 н. растворе лимонной кислоты. После перемешивания камеру заполняют взвесью клеток и подсчитывают все клетки, имеющие ядро и неповрежденную цитоплазму; группу клеток с явными контурами считают за одну клетку.

Полученные при этом отдельные клетки суспендируют в питательной среде и культивируют на внутренней поверхности пробирок или матрасов в термостате при 37°C. Клетки прикрепляются к стеклу и начинают делиться.

Для успешного выделения вируса необходимо соблюдать следующие требования к культуре клеток:

1. Используемая культура клеток должна быть чувствительной к предполагаемому вирусу.
2. Вирусодержащий материал не должен быть старым, долго хранившимся.
3. Культивирование проводят при определенном соотношении вируса и клеток, т.е. при определенной множественности заражения.
4. Распределение вируса в монослое при заражении должно быть равномерным.
5. Оптимальная температура для размножения вируса 36-38°C.
6. Не допускать длительного нахождения образовавшегося свободного вируса в теплой среде.

7. Получать вирус лучше при 75 % цитопатического действия. Методика культивирования вирусов в культуре клеток сводится к подбору культуры клеток; заражению клеток вирусосодержащим материалом, культивированию вируса в клетках с последующей индикацией (обнаружением) вируса в культуре клеток и идентификацией вируса в культуральной жидкости.

Не всякая клетка чувствительна к любому вирусу. Для культивирования некоторых вирусов до сих пор неизвестно ни одной клеточной системы. Успешнее всего вирус адаптируется при условии, если культура клеток получена из органов животного, естественно восприимчивого к данному вирусу. Также для культивирования необходимо использовать молодые клетки, т.е. в первый день формирования монослоя. В некоторых случаях культуру клеток заражают при их посеве, так как вирус лучше размножается в интенсивно делящихся клетках (парвовирус свиней).

Заражение клеток

Для заражения клеток отбирают пробирки (матрасы) со сплошным клеточным монослоем, просматривая их под малым увеличением микроскопа. Ростовую питательную среду сливают, клетки 1-2 раза промывают раствором Хенкса, чтобы удалить сывороточные антитела и ингибиторы. В каждую пробирку вносят по 0,1-0,2 мл вирусосодержащего материала и покачиванием распределяют его равномерно по слою клеток. Оставляют так пробирки на 1-2 часа при 22-37°C для адсорбции вируса на поверхности клеток. Затем вирусосодержащий материал удаляют из пробирок, если требуется, то монослой клеток отмывают раствором Хенкса и наливают поддерживающую среду до 1-2 мл (в матрасы до 10 % его объема).

Культивирование вируса

Пробирки закрывают герметично и ставят на инкубирование в термостат 37°C в горизонтальном положении под углом 5 градусов так, чтобы монослой клеток оказался под питательной средой (чертой вверх). Эффективнее для культивирования использовать вращающиеся системы — роллеры.

Для каждой пробы материала используют не менее 4 -10 пробирок с культурой клеток и оставляют 4-6 пробирок контрольных - с незараженной культурой, в которые добавляют поддерживающую среду. При культивировании вирусов питательную среду можно не менять в течение 7 дней, а pH среды (6,9-7,4) поддерживают с помощью 7,5 % раствора бикарбоната натрия. При более длительном культивировании (аденовирусы) среду меняют.

Все пробирки после заражения ежедневно исследуют под малым увеличением микроскопа, сравнивая с контрольными. Адсорбированные на клетках вирусные частицы проникают внутрь, начинается их репродукция. Образовавшиеся вирусные частицы проникают в неповрежденные клетки, репродуцируются в них и поражают новые клетки до тех пор, пока есть живые неповрежденные клетки.

Вирус накапливается в основном в культуральной жидкости, но часть вирионов может оставаться и внутри не разрушенных вирусом клеток. Чтобы оставшийся в клетках вирус освободить, клетки тщательно разрушают многократным замораживанием - оттаиванием (2-3 раза) или с помощью ультразвука.

Индикация вируса в культуре клеток

Обнаружить признаки размножения и накопления вируса в культуре клеток можно несколькими методами: по цитопатическому действию или эффекту (ЦПД или ЦПЭ), по положительной реакции гемадсорбции (РГАд), по образованию бляшек, по обнаружению внутриклеточных включений, по выявлению вирусов в реакции иммунофлуоресценции (РИФ), по обнаружению интерференции вирусов, по подавлению метаболизма клеток (цветная проба); электронной микроскопией и др.

ЦПД (цитопатическое действие) - любые изменения клеток в культуре клеток под влиянием размножающегося в них вируса. Морфологические изменения в клетке можно обнаружить микроскопированием при малом увеличении (объектив x 8-10, окуляр x 7-10)

слоя клеток в пробирке. При этом сравнивают зараженные культуры клеток с контрольными. Любые наблюдаемые отличия можно считать проявлением ЦПД.

ЦПД в культуре клеток способно вызывать большинство вирусов, поэтому данный метод индикации вирусов в культуре клеток широко применяется. Интенсивность ЦПД выражается тем, какая часть клеточного монослоя изменена вирусом, и оценивается в крестах или баллах:

- изменению подвергся весь монослой ++++
- изменению подверглось 3/4 монослоя +++
- изменению подверглось 1/2 монослоя ++
- изменению подверглось 1/4 монослоя +

Время проявления и формы ЦПД зависят от биологических свойств вирусов, вида клеток, дозы заражения, условий культивирования и т. д. Наиболее существенно различаются между собой три формы ЦПД: фрагментация, округление и симпластообразование. Фрагментация клеток - разрушение клеток на отдельные фрагменты, которые отделяются от стекла и переходят в культуральную жидкость в виде клеточного детрита (вирус везикулярного стоматита).

Округление - потеря клетками способности прикрепляться к стеклу, вследствие чего клетки, обычно распластанные по стеклу, принимают шаровидную форму, отделяются от стекла и свободно плавают в культуральной жидкости, где и погибают (энтеровирусы, аденовирусы).

Симпластообразование - растворение клеточных оболочек, вследствие чего цитоплазмы соседних клеток сливаются, образуя одно целое, в котором располагаются, чаще по периферии, ядра клеток. Такие образования из цитоплазматической массы со многими ядрами называются симпластами (гигантские многоядерные клетки).

Отсутствие ЦПД в первом пассаже еще не говорит об отсутствии вируса, который не всегда размножается настолько быстро, чтобы вызвать ярко выраженное ЦПД. Поэтому прибегают к «слепым» пассажам - их проводят не менее трех, прежде чем судить о наличии вируса в исследуемом материале.

Однако есть вирусы, которые, размножаясь в культуре клеток, ЦПД не вызывают (вирус бешенства, классической чумы свиней). Клетки остаются жизнеспособными, но интенсивность клеточного деления понижается, со временем изменяется и их морфология.

Самостоятельная работа студентов.

1. Получить первично трипсинизированную культуру клеток из тканей КЭ.
2. Заразить культуру клеток вирусосодержащей суспензией.
3. Пронаблюдать ЦПД, вызванное вирусом в культуре клеток.

Занятие 12. Методы титрования вирусов

Цель занятия: ознакомить студентов с методами количественного определения вирусов.

Оборудование и материалы: задания, логарифмические таблицы.

Теоретическая часть.

Под титром вируса понимают выражение его концентрации в материале. Титр вируса - это количество вируса, содержащееся в единице объема материала. В вирусологической работе при экспериментальном заражении или производстве и оценке активности противовирусных и диагностических препаратов постоянно возникает необходимость определения количества вирусов в том или ином материале. Количество вируса выражают в единицах действия или единицах активности.

Вирусы обладают инфекционным и гемагглютинирующим действием. Отсюда и единицы количества вирусов инфекционные и гемагглютинирующие. В практике используют три типа единиц количества вируса:

1. Инфекционные единицы локальных повреждений, вызываемых вирусами и оцениваемых по единичному эффекту.
2. Инфекционные единицы 50% действия вирусов на чувствительные живые объекты, оцениваемые статически.
3. Гемагглютинирующие единицы.

Методика определения титра вируса в БОЕ

Из локальных повреждений, вызываемых вирусами, наиболее известны бляшки (островки мертвых, не окрашенных клеток в слое окрашенных живых) в зараженных культурах клеток, залитых агаровой средой с красителем нейтральрот и оспины (некротические узелки) на ХАО куриных эмбрионов, зараженных оспенными и некоторыми другими вирусами.

Количество вируса при этом может быть измерено, соответственно, в бляшкообразующих единицах (БОЕ) и оспообразующих единицах (ООЕ): 1 БОЕ = доза вируса, вызвавшая образование одной бляшки; 1 ООЕ = доза вируса, вызвавшая образование одной оспины. Методика определения титра вируса в БОЕ (ООЕ) заключается в следующем:

1. Точно отмеренными и строго одинаковыми объемами исследуемого вирусосодержащего материала заражают несколько культур клеток в матрасах или куриных эмбрионов на ХАО.

2. Подсчитывают количество образовавшихся в каждом матрасе бляшек или в каждом курином эмбрионе оспин.

3. Рассчитывают среднее арифметическое этого количества, которое равно количеству БОЕ или ООЕ вируса в заражающей дозе вирусосодержащего материала.

4. Титр вируса (Т) рассчитывают по формуле:

$$T = \text{среднее арифметическое количество бляшек (оспин)} / \text{объем заражающей дозы} \times \text{разведение вирусосодержащего материала}.$$

Считается, что счету поддаются бляшки и оспины, если их количество не превышает 50 на матрас или ХАО. Иногда, в случае высокой концентрации вируса в материале, бляшки в культуре клеток или оспины на ХАО могут сливаться, и их невозможно будет сосчитать. В таких случаях готовят несколько десятикратных разведений испытуемого материала и каждым разведением в одинаковых дозах заражают равные группы культур клеток или куриных эмбрионов, затем рассчитывают среднее арифметическое количество бляшек или оспин для каждого разведения. Титр вируса в этом случае рассчитывается по более сложной формуле:

$$T = \text{сумма средних арифметических количества бляшек (оспин) в каждом разведении} / \text{объем заражающей дозы} \times \text{сумму разведений вирусосодержащего материала}$$

Метод титрования вирусов в БОЕ дает наиболее достоверные данные о концентрации вирусов, но он встречает технические трудности с подсчетом бляшек. Что касается оспин, то их использование ограничивается довольно немногочисленными вирусами, способными образовывать узелки на ХАО куриных эмбрионов.

Метод образования бляшек основан на образовании вирусом в однослойных культурах, залитых агаровой средой, содержащей витальный краситель - нейтральрот, негативных колоний или бляшек. Бляшки представляют собой обесцвеченные участки культуры, состоящие из погибших под действием вируса клеток. Некоторые вирусы дают бляшки без покрытия слоем агара: вирус чумы крупного рогатого скота, осповакцины, некоторые вирусы герпеса.

При постановке бляшек лучше использовать культуры, выращенные во флаконах или матрасах, культура должна быть без признаков дегенерации. На клетки, промытые раствором Хенкса, наносят вирус в определенных разведениях и обеспечивают контакт вируса с клетками, периодически покачивая в течение 1-2 часов при температуре 37-38°C. Неадсорбированный вирус удаляют путем промывания раствором Хенкса или отсасывают пастеровской пипеткой, а на слой клеток наносят специальное агаровое покрытие, содержащее раствор Эрла, краситель, бычью сыворотку, антибиотики и другие компоненты. Выбор среды покрытия определяется видом клеток и вируса. После застывания с поверхности агара сливают конденсированную влагу, флаконы переносят в термостат и инкубируют клетками вверх при оптимальной для конкретного вируса температуре. За это время вирусы начинают поражать клетки. При этом раствор красителя окрашивает только живые клетки. Поэтому на сплошном красновато-розовом фоне слоя живых клеток появляются бесцветные пятна (бляшки) - пораженные вирусом клетки. Если вирус высокой концентрации, бляшки быстро сливаются. Время появления и морфология бляшек зависят от вида и штамма вируса, типа клеток и условий культивирования.

Метод определения титра вируса в единицах 50% инфекционного действия.

Этот метод более универсален. Количество вируса (титр вируса) при этом измеряется в эффективной 50% дозе – ЭД50.

1 ЭД50 = доза вируса, способная вызывать инфекционный эффект у 50% зараженных тест-объектов.

Для каждого вируса подбирают чувствительный к нему тест-объект - лабораторные животные (обычно белые мыши), куриные эмбрионы или культура клеток. Инфекционный эффект или действие вируса на разных тест-системах может проявляться гибелью, клиническими симптомами, патологоанатомическими изменениями и цитопатическим эффектом. У лабораторных животных и куриных эмбрионов действие вируса оценивается в летальной и инфекционной дозах:

1 ЛД50 - доза вируса, убивающая 50% лабораторных животных;

1 ЭЛД50 - доза вируса, убивающая 50% куриных эмбрионов;

1 ИД50 - доза вируса, вызывающая клинические симптомы или патологоанатомические изменения у 50% зараженных лабораторных животных;

1 ЭИД50 - доза вируса, вызывающая патологоанатомические изменения у 50% зараженных куриных эмбрионов.

В культуре клеток действие вируса оценивается по цитопатическому эффекту или действию (ЦПД):

1 ЦПД50 - доза вируса, вызывающая цитопатический эффект в 50% пробирок с зараженной культурой клеток.

Количество ЭД50 (ЛД50, ЭЛД50, ИД50, ЭИД50 и ЦПД50) вируса, содержащееся в единице объема вируссодержащего материала, будет выражением титра вируса в этом материале. Так, запись $T = 103.48 \text{ ЦПД50/0,1 мл}$ означает, что в каждом 0,1 мл вируссодержащего материала содержится 103.48 доз, каждая из которых способна вызвать цитопатический эффект в 50% пробирок с культурой клеток.

Метод титрования вирусов по 50% инфекционному действию пригоден для титрования практически любого вируса, если подобрать чувствительную к нему живую тест-систему. Недостатком является трудоемкость, длительность и необходимость статистического расчета.

Методика определения титра вируса в единицах 50% инфекционного действия (ЛД₅₀, ЭЛД₅₀, ИД₅₀, ЭИД₅₀ и ЦПД₅₀) заключается в том, чтобы найти такое разведение испытуемого вирусосодержащего материала, в объеме заражающей дозы которого содержалась бы одна ЭД₅₀, а затем рассчитать, сколько таких единиц вируса содержится в таком же объеме вирусосодержащего материала. Это и будет титр вируса. Для этого:

1) из исследуемого вирусосодержащего материала готовят ряд последовательных 10-кратных разведений. Количество разведений необходимо делать больше (т.е. столько, чтобы последнее наиболее высокое уже не давало инфекционного эффекта совсем). Для 10 последовательных разведений в каждую из 10 стерильных пробирок наливают по 9 мл стерильного физиологического раствора, а затем в первую вносят ровно 1 мл исследуемой суспензии. Перемешивают содержимое первой пробирки, набирают 1 мл смеси и вносят во вторую пробирку, перемешивают содержимое и 1 мл из второй пробирки - в третью, и т. д.,

2) одинаковыми объемами каждого разведения вирусосодержащего материала заражают чувствительных к данному вирусу живых тест-объектов. В каждой их группе требуется не менее 4-6 тест-объектов (для статистической достоверности);

3) по истечении времени учитывают результат действия вируса на зараженные объекты (гибель, заболевание, патологоанатомические изменения или цитопатический эффект). Гибель лабораторных животных, КЭ впервые 48 часов считают неспецифической. Учет заканчивают через 2 -3 суток после прекращения падежа;

4) определяют, в каком разведении вирус проявил свое действие на 50 % чувствительных объектов. Действие вируса определяют в ЛД₅₀, ЭЛД₅₀, ИД₅₀, ЭИД₅₀ и ЦПД₅₀. Считают, что доза в этом разведении соответствует 1 ЭД₅₀. Дозу вируса подсчитывают различными методами (по Риду и Менчу, Керберу).

Для проведения титрования из исследуемого вирусосодержащего материала готовят ряд последовательных десятикратных разведений от 1:10, т.е. 10^{-1} до 1:10.000.000, т. е. 10^{-7} , и более (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} и т.д.). Количество разведений зависит от предполагаемого титра вируса, их нужно готовить столько, чтобы последнее (наиболее высокое) разведение уже не давало бы инфекционного эффекта. Инфекционное действие вируса (величина инфекционного эффекта) с каждым разведением убывает пропорционально логарифму разведения (или дозы). То есть при разведении 1:100 (10^{-2}) инфекционное действие уменьшается в два раза, если 1:1000 (10^{-3}) в три раза и т. д.

Каждым разведением исследуемого вирусосодержащего материала в определенном одинаковом объеме заражают равные группы чувствительных к данному вирусу живых тест-объектов (лабораторных животных, куриные эмбрионы, культуры тканей). При этом учитывают тропизм и дозы вируса, общепринятые для данного способа введения материала. В каждой группе должно быть не менее 4-6 тест-объектов, т. к. при меньшем количестве статистическая обработка материала будет иметь слишком большую погрешность.

Однако, при определении титра вируса очень трудно подобрать такие разведения, чтобы одно из них в точности вызывало бы гибель 50% зараженных животных. Часто при титровании количество живых и павших животных бывает неравным. В этом случае для более точного определения титра широко используют в вирусологии метод, предложенный Ридом и Менчем. Они рекомендуют при титровании брать в опыт большое количество групп по 4-6 чувствительных моделей в каждой группе. Отклонение от истинной величины ЛД₅₀, обусловленное применением малого количества подопытных животных в группе, исправляется тем, что при исчислении процента летальности оперируют данными кумулятивной летальности (кумуляция - накопление).

Метод Рида и Менча основан на логической предпосылке о том, что животные (и другие модели), погибшие при заражении каким-либо разведением вируса, например 10^{-5} , погибли и при заражении более низким разведением (10^{-4} , 10^{-3}) вируса. Если же животное не пало при данном разведении, то останется живым и при заражении более высоким разведением (10^{-6} , 10^{-7}). На этом основании полученные результаты подвергают интерполяции и выражают их в виде кумулятивных данных, на основании которых рассчитывают % летальности.

При вычислении кумулятивных данных мышей, павших от более высокого разведения, прибавляют к числу погибших от более низкого разведения. Мышей, оставшихся живыми от более низкого разведения, прибавляют к числу животных, не погибших от более высокого разведения (направление показано стрелкой). После получения кумулятивных данных определяют % летальности. Процент летальности для каждого разведения вычисляют по формуле:

$\% \text{летальности} = \frac{\text{Кол-во павших (кумулятивные данные)}}{\text{Кол-во зараженных (кумулятивные данные)}} \times 100$

Разведения, при которых % летальности приближаются к 50%, называют высшей и низшей критической дозой.

ЛД50 определяют по формуле:

$b-50$

$\text{Lg ЛД50} = \text{Lg B} - \frac{b-50}{b-a} \times \text{Lg d}$

$b-a$

где ЛД50 - искомое разведения вируса; В - разведение, вызывающее гибель более 50% животных; b - процент летальности, соответствующий разведению В; а - процент летальности, соответствующий разведению, дающему гибель менее 50% животных; d - коэффициент разведения.

Титр вируса, выраженный числом с дробным показателем степени, обычно в таком виде и оставляют. Его можно легко превратить и в абсолютную величину с помощью таблицы антилогарифмов (4-х значные математические таблицы Брадиса). По таблице антилогарифмов находят абсолютное значение разведения, соответствующее 1 ЛД50.

Метод определения титра вируса в единицах гемагглютинирующего действия.

Некоторые вирусы при определенных условиях способны агглютинировать эритроциты определенных видов животных. Титр таких вирусов можно выразить в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ).

1 ГАЕ = доза вируса, способная агглютинировать около 50% эритроцитов, содержащихся в том же, что и вирус, объеме 1% суспензии отмытых эритроцитов.

Методика определения титра вируса по гемагглютинирующему действию такова:

- 1) готовят 1% суспензию отмытых эритроцитов животных определенного вида;
- 2) готовят ряд последовательных 2-кратных разведений исследуемого вирусосодержащего материала в плексигласовых пластинах в равных объемах;
- 3) ко всем разведениям вирусосодержащего материала добавляют 1% суспензию отмытых эритроцитов в таких же объемах;
- 4) смеси выдерживают установленное время при определенной температуре и оценивают интенсивность гемагглютинации в каждой лунке (пробирке) в крестах. То наивысшее разведение вирусосодержащего материала, с которым агглютинирует 50% эритроцитов (не менее чем на два креста), содержит 1 ГАЕ.

Титр вируса будет больше во столько раз, во сколько раз разведен материал, чтобы получить 1 ГАЕ. Если высшим разведением, дающим гемагглютинацию на два креста, будет 1:128, это значит, что в объеме титрования вируса, разведенного в 128 раз, содержится 1 ГАЕ. В этом случае титр вируса в неразведенном материале равен 128 ГАЕ.

Самостоятельная работа студентов.

1. Рассчитать титр вируса по контрольным заданиям индивидуально.

Занятие 12. Реакция гемагглютинации (РГА) и реакция задержки гемагглютинации (РЗГА) в вирусологии

Цель занятия: ознакомить студентов с принципом и методикой постановки реакций гемагглютинации и задержки гемагглютинации.

Оборудование и материалы: вирусосодержащий материал, 1% и 5% взвеси эритроцитов, вирусосодержащая взвесь, нейтрализующие сыворотки, полистироловые планшеты, предметные стекла, пипетки объемом 1 мл, стерильный физиологический раствор.

Теоретическая часть.

Вирусы, если они обладают способностью агглютинировать эритроциты, можно обнаружить при помощи реакции гемагглютинации (РГА). Гемагглютинирующими свойствами обладают те вирусы, вирионы которых имеют на поверхности рецепторы, способные взаимодействовать с рецепторами оболочек эритроцитов. Такие вирионы адсорбируются на поверхности одного или нескольких эритроцитов и склеивают их. При добавлении к капле отмытых эритроцитов капли суспензии гемагглютинирующего вируса, полученной от зараженного эмбриона, образуются хлопья, видимые невооруженным глазом, на поверхности стекла. В пробирке гемагглютинация будет выглядеть в виде «зонтика» осевших хлопьев эритроцитов. Положительная гемагглютинация, образовавшаяся через 5-10 минут, указывает на присутствие вируса в суспензии, а также выявляет гемагглютинирующую активность его с определенным видом эритроцитов, что служит вспомогательным диагностическим признаком.

РГА используется для индикации вирусных антигенов, титрования вирусосодержащих материалов, для ориентировочной диагностики некоторых вирусных инфекций, для очистки и концентрирования вирусов.

Для ориентировочной РГА используют чистые обезжиренные предметные стекла. На стекло наносят каплю 5% взвеси эритроцитов и добавляют вирусосодержащий материал. Компоненты тщательно перемешивают стеклянной палочкой. Результаты учитывают через 5-10 минут. В положительном случае образуются зерна агглютинации, смесь в капле при этом просветляется. При отрицательном результате гемагглютинации не наблюдается, взвесь в капле остается равномерно мутной.

Классический вариант РГА ставят в пробирках или лунках полистиролового планшета. Приготавливают двукратные разведения вирусосодержащего материала (от 1:2 или 1:10 до 1:320 и выше). Во все пробирки добавляют по 0,5 мл 1% взвеси отмытых эритроцитов. К опыту ставится контроль на стабильность эритроцитов: к 0,5 мл физиол. Раствора добавляют 0,5 мл 1% взвеси эритроцитов. Штатив с опытными и контрольной пробирками энергично встряхивают и оставляют при комнатной температуре или при 4°C на 30-40 минут. Эритроциты кур оседают за 30 минут, эритроциты млекопитающих оседают медленнее, обычно в течение 1-2 часов. В эти сроки проводят учет РГА по форме образовавшегося осадка эритроцитов: # - образуется характерный осадок эритроцитов в виде перевернутого «зонтика»; +++ - менее широкий кружевной осадок, а на дне пробирки (лунки) формируется небольшое кольцо более плотно осевших эритроцитов; ++ и + - эритроциты оседают на дно пробирки (лунки) в виде плотного диска с более или менее выраженной зернистой каймой по краям;

- образуется плотный осадок эритроцитов в виде диска с ровными краями.

Титром вируса (соответствующий 1 гемагглютинирующей единице)- считается наибольшее разведение, при котором реакция агглютинации эритроцитов оценивается на ++.

Принцип реакции задержки гемагглютинации (РЗГА): при взаимодействии вирусных антигенов со специфическими антителами иммунной сыворотки происходит подавление гемагглютинирующей активности вируса, выражающиеся в торможении (задержке) феномена агглютинации эритроцитов.

РТГА применяется для идентификации и типизации вирусов, титрования вирусосодержащих жидкостей и материалов, серологической диагностики вирусных инфекций.

Делают последовательные разведения сыворотки. Затем во все луночки добавляют оттитрованный вирусосодержащий материал в разведении соответствующем 4-кратной концентрации его титра установленного по РГА по 0,5 мл. Панель встряхивают и оставляют при комнатной температуре 10-15 минут для взаимодействия вируса с антителами сыворотки. После этого во все пробирки вносят по 0,5 мл 1% взвеси эритроцитов, встряхивают и оставляют при комнатной температуре на время, различное для разных видов вирусов. Положительная реакция – отсутствие гемагглютинации в основном опыте и ее наличие в контроле. Отрицательная реакция – наличие гемагглютинации.

Наивысшее разведение сыворотки, которое еще полностью тормозит гемагглютинацию, принимается за показатель титра антител в этой сыворотке.

Самостоятельная работа студентов.

1. Студенты, работая в парах, ставят РГА и РЗГА.
2. Определяют титр.

Занятие 13. Реакция гемадсорбции (РГад) и реакция задержки гемадсорбции (РЗГад) в вирусологии

Цель занятия: ознакомить студентов с принципом и методикой постановки реакций гемадсорбции и задержки гемадсорбции нейтрализации.

Оборудование и материалы: вирусосодержащий материал, однослойная культура клеток в пробирке или флаконе, 1% взвесь эритроцитов морской свинки или петуха в физиологическом растворе или растворе Хенкса (рН 7,2-7,4), физиологический раствор, раствор Хенкса, среда 199, лабораторная посуда (пробирки, пипетки и др.).

Теоретическая часть.

Гемадсорбция - это соединение эритроцитов с поверхностью пораженных вирусом клеток, основанное на родстве рецепторов вируса, находящихся на поверхности пораженной клетки, с рецепторами эритроцита, что приводит к их взаимному сцеплению аналогично реакции гемагглютинации. Преимущество этой реакции состоит в том, что она становится положительной еще до появления отчетливых цитопатических изменений в инфицированных клетках.

Методика постановки реакции состоит в том, что на 3-4 день после инфицирования клеток в пробирку с зараженной культурой клеток и контрольную, слив предварительно культуральную жидкость, вносят по 2-3 капли 0,5% суспензии отмытых эритроцитов. Выдерживают 5-10 минут, споласкивают физиологическим раствором и исследуют под микроскопом (малое увеличение). В контрольной пробирке эритроциты полностью удаляются с физиологическим раствором, а в зараженной - эритроциты прикреплены к поверхности клеток, т.е. реакция положительная.

В зависимости от вируса и вида клеток, расположение эритроцитов может быть различным: либо они адсорбируются по периферии клеточной массы в виде «ожерелья» (вирус африканской чумы), либо расположены на слое клеток очагами и скоплениями (вирус гриппа), либо расположены диффузно в слое клеток (вирус парагриппа).

При отсутствии гемадсорбции на 3-4 день после инфицирования через каждые 2-3 дня берут следующие пробирки с инфицированной культурой клеток и ставят РГад. Пробирки с культурой клеток находятся под наблюдением в течение 14-20 дней. При отрицательной реакции в первом пассаже проводят следующий пассаж и ставят реакцию.

Каждый вирус способен адсорбировать эритроциты крови животных определенных видов. Для постановки реакции используют эритроциты морской свинки, обезьян, человека (группы 0) и другие эритроциты, чувствительные к гемагглютинирующему действию изучаемого вируса. Метод этот пригоден для индикации в культуре клеток только некоторых вирусов и поэтому применяется нечасто. Однако для индикации ряда вирусов (парагриппа-3 крупного рогатого скота, парагриппа овец, вируса африканской чумы свиней) он незаменим.

РГад предложена для раннего обнаружения главным образом респираторных вирусов в различных патологических материалах, а также для количественного определения их содержания.

Принцип реакции задержки гемадсорбции заключается в том, что специфические противовирусные иммуноглобулины (антитела) гипериммунной сыворотки, взаимодействуя с антигенами гемадсорбирующих вирусов, развивающихся в клетках культуры ткани, блокируют их, в результате адсорбция эритроцитов на поверхности зараженных не наблюдается.

РЗГад применяется для обнаружения, идентификации и типизации вирусов в зараженной культуре клеток, а также для их количественного определения.

Из пробирок с культурой клеток, инфицированных вирусом, удаляют питательную среду с помощью стерильной пипетки и отмывают клетки от белковых веществ среды, добавляя в пробирки 3-5 мл стерильного раствора Хенкса. После 1-2 минутной экспозиции раствора Хенкса удаляют из пробирок с помощью пипетки. После этого в

каждую опытную пробирку вносят по 0,6 мл раствора Хенкса и 0,2 мл противовирусной сыворотки в разведении 1:10, в контрольную пробирку 0,8 мл раствора Хенкса. Пробирки фиксируют в наклонном положении (клетки снизу и покрыты: в опыте – раствором сыворотки, в контроле - раствором Хенкса) и выдерживают при комнатной температуре в течение 15-20 минут. Во все пробирки добавляют по 0,2 мл 0,4% взвеси эритроцитов и в наклонном положении оставляют на 3-5 минут. Пробирки 5-10 раз осторожно вращают в руках, поворачивая их вокруг вертикальной оси с целью ресуспендирования осевших, но не адсорбировавшихся эритроцитов и исследуют под микроскопом. Положительная РЗГад – эритроциты свободно плавают в жидкости без заметной адсорбции их на поверхности клеток. Отрицательная РЗГад – эритроциты адсорбированы на поверхности, инфицированных клеток.

Самостоятельная работа студентов.

1. Студенты делятся на две группы и осуществляют постановку РГад и РЗГад.
2. Сравнивают полученные результаты.

Занятие 14. Реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и диффузной преципитации (РДП) в вирусологии

Цель занятия: ознакомить студентов с принципом и методикой постановки реакций гемагглютинации и диффузной преципитации.

Оборудование и материалы: вирусосодержащий материал, диагностические сыворотки для РНГА и РДП, чашки Петри с 1% агарозой, физиологический раствор, лабораторная посуда (пробирки, пипетки и др.).

Теоретическая часть.

РДП применяется в настоящее время для диагностики вирусного гепатита плотоядных, бешенства, лейкоза КРС, инфекционной анемии лошадей и многих других болезней. По сравнению с другими серологическими реакциями эта реакция наиболее проста по технике и довольно специфична по показаниям, но несколько менее чувствительная.

Сущность реакции заключается в том, что специфические антиген и антитело, помещенные на определенном расстоянии друг от друга в агаровом геле, диффундируют в среду и в местах их встречи образуют полосы преципитации, хорошо видимые при нижнем боковом освещении на темном фоне. При несоответствии антигена антителам (в отрицательных случаях) полосы преципитации не образуются.

В РДП участвуют два компонента - антиген и сыворотка (антитело), проходит реакция в агаровом геле в присутствии в качестве электролита физиологического раствора хлористого натрия.

Для постановки реакции заранее готовят 1%-ный агаровый гель из высокоочищенных сортов агара. Лучше использовать агар Дифко, который в такой концентрации дает прозрачный гель, позволяющий четкой хорошо видеть полосы преципитации. Для приготовления агарового геля берут на литр дистиллированной воды 10 г агара, 8,5 г хлористого натрия и нагревают в кипящей водяной бане до полного расплавления агара. Затем добавляют в качестве консерванта мертиолят 0,1 г или кристаллическую карболовую кислоту 5,0 г. В горячем виде разливают по флаконам по 50-100 мл, стерилизуют автоклавированием при 0,8-1 атм. 20 минут (или в кипящей бане 30-40 минут) и хранят под резиновой пробкой до употребления, чтобы не было высыхания среды. Для увеличения контрастности среды иногда добавляют метилоранж (5:100.000). Другие сорта агара требуют предварительного их осветления. Для этого вначале готовят из агара 2%-ный раствор на дистиллированной воде, который после расплавления в кипящей бане в горячем виде разливают в ванночки толщиной в 1-1,5 см. После застывания агаровую пластинку разрезают на кусочки размером 0,5-1,0 см, которые промывают в течение 2-3 суток проточной водопроводной водой и затем еще сутки дистиллированной водой, меняя ее за это время 3-4 раза. После промывания агар отжимают в марле и вновь расплавляют в кипящей бане и разводят в 2 раза 1,7%-ным раствором хлористого натрия на дистиллированной воде, чтобы конечная концентрация агара была 1%, а хлористого натрия - 0,85%. В горячем виде раствор трижды фильтруют через бумажный фильтр (или ватно-марлевый) и после добавления консервантов разливают по флаконам и стерилизуют. В расплавленном виде агар должен быть совершенно прозрачным. В настоящее время готовый 1%-ный агар для РИД выпускают в наборе с диагностикумами при бешенстве, вирусном гепатите, лейкозе, ИНАН и других заболеваниях.

Ставят реакцию в чашках Петри или на предметных стеклах в микромодификации. При постановке реакции в чашках Петри отбирают чистые, хорошо мытые чашки с ровным дном. В чашку вносят расплавленный в кипящей бане 1%-ный агаровый гель в количестве 25-30 мл с таким расчетом, чтобы слой был 3-4 мм. После застывания агара в нем делают лунки, форма, количество и расположение которых в агаре может быть различное в зависимости от объема и цели исследования. Когда исследуют один антиген к

двум сывороткам (или наоборот) готовят три лунки. При диагностике бешенства антиген (суспензия мозга) исследуют к 4 разведениям антирабической сыворотки (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) и для этого готовят 5 лунок, одну из которых делают в центре, остальные четыре по периферии. При больших объемах исследований лунки часто располагают в форме шестиугольника (одна лунка в центре и шесть по периферии). Таких шестиугольников можно в одной чашке Петри приготовить 6-7 и, следовательно, можно исследовать 36-42 материала. Лунки чаще всего готовят круглой формы с диаметром в 4-5 мм и располагают друг от друга и от центральной лунки на расстоянии 5-6 мм. Для удобства работы и стандартизации расположения лунок можно приготовить трафаретку, которую помещают под дно чашки в процессе приготовления лунок. Лунки удобнее всего готовить путем выдавливания агара металлической или стеклянной тонкостенной трубкой диаметром 4-5 мм с надетым на конец трубки резиновым баллончиком (груша), с помощью которого отсасывают столбик выдавленного агара. Для создания дна у лунок в каждое приготовленное отверстие затем закапывают по одной капле расплавленного агара. В приготовленные таким образом лунки затем вносят антигены и сыворотки, каждый компонент соответственно в свою лунку по 3-4 капли (до заполнения лунки). После заполнения лунок чашку ставят в термостат при 37°C и, чтобы не было высыхания агара, в чашку кладут кусочек ваты, смоченной водой.

Учет реакции проводят через 24-48 и 72 часа. Для этого чашки вынимают из термостата и просматривают на темном фоне при нижнем боковом освещении с помощью осветителя к микроскопу. В положительных случаях между лунками со специфическими компонентами появляется за счет образования преципитата серо-белая полоса преципитации, хорошо видимая на темном фоне. Располагается полоса, как правило, перпендикулярно линии мысленно соединяющей лунки со специфическими компонентами. С целью усиления видимости полос иногда проводят обработку агара с прошедшей реакцией 0,065%-ным раствором сернокислого кадмия.

С целью экономии агара и при исследовании небольших количеств материала реакцию можно ставить на предметных стеклах. Для этого расплавленный агаровый гель наносят на чистое предметное стекло с таким расчетом, чтобы слой агара после застывания был 3-4 мм. После застывания агара в нем так же, как и в чашках Петри, делают лунки и в них вносят антиген, и сыворотки. Стекло с агаром затем помещают в чашку Петри, сбоку кладут кусочек ваты, смоченной водой, и ставят в термостат при 37°C. В этом случае реакция проходит быстрее и полосы преципитации появляются уже через 18-24 часа.

Одновременно с постановкой реакции ставят контроли: стандартной сыворотки со стандартным антигеном (реакция положительная), нормальной сыворотки со стандартным антигеном и нормальной сыворотки с исследуемым антигеном (реакции отрицательные).

В последние годы при диагностике вирусных болезней все шире внедряется РНГА (РПГА), которая более чувствительная, чем прямая РГА и является специфической серологической реакцией.

Целый ряд вирусов способны адсорбироваться на эритроцитах и при этом не вызывать их агглютинацию. Если же к таким эритроцитам, сенсibilизированным антигеном, т.е. несущим на себе адсорбированный вирус, добавить иммунную специфическую сыворотку происходит агглютинация эритроцитов с помощью антител иммунной сыворотки.

В настоящее время при некоторых вирусных болезнях разрабатываются и выпускаются предприятиями биопромышленности такие эритроцитарные диагностикумы. Эритроциты для лучшей адсорбции на них вируса (или антител) предварительно обрабатывают раствором таннина путем смешивания равных объемов 2,5% взвеси эритроцитов и раствора таннина (1:200.000), затем центрифугируют и отмывают фосфатным буфером. На обработанные таннином эритроциты затем адсорбируют вирус и

получают эритроцитарный антиген, который затем и используют для исследования сывороток крови на наличие антител. С целью выявления вируса в исследуемом материале и для его идентификации и типизации применяют эритроцитарный диагностикум, сенсibilизированный специфическими антителами, т.е. несущий на себе адсорбированные антитела.

Для постановки реакции в пробирки вносят по 0,5 мл соответствующего разведения исследуемой сыворотки (при исследовании на наличие антител) и 0,1 мл взвеси сенсibilизированных вирусом эритроцитов (эритроцитарный антиген). В качестве контролей ставят параллельно реакцию с положительной и нормальной сыворотками и этим же эритроцитарным антигеном. Пробирки после встряхивания ставят в термостат или оставляют при комнатной температуре на 40-60 минут и учитывают результат. Если исследуемая сыворотка иммунная, т.е. содержит антитела, происходит агглютинация эритроцитов (положительная реакция, животное инфицировано). Эта реакция более перспективна, чем прямая, для диагностики вирусов, и особенно тех, которые сами не обладают гемагглютинирующими свойствами.

Для выявления вируса в патологическом материале используют эритроцитарный диагностикум с адсорбированными антителами. Если в патматериале содержится вирус специфичный для антител, наступает агглютинация эритроцитов.

Самостоятельная работа студентов.

1. Студенты, работая в парах, ставят РНГА и РДП.
2. Сравнивают результаты.

Занятие 15. Иммуноферментный анализ (ИФА) в вирусологии

Цель занятия: ознакомить студентов с принципом и методикой постановки иммуноферментного анализа.

Оборудование и материалы: исследуемые сыворотки, набор для проведения ИФА при лейкозе КРС, лабораторная посуда (пробирки, пипетки и др.).

Теоретическая часть.

Группа методов, основанных на использовании в качестве метки антигенов и антител ферментов, носит название иммуноферментного анализа (ИФА). Основные направления применения ИФА: ранняя диагностика болезней, проведение массовых эпидемиологических и эпизоотологических исследований, контроль качества продукции и соблюдение санитарных норм на предприятиях. ИФА используется для выявления и идентификации вируса и антител к нему (у животных - реконвалесцентов) или исследования уровня поствакцинальных антител. Для идентификации вирусоспецифического антигена иммуноферментный тест применяют в двух вариантах: гистохимическом и твердофазном.

Гистохимический вариант ИФА, или иммунопероксидазная реакция

Иммунопероксидазная реакция аналогична методу иммунофлуоресценции, но отличается тем, что для постановки реакции используют антитела, меченые не флуорохромом, а ферментом, учет результатов реакции проводят не под люминесцентным, а под обычным световым микроскопом. В этом варианте ИФА используют антитела, меченые пероксидазой, так как ее молекулярная масса (40 000) меньше, чем молекулярная масса щелочной фосфатазы (100 000) и галактозидазы (150 000), что способствует лучшему проникновению пероксидазного конъюгата сквозь клеточную мембрану. Кроме того, пероксидаза устойчива при гистологической обработке.

Материал для выявления вирусспецифических антигенов

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

Иммунопероксидазную реакцию ставят в прямом и непрямом вариантах. *Методика прямого метода заключается в следующем:*

- 1) культуру клеток, выращенную на покровных стеклах и инфицированную вирусом, или мазки-отпечатки в течение 10 мин фиксируют охлажденным до минус 10 - минус 20°C ацетоном;
- 2) препараты высушивают на воздухе и наносят на них 0,2-0,3 мл иммунопероксидазного конъюгата в рабочем разведении, которое указано на ампуле;
- 3) инкубируют 1-2 часа, при необходимости - до 6 часов при 37°C во влажной камере;
- 4) в течение 15 мин тщательно промывают препарат физиологическим раствором, споласкивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе;
- 5) наносят на него несколько капель раствора субстрата - диаминобензидинтетрахлорида;
- 6) инкубируют еще 5-10 мин и промывают 10-15 мин в физиологическом растворе, споласкивают дистиллированной водой;
- 7) учитывают результат с помощью светового микроскопа.

В положительных случаях, т. е. при наличии антигена в исследуемом препарате, после нанесения иммунопероксидазного конъюгата образуется комплекс антиген - антитело, меченый ферментом. После нанесения на препарат раствора субстрата, последний под действием фермента разлагается, образуя цветной продукт ферментативной реакции (голубого цвета, быстро переходящего в коричневый), хорошо видимый в световом микроскопе. В препарате видны или диффузное желто-коричневое окрашивание, или гранулы коричнево-черного цвета. В контрольных препаратах окрашивания не обнаруживают. Вирусоспецифический антиген в мазках и гистосрезам обнаруживают тем же способом. Однако при исследовании срезов время инкубации препарата с конъюгатом нужно продлить до 20 ч при температуре 4°C или до 6 ч при температуре 37°C.

Непрямой иммунопероксидазный тест применяют для выявления вирусспецифического антигена. Преимуществом непрямого метода является универсальность меченых антивидовых глобулинов, а также большая чувствительность по сравнению с прямым.

Методика постановки непрямого метода схожа с вышеописанным прямым методом, с добавлением после третьего пункта дополнительно обработки препарата антивидовым иммунопероксидажным конъюгатом в объеме 0,2-0,3 мл и инкубирование при 37°C 1-6 ч. Далее также следуют процедуры, которые были описаны для прямого метода.

При наличии в исследуемом материале вирусспецифического антигена после внесения специфической сыворотки образуется комплекс антиген-антитело, для выявления которого используют антивидовые или вторичные антитела, меченные ферментом.

Таким образом, образуется более сложный, чем в первом случае, комплекс: антиген - антитело - вторичное антитело - фермент. Полученный комплекс выявляют добавлением субстрата, который под действием фермента разлагается, образуя цветной продукт ферментативной реакции. Учет результатов проводят, как и в первом случае, в световом микроскопе.

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

Методы твердофазного иммуноферментного анализа

Основан на применении антител (антигенов), фиксированных на нерастворимых носителях. В качестве носителей используют стеклянные или нейлоновые шарики, полистироловые или керамические пробирки и микропанели. В последнее время широкое использование в ИФА получили полистироловые микропанели. Применение их и автоматизация процесса постановки и учета реакции позволяют за короткое время исследовать большое число образцов сывороток на наличие антител и другого материала на наличие вирусспецифического антигена. В твердофазном ИФА используют как пероксидазные, так и щелочно-фосфатазные конъюгаты. Для исследования большого числа образцов с помощью твердофазного ИФА необходимо иметь: полистироловые микропанели с плоским дном, автоматические пипетки с переменным или постоянным объемом от 50 до 200 мкл, промывочное устройство -автоматическое или полуавтоматическое и считывающее устройство.

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

При визуальном учете при использовании субстрата ОФД положительные образцы имеют оранжево-коричневую окраску, а при применении 5-аминосалициловой кислоты опытные образцы окрашиваются в интенсивно-коричневый цвет, в то время как

отрицательный контроль либо совсем не окрашен, либо окрашен в слабо-желтый цвет. При использовании щелочной фосфатазы опытные образцы окрашены в желтый цвет.

За положительный результат принимают превышение оптической плотности опытных образцов над контрольными в 5-10 раз. Автоматизированный учет - результаты, получаемые с помощью иммуноферментного теста, можно оценивать автоматически - с помощью спектрофотометрии.

Часто ценной является качественная информация о наличии или отсутствии данного соединения в исследуемой пробе. В этих случаях учет результатов ИФА можно проводить визуально, по появлению окрашенного продукта ферментативной реакции. Возможность визуальной оценки результатов крайне важна при необходимости массовых исследований вдали от стационарных лабораторных центров.

Самостоятельная работа студентов.

1. Зарисовать схему проведения прямого и непрямого ИФА.
2. Студенты, работая в парах, ставят ИФА, используя тест-системы для выявления вируса лейкоза КРС.

Тема 16. Реакции связывания комплемента (РСК) и нейтрализации (РН) в вирусологии

Цель занятия: ознакомить студентов с принципом и методикой постановки реакций связывания комплемента и нейтрализации.

Оборудование и материалы: вирусосодержащий материал, сыворотки иммунная и нормальная, панели, пипетки, физраствор, задания по вычислению индекса нейтрализации, типоспецифические ящурные сыворотки, пробирки, водяная баня, комплемент, гемолизин, 2% взвесь эритроцитов.

Теоретическая часть.

РСК используют для обнаружения вирусного антигена в инфицированных тканях и жидкостях, установления уровня антител у естественно или искусственно зараженных животных и для изучения антигенных связей между вирусами различных видов или штаммов (идентификация). Постановка РСК при вирусных заболеваниях значительно отличается от техники постановки ее при бактериальных инфекциях. Это обусловлено специфическими свойствами вирусов: облигатные внутриклеточный паразитизм, лабильность вирусных антигенов к трупному аутолизу, неравномерность фиксации комплемента при различном соотношении концентраций антигена и антител, незначительный объем комплекса антиген + антитело, неравномерное накопление вирусного антигена и антител в различные периоды болезни при разных инфекциях.

РСК выполняется в два этапа: подготовительный (приготовление антигена, титрация гемолизина, комплемента) и заключительный (главный опыт РСК).

РСК для типизации вируса ящура.

Приготовление антигена. Экстракт из оболочек афт крупного рогатого скота, приготовленный на 50% растворе глицерина в фосфатном буфере (рН – 7,6) вводят в эпителий языка здоровых животных. Через 24-40 часов образуются первичные афты. На этой стадии отбирают оболочку пузырьков с прилипшей к ним лимфой, измельчают ножницами, растирают со свободными от извести стерильным морским песком и заливают двойным количеством (по весу) стерильного фосфатного буфера (рН – 7,6). После этого суспензию оставляют на 2-3 часа при 4°C и центрифугируют 15 минут при 15 тыс. об/мин. Надосадочная жидкость представляет собой готовый антиген.

Титрация гемолизина. Гемолизин титруют в гемолитической системе в разведениях 1:1500, 2000, 3000, 4000 и 1:5000. Реакцию учитывают после выдерживания разведений гемолизина 10 минут в водяной бане при температуре 37°C. Титром гемолизина считают то наивысшее его разведение, которое вызывает полный гемолиз эритроцитов. Рабочим разведением гемолизина считается 4-кратная концентрация его предельного титра.

Титрация комплемента. Комплемент титруют в гемолитической системе и обязательно в день постановки реакции. Его используют в разведении 1:20 в следующих дозах: 0,05, 0,10, 0,15 и т.д. с интервалами 0,05 до 0,40. В каждую пробирку недостающее количество до объема 0,5мл доливают физиологическим раствором. Это будет соответствовать 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5 и 4,0 % цельного комплемента, содержащегося в дозе 0,5 мл разведения с физиологическим раствором. Пробирки ставят в водяную баню на 15 минут при 37-38°C, после чего учитывают реакцию. Титром комплемента считается то наименьшее его количество, которое вызывает полный гемолиз эритроцитов. При определении типов вирусов ящура используют комплемент, который при указанных условиях имеет титр не ниже 2,5%. Для постановки главного опыта РСК комплемент берут с постоянным излишком в 1%.

Испытуемый антиген в реакции исследуют цельным (33% взвесь) и в разведениях 1:2, 1:4, 1:8.

Для определения типа вируса главный опыт РСК ставят в объеме 1 мл по следующей схеме:

Таблица 1.

Схема главного опыта РСК.

Компоненты	Типы сывороток			Без сыворотки
	А	О	С	
Сыворотки в рабочем титре	0,2	0,2	0,2	-
Испытуемый антиген (1:2)	0,2	0,2	0,2	0,2
Комплемент (2 ед.)	0,2	0,2	0,2	0,2
Физ. раствор	-	-	-	0,2
Водяная баня 20 минут при 37 - 38°C				
Гем. система	0,4	0,4	0,4	0,4
Водяная баня 30 минут при 37 - 38°C				
Пример результата	--	+	--	--

Условные обозначения: «+□» - задержка гемолиза;

«--» - гемолиз;

«-» - не полный гемолиз

В данном случае испытуемый антиген относится к типу «О».

Одновременно с главным опытом по определению типов вируса ящура ставят контроль ящурных компонентов, участвующих в реакции.

Учет результатов. Если испытуемая сыворотка содержит антитело, гомологичное антигену, используемому в реакции, образуется комплекс антиген + антитело, способный фиксировать на себе комплемент. В этом случае при добавлении компонентов гемолитической системы гемолиза не произойдет – реакция положительная. При отрицательной реакции комплемент остается в свободном состоянии и при добавлении эритроцитов, последние разрушаются – наступает гемолиз

Реакция нейтрализации вируса (РН) является одной из основных серологических реакций, широко используется для диагностики различных вирусных болезней, она наиболее специфична и высоко чувствительна, служит эталоном при оценке других реакций в вирусологии.

Сущность РН заключается в том, что при вирусных болезнях в крови появляются вируснейтрализующие антитела, которые при взаимодействии с вирусом (при смешивании вируса со специфической сывороткой), как в организме так и вне его (in vitro), способны обезвреживать его инфекционные свойства и способность вызывать заболевание у чувствительных лабораторных животных, куриных эмбрионов или вызывать цитопатогенные действия (ЦПД) в культурах ткани. Ставят РН на лабораторных животных, куриных эмбрионах или культурах ткани в зависимости от того, какая из этих живых моделей является чувствительной для данного вируса. Реакция нейтрализации основана на способности антител нейтрализовать некоторые специфические функции макромолекулярных или растворимых антигенов, например активность ферментов, вирусы и их токсины. При смешивании вирусов с соответствующей антисывороткой и введении этой смеси животным или в клеточные культуры патогенность вирусов нейтрализуется и при этом животные не заболевают, а клетки культур не подвергаются деструкции.

Самостоятельная работа студентов.

1. Работая в парах, студенты готовят вирусосодержащую взвесь из афт КРС.
2. Ставят главный опыт РСК: материал исследуют с сыворотками типа О, А и С для типизации вируса ящура.
3. Приготавливают разведения вирусосодержащего материала, смешанные с нейтрализующими сыворотками.

Занятие 117. Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) и метода ДНК-зондов в вирусологии

Цель занятия: развить у студентов знание молекулярно-биологических методов диагностики вирусных инфекционных заболеваний.

Оборудование и материалы: ПЦР - боксы с оборудованием, тест - системы для выявления ДНК- и РНК- содержащих вирусов методом ПЦР, материал и оборудование для проведения горизонтального электрофореза.

Теоретическая часть.

Преимущества полимеразной цепной реакции:

1. Позволяет выявлять вирусы независимо от фенотипической изменчивости.
2. Позволяет обнаруживать некультивируемые формы.
3. Высокая чувствительность: $10^3 - 10^4$ 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.

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.

Метод основан на многократном избирательном копировании определённого участка ДНК при помощи ферментов в искусственных условиях (*in vitro*). При этом происходит копирование только того участка, который удовлетворяет заданным условиям, и только в том случае, если он присутствует в исследуемом образце. В отличие от амплификации ДНК в живых организмах, (репликации), с помощью ПЦР амплифицируются относительно короткие участки ДНК. В обычном ПЦР-процессе длина копируемых ДНК-участков составляет не более 3000 пар оснований. С помощью смеси различных полимераз, с использованием добавок и при определённых условиях длина ПЦР-фрагмента может достигать 20-40 тысяч пар нуклеотидов. Это всё равно значительно меньше длины хромосомной ДНК эукариотической клетки. Например, геном человека состоит примерно из 3 млрд пар оснований.

Компоненты реакционной смеси.

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

1. Праймеры - искусственно синтезированные олигонуклеотиды, имеющие, как правило, размер от 15 до 30 п.н., идентичные соответствующим участкам ДНК-мишени. Они играют ключевую роль в образовании продуктов реакции амплификации. Правильно подобранные праймеры обеспечивают специфичность и чувствительность тест-системы. Специфичность ПЦР основана на образовании комплементарных комплексов между матрицей и праймерами. Каждый из праймеров комплементарен одной из цепей двуцепочечной матрицы, обрамляя начало и конец амплифицируемого участка.

После гибридизации матрицы с праймером (отжигом), последний служит затравкой для ДНК-полимеразы при синтезе комплементарной цепи матрицы.

2. 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. Они добавляют нуклеотиды к 3'-гидроксильной группе предыдущего нуклеотида в цепи ДНК, поэтому все полимеразы работают в направлении 5'--> 3'.

3. 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.

4. Анализируемый образец - подготовленный к внесению в реакционную смесь препарат, который может содержать искомую ДНК, например, ДНК микроорганизмов, служащую мишенью для последующего многократного копирования. При отсутствии ДНК-мишени специфические продукты амплификации (ампликоны) не образуются.

5. Буфер - смесь катионов и анионов в определенной концентрации, обеспечивающих оптимальные условия для реакции, а также стабильное значение pH. Ионы Mg^{2+} , необходимые для работы полимеразы. Концентрация $MgCl_2$ в буфере должна быть 1,5 – 2 мМ. Увеличение концентрации приводит к снижению специфичности реакции, но к повышению чувствительности. Буфер содержит соли, бычий сывороточный альбумин, ПЭГ, глицерин.

6. Чтобы избежать испарения реакционной смеси, в пробирку добавляют высококипящее вазелиновое масло. Если используется амплификатор с подогревающейся крышкой, этого делать не требуется.

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 Taq-полимераза начинает достраивание второй цепи ДНК с 3'-конца праймера.

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

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

Режим амплификации:

94°C	– 10-60 сек.	} 30-40 раз
55-72°C	– 10-60 сек.	
72°C	– 10-60 сек.	

Для РНК-содержащих вирусов перед проведением амплификации, осуществляют обратную транскриптацию с применением фермента ревертазы, для создания ДНК на матрице РНК. Полученную ДНК используют для постановки ПЦР.

Учет реакции проводится методом электрофореза фрагментов выделенной из материала и контрольной ДНК или по флуоресцентной метке, присутствующей на праймерах. В геле НК двигаются от минуса к плюсу и в зависимости от величины и структуры фрагмента, накапливаются в определенных участках агарозы. Сравнивается электрофоретическая подвижность образцов и положительного контроля.

Метод ДНК-зондов

Любой вирус включает одну специфичную для него молекулу (ДНК и РНК) со строго определенной последовательностью нуклеотидов и обладают комплементарностью. Чтобы обнаружить вирусную нуклеиновую кислоту в материале от больного животного, можно воспользоваться ее способностью после разделения цепей (если она двухцепочечная) образовывать снова двойную цепь с комплементарной ей молекулой нуклеиновой кислоты, предварительно как-либо помеченной.

Комплементарность - это способность двух одинарных нуклеиновых кислот, связанных водородными связями в одну двухцепочечную, если, последовательность нуклеотидов одной точно соответствует последовательности нуклеотидов другой так, что их азотистые основания могут образовывать пары А - Т и Г - Ц (молекула ДНК) или А - У и Г - Ц (молекула РНК).

Принцип метода ДНК-зондов заключается в том, что для обнаружения вирусной нуклеиновой кислоты в патологическом материале используют ДНК-зонды, т.е. меченные одноцепочечные молекулы нуклеиновой кислоты, которые комплементарны молекуле нуклеиновой кислоты специфичного (определенного) вируса и связываются с ней в двухцепочечную. Образовавшаяся двухцепочечная ДНК обнаруживается по включенному в нее зонду (метке).

Каждая молекула нуклеиновой кислоты - цепь нуклеотидов, каждый из которых состоит из азотистых оснований (Аденин, Гуанин, Цитозин, Тиамин или Урацил). Нуклеиновые кислоты различают двух видов: ДНК и РНК, различных по составу азотистых оснований и сахарами. У ДНК в нуклеотиде сахаром служит дезоксирибоза, и азотистые основания - А, Т, Г и Ц. У РНК - сахаром служит рибоза, а азотистые основания - А, У, Г, Ц. Соответствующие нуклеотиды могут связываться меж собой парами А - Т и Г и Ц.

Этапы метода ДНК-зондов

1. Получение одноцепочечного фрагмента ДНК определенного вируса -ДНК-зонда и его метка.

Для каждого вида вируса зонд готовят заранее: нарабатывают его, вводят в него радиоактивную метку или биотин, дающий изменения цвета, позволяющую обнаруживать зонд и соединившуюся с ним нуклеиновую кислоту. Хранят зонд до использования. Для получения зонда из материала от больного животного выделяют вирус, на который хотят получить ДНК-зонд. Методом электрофореза выделяют фрагмент ДНК вируса. Внедряют фрагмент ДНК вируса в ДНК бактерии (плазмиды) и клонируют в селективной среде, накапливая массу бактерий. После накопления из бактерий выделяют плазмидную ДНК с вирусными вставками, метят ее и денатурируют путем нагрева 80°C. что приводит к разделению двухцепочечной ДНК на одноцепочечные, имеющие фрагменты, комплементарные фрагментам одной из нитей ДНК вируса Это и есть зонд.

Для получения ДНК-зонда на вирусную РНК выделяют ее фрагмент, затем путем обратной транскрипции получают ДНК-фрагмент, который и встраивают в плазмиду.

С помощью ДНК-зонда можно обнаружить вирусные нуклеиновые кислоты в любом материале от больных животных. Для этой цели пригоден как свежий материал (ткани, смывы, кровь), так и высушенный, мороженный и даже частично разложившийся.

2. Этап выделения из патологического материала нуклеиновой кислоты - их денатурация (расплетение двухцепочечной молекулы на одноцепочечные). Для этого патологический материал гомогенизируют, суспендируют, центрифугируют и над осадочную жидкость обрабатывают препаратами, разрушающими белки (сначала протеиназой, затем фенолом с хлороформом). Затем осаждают ДНК при минус 70°C , осадок отмывают спиртом и подвергают денатурации путем кипячения или обработки щелочью.

3. Этап молекулярной гибридизации, т.е. процесс контакта и удвоения, исходных одно цепочечных ДНК (ДНК вируса и ДНК-зонда), если они взаимно комплементарны. Для этого полученные пробы из разных исследуемых материалов наносят на фильтр (микропористая мембрана), расчерченный на квадраты (для каждого материала свой номер квадрата). Зонд наклеивают на стекло, которое накладывают на фильтр с исследуемым материалом и выдерживают 20 мин при 80°C . затем еще 2 часа при 55° . Также готовят и контроля: отрицательный и положительный. Затем фильтр отделяют от стекла, промывают, сушат и удаляют с него все несвязавшиеся одноцепочечные молекулы ДНК, обрабатывая его додецилсульфатом и цитратом натрия.

4. Этап обнаружения (по метке) образовавшихся двухцепочечных молекул нуклеиновых кислот — проводят методом авто радиографии, выявляя радиоактивность, и сравнивая ее с контролями. Учет проводят визуально - по интенсивности потемнения фотопленки, контактировавшей с определенными квадратами. Потемнение свидетельствует о наличии в патологическом материале этих квадратов искомой нуклеиновой кислоты вируса.

Самостоятельная работа студентов.

1. Ознакомиться с методикой выделения нуклеиновых кислот при диагностике вирусных инфекций.

2. Изучить принцип работы амплификатора.

3. Освоить проведение горизонтального гельэлектрофореза.

Занятие 18. Решение диагностических задач

Цель занятия: развить у студентов знание методов диагностики вирусных болезней животных.

Оборудование и материалы: карточки с индивидуальными заданиями.

Теоретическая часть.

В связи с отсутствием эффективных мер специфической терапии вирусных болезней решающее значение в борьбе с ними являются меры профилактики и диагностики. Процесс постановки диагноза называется диагностикой. Своевременно и правильно поставленный диагноз обеспечивает успех ликвидации вспышки (эпизоотии) вирусных болезней. И наоборот, ошибочный диагноз влечет за собой распространение болезней и усложнение мероприятий по ее ликвидации.

Схема диагностики вирусных инфекций

Диагноз на инфекционное заболевание ставится комплексно, учитывая эпизоотологические данные, клинические признаки, данные патологоанатомического вскрытия и лабораторные исследования, то есть из долабораторной и лабораторной диагностики.

Долабораторная диагностика проводится непосредственно в хозяйстве, включает в себя анализ наблюдений и исследований клинического состояния животного, эпизоотологических данных с привлечением результатов вскрытия (патологоанатомические изменения). Эпизоотологические данные включают сведения:

- об охвате болезнью данного поголовья животных;
- о скорости и территориальном распространении болезни;
- о видах заболевших животных;
- о динамике выявления больных.

Клинические симптомы, то есть признаки болезни, включают:

- изменение температуры тела, пульса, дыхания;
- поведение животного, нарушение аппетита; состояние кожных покровов и слизистых оболочек;
- функционирование органов пищеварения, выделения и т.д.

Результаты вскрытия. По результатам вскрытия устанавливают макроскопически наблюдаемые патологоанатомические изменения (в сравнении с нормой) формы, размера, цвета, консистенции, положения органов животного, наличие кровоизлияний, новообразований, узелков и т. д. На основании этих данных ставится лишь предварительный диагноз. Также можно определить характер болезни (инфекционный или не инфекционный). При этом ориентируются на то, что каждая инфекционная болезнь (вирусной или невирусной этиологии) характеризуется комплексом клинических симптомов, эпизоотическими особенностями и патологоанатомическими изменениями, но нередко симптомы эти наблюдают при нескольких заболеваниях. Необходимо также учитывать, что нередко болезнь бывает вызвана не одним, а двумя и более этиологическими факторами (например, вирусное заболевание осложняется бактериальной инфекцией). Но, несмотря на ориентировочный характер предварительного диагноза, совокупность всех его данных ориентирует ветеринарного специалиста на несколько болезней из многих возможных. В соответствии с предполагаемым диагнозом, отбирается патологический материал для лабораторных исследований.

Лабораторная диагностика - окончательный диагноз на вирусную болезнь может быть поставлен только с учетом результатов лабораторных исследований, включающих методы экспресс-диагностики и вирусологического исследования.

Лабораторным исследованиям подвергают патологоанатомический материал от больных или павших животных. Задачи вирусологического исследования заключаются в обнаружении в нем вирусного агента и его идентификацию (установление видовой принадлежности). Обнаружение в патологическом материале следов пребывания вируса

возможно экспресс-методами: электронной и световой микроскопией, генетическим методом (ПЦР, ДНК-зонд), обнаружение телец-включений. Для обнаружения антигена вируса в патологическом материале можно воспользоваться любой серологической реакцией (РИФ; РСК, РДП в агаровом геле, ИФА), используя гипериммунные сыворотки. Кроме того, обнаружение противовирусных антител в сыворотке крови животного с помощью специфического антигена также может свидетельствовать об обнаружении вируса в организме животного. Экспресс-методы позволяют быстро (в течение двух-трех дней), обнаружить антиген и установить его видовую принадлежность. Но, как правило, степень достоверности при экспресс-диагностике не очень велика и необходимо подтверждение диагноза другими методами (вирусологическими), включающими выделения и индикацию вируса на чувствительных лабораторных объектах с последующей идентификацией его в серологических реакциях.

Иногда в процессе обнаружения вируса уже создается определенное представление, с каким вирусом имеют дело: учитываются эпизоотологические (вид заболевшего животного, чувствительность лабораторной системы), клинические и патологоанатомические данные, способность вируса вызывать гемагглютинацию и гемадсорбцию.

Окончательно идентифицируют вирус в серологических реакциях. Этиологическая роль вируса считается доказанной, если в парных сыворотках крови животного будет установлено нарастание титра антител к выделенному вирусу (исследование парных сывороток крови животного с интервалом в две или три недели). Считают, что нарастание титров антител в четыре или больше раз во второй сыворотке по сравнению с первой свидетельствует об активном инфекционном процессе у животных в период исследования. Метод исследования парных сывороток крови является ретроспективным, однако тоже имеет важное значение для мероприятий по ликвидации вспышки вирусной инфекции.

Таким образом, обычно исследования патологического материала на вирусную инфекцию ведут одновременно по обоим направлениям: экспресс-методами и вирусологическими методами. Ответ получают вначале от экспресс-диагностики, а затем подтверждают его другими методами.

Самостоятельная работа студентов.

1. Используя учебное пособие для самостоятельной работы, лекционный материал и записи в тетрадях, по эпизоотическим данным, клиническим симптомам и патологоанатомическим признакам в заданиях, поставить предварительный диагноз на вирусную инфекцию.
2. Определить вид патматериала, составить сопроводительную в лабораторию.
3. Составить план лабораторных исследований полученного материала.

Занятие 19. Метод выделения рибонуклеопротеинов

Цель занятия: сформировать навык проведения анализа рибонуклеопротеинов дрожжей.

Оборудование и материалы: прессованные дрожжи, этиловый эфир, 3% раствор уксусной кислоты, 10% раствор серной кислоты, дифениламинный реактив, 0,1н и 10% растворы гидроксида натрия, реактив Фелинга, молибденовый реактив, 1% раствор сульфата меди, водный раствор аммиака, 1% раствор нитрата серебра, центрифуга, водяная баня, термостат, вискозиметры, секундомер, пробирки, пипетки.

Теоретическая часть.

Выделение рибонуклеопротеина из дрожжей и анализ его компонентов

Дрожжи, являющиеся в данной работе источником рибонуклеопротеина, содержат большое количество свободных углеводов, фосфата и простых белков. Поэтому прежде чем изучить состав нуклеопротеинов дрожжей, нужно выделить из них очищенный нуклеопротеин.

Ход анализа.

В химическую пробирку помещают 8 г прессованных дрожжей и, проверив, что в лаборатории погашены все горелки и нет включенных электроплиток, добавляют 2-4 мл эфира для разрушения клеточных оболочек. Содержимое пробирки растирают стеклянной палочкой. Эфир разрушает оболочки дрожжевых клеток, после чего нуклеопротеины можно извлечь раствором гидроксида натрия.

В пробирку добавляют 5 мл 0,1н раствора гидроксида натрия и перемешивают содержимое стеклянной палочкой. Через 20 мин экстракт, содержащий нуклеопротеины, отделяют фильтрованием через бумажный фильтр в центрифужную пробирку с делениями. Если фильтрование идет медленно, в воронку добавляют несколько мл 0,1н раствора гидроксида натрия. Отфильтровав 3-4 мл экстракта, добавляют к нему двойной объем 3% уксусной кислоты. При этом нуклеопротеины выпадают в осадок. Осадок отделяют центрифугированием, предварительно уравновесив пробирки.

После центрифугирования надосадочную жидкость сливают, а осадок нуклеопротеинов промывают уксусной кислотой. Для этого в пробирку наливают 3% уксусную кислоту до метки 5 мл, осадок размешивают стеклянной палочкой и, уравновесив пробирки, отделяют центрифугированием. Надосадочную жидкость сливают. Промывку повторяют еще 2-3 раза.

Гидролиз рибонуклеопротеинов. В широкую пробирку для гидролиза помещают осадок нуклеопротеинов и 4 мл 10% раствора серной кислоты. Пробирку закрывают пробкой, в которую вставлен обратный холодильник, и ставят на песчаную баню или асбестовую сетку газовой горелки.

Через 1 ч после начала кипения жидкости гидролиз прекращают, к остывшему гидролизату для нейтрализации прибавляют по каплям 10% раствор гидроксида натрия. Гидролизат фильтруют через бумажный фильтр. В фильтрате открывают продукты гидролиза нуклеопротеинов.

Реакции на компоненты нуклеопротеинов в гидролизате дрожжей.

1. Биуретовая реакция на полипептиды. К 5 каплям гидролизата дрожжей добавляют 10 капель 10% раствора гидроксида натрия и 1 каплю 1% раствора сульфата меди (11). Жидкость окрашивается в фиолетовый цвет.

2. Серебряная проба на пуриновые основания. К 10 каплям гидролизата добавляют 5 капель 1% раствора нитрата серебра. При стоянии через 3-5 мин выпадает небольшой рыхлый осадок серебряных соединений пуриновых оснований (аденина, гуанина), окрашенных в бурый цвет.

3. Проба на рибозу и дезоксирибоу. К 5 каплям гидролизата добавляют 10 капель реактива Фелинга. Жидкость перемешивают и верхний слой ее нагревают до начала кипения. Выпадает красный осадок оксида меди (1) вследствие окисления рибозы и восстановления $\text{Cu}(\text{OH})_2$ до Cu_2O .

4. Обнаружение дезоксирибозы дифениламиновым реактивом. В пробирку вносят 5-10 капель гидролизата нуклеопротеинов, добавляют в два раза больший объем дифениламинового реактива, перемешивают и ставят в кипящую водяную баню на 5-10 мин. Жидкость постепенно приобретает синее окрашивание, обусловленное реакцией дифениламина с дезоксирибозой.

5. Молибденовая проба на фосфорную кислоту. К 20 каплям молибденового реактива (раствор молибдата аммония в азотной кислоте) добавляют 2-3 капли гидролизата и кипятят несколько минут на открытом огне. В присутствии фосфорной кислоты жидкость окрашивается в лимонно-желтый цвет. При охлаждении выпадает желтый кристаллический осадок комплексного соединения фосфорно-молибденового аммония.

Самостоятельная работа студентов:

1. Работая в парах, студенты выделяют рибонуклеопротеин из дрожжей.
2. Анализируют компоненты дрожжевого нуклеопротеина.

Занятие 20. Методика составления рецептур питательных сред для культивирования дрожжей, клеток растений и животных

Цель занятия: изучить состав сред для культивирования микроорганизмов.

Оборудование и материалы: лабораторная посуда, автоклав, газовая горелка, весы, компоненты питательных сред, готовые сухие среды.

Теоретическая часть.

Составление сред для культивирования микроорганизмов

Сырье в биотехнологических производствах, особенно в крупнотоннажных, занимает первое место в статьях расхода и составляет 40-65% общей стоимости продукции.

Питательный субстрат или питательная среда является сложной трехфазной системой, содержащей жидкие, твердые и газообразные компоненты. Основной принцип составления рецептур питательных сред – удовлетворение физиологических потребностей микроорганизмов, а также поддержание оптимальных значений pH, температуры, кислорода и стерильности среды.

Приготовление обычных сред. К ним относятся среды, применяемые для выращивания большинства микроорганизмов – мясо-пептонный бульон, мясо-пептонный агар и др

Приготовление мясной воды. Свежее говяжье или конское мясо освобождают от костей, сухожилий, жира и фасций, измельчают в мясорубке или нарезают ножом мелкими кусочками. Навеску измельченного мяса (50 г) заливают двумя объемами дистиллированной или водопроводной воды и оставляют для экстрагирования в холодильнике при температуре +4...+60С на 18-24 часа или помещают в термостат с температурой 370С на 2 часа. Настой кипятят до просветления (5-7 мин), охлаждают при комнатной температуре и фильтруют через ватный или бумажный фильтр. Фильтрат измеряют и доливают до первоначального объема дистиллированной водой, разливают по флаконам, стерилизуют в автоклаве при температуре 1200С (1 атм.) в течение 30-40 мин и используют по назначению.

Правильно приготовленная мясная вода представляет слабокислую (pH 6,2), прозрачную, соломенно-желтоватую жидкость, не содержащую белков. В ней присутствует небольшое количество аминокислот, солей, углеводов, факторов роста и экстрактивных веществ.

Приготовление мясо-пептонного бульона (МПБ). К приготовленной мясной воде (100мл) прибавляют 1% пептона и 0,5% хлористого натрия, кипятят 1-2 мин при помешивании, затем охлаждают и определяют pH. Добавлени(панкреатин + вода) ем щелочи (1н раствора гидроксида натрия) или кислоты (1н раствор соляной кислоты) устанавливают pH среды 7,4-7,6. Для стабилизации pH рекомендуется к бульону добавлять фосфатные буферные смеси. Кипятят 30-45 мин для выпадения осадка, затем охлаждают, фильтруют через бумажный фильтр и доливают водой до первоначального объема. Проверяют и доводят pH до 7,4-7,6, разливают по пробиркам, флаконам и стерилизуют в автоклаве при 1200С (1 атм.) в течение 15-20 мин. Такой мясо-пептонный бульон пригоден для выращивания большинства бактерий. Из него легко приготовить ряд сред специального назначения.

Приготовление мясо-пептонного агара (МПА). К приготовленному мясо-пептонному бульону добавляют 2-3% мелко нарезанного, хорошо промытого агара. Смесь кипятят или прогревают в автоклаве до полного растворения агара. Охлаждают до 500С и для просветления добавляют белок куриного яйца, тщательно взбитого в двойном количестве холодной воды (белок одного яйца на 1 л среды). Среду прогревают в автоклаве при 0,5 атм. в течение 45 мин. Белок адсорбирует взвешенные в среде частицы, свертывается при высокой температуре и оседает хлопьями на дно.

Агар фильтруют через слой ваты или фильтровальной бумаги в горячем автоклаве или в специальной металлической воронке с подогревом. Проверяют и корректируют pH.

Разливают через стеклянную воронку с резинкой и зажимом в пробирки, флаконы, колбы и т.д., следя за тем, чтобы не смочить их края. Стерилизуют в автоклаве при температуре 1200С (1 атм.) в течение 15-20 мин. Пробирки с горячим жидким агаром извлекают из автоклава и раскладывают на столе в наклонном положении. Агар растекается по стенке пробирки и при застывании получается «скошенным». Для получения агара «столбиком» пробирки охлаждают в вертикальном положении.

Мясо-пептонный агар является основной плотной средой и служит для получения изолированных колоний микроорганизмов на питательной среде. Он употребляется в виде «простого» агара или после прибавления к нему питательных веществ и индикаторов в виде сложных дифференциально-диагностических или так называемых элективных сред.

Приготовление дифференциально-диагностических сред. Эти среды применяют для изучения биохимических свойств и для выделения чистых культур некоторых микроорганизмов. Они позволяют выявить выделяемые микробами ферменты, одни из которых расщепляют в различной степени белки и углеводы, а другие вызывают реакции окисления и восстановления. Сюда относятся жидкие среды с углеводами Гиса, плотные среды с индикаторами *Эндо, Левина, Плоскирева и другие*.

Среда Гисса. К 1% пептонной воде с рН 7,1 прибавляют 0,5-0,6% соответствующего углевода (глюкозы, сахарозы, лактозы, мальтозы и др.) и 0,5% индикатора Эндрюса (0,5 г кислого фуксина в 100 мл 1н раствора гидроксида натрия). Среда разливают по 4-5 мл в стерильные пробирки, на дно которых перед стерилизацией помещают узкий поплавочек. Среда стерилизуют текучим паром 2-3 раза по 30 мин через каждые 24 часа или однократно паром под давлением 0,5 атм. 30 мин. Вместо жидких сред Гисса часто применяют полужидкие среды, содержащие 0,3-0,5% агар-агара и индикатор РВ. При сбраживании углеводов под действием ферментов среда изменяет цвет, а при образовании CO_2 в поплавке скапливается газ.

Среда Эндо. К 100 мл стерильного расплавленного мясо-пептонного агара добавляют 1г лактозы, растворенной и прокипяченной в 5мл дистиллированной воды, и 1 мл насыщенного спиртового основного фуксина, обесцвеченного перед добавлением к агару 10%-м водным раствором сульфата натрия до бледно-розового оттенка. Среду хорошо перемешивают, разливают в стерильные чашки и перед посевом подсушивают в термостате. Бактерии

E. coli, ферментирующие лактозу с образованием кислоты, формируют на этой среде красные колонии, а бактерии, не разлагающие лактозу, - бесцветные.

Составление сред для культивирования клеток растений и животных

Функции сред для выращивания клеток могут быть охарактеризованы следующим образом: 1 – поддержание необходимых для роста физико-химических условий (рН, осмолярность и др.); 2 – обеспечение клеток питательными веществами для синтеза клеточной биомассы и продуктов.

Для удобства среды могут быть подразделены на четыре группы:

1. Среда, необходимые для кратковременного выживания клеток;
2. Среда, необходимые для длительного выживания;
3. Среда, необходимые для обеспечения неограниченного роста клеток;
4. Среда, необходимые для осуществления специальных функций.

Кроме источников углерода, азота и других минеральных компонентов, среда для клеток многоклеточных организмов содержат специфические стимуляторы и регуляторы роста. Для клеток растений обычно необходимы индолилуксусная кислота, кинетин и гиббереллиновая кислота. Клетки животных нуждаются в ростовых веществах и незаменимых аминокислотах. Клетки растений и животных весьма чувствительны к присутствию посторонних ингредиентов, поэтому требуют химически чистых компонентов среды. Известен общий состав сред для культивирования клеток растений и животных.

Среды для культивирования клеток могут создаваться на основе данных анализа плазмы крови и других биологических жидкостей (среда 199) или на основе уменьшения числа компонентов до минимума, необходимого для роста клеток (среда Игла).

Качество сред определяют рассчитывая два показателя:

1. Удельная скорость роста (μ) популяции клеток:

$$\mu = 1/n \cdot dn/dt,$$

где n - число клеток /мл;

t - время.

Следовательно, $\mu = \ln 2 / t_d$, где t_d - время удвоения популяции.

2. Урожайность роста (Y), определяется частным:

$$Y = \Delta x / \Delta s$$

где Δx - увеличение биомассы (число клеток или их масса) в результате использования определенного количества Δs субстрата.

Например, урожайность клеток Hela равна 0,295, а клеток LS – 0,76 (в граммах сухого вещества биомассы на грамм использованной глюкозы).

Самостоятельная работа студентов:

1. Студенты на лабораторном занятии учатся составлять минимальную незаменимую среду (MEM) Игла.
2. Рассчитывают удельная скорость роста и урожайность роста.
3. Готовят среды из сухих фабричных порошков (на выбор).

Занятие 21. Методы отделения биомассы продуцента и разрушения клеток

Цель занятия: освоить метод выделения фибриногена из плазмы крови.

Оборудование и материалы: цитратная плазма крови, хлорид натрия, центрифуга, торзионные весы, стаканы, воронки, центрифужные пробирки, пипетки, стеклянная палочка, фильтры.

Теоретическая часть.

Выделение фибриногена из плазмы крови

Цитратную плазму крови получают путем прибавления к крови 3,8% раствора цитрата натрия

Для выделения фибриногена из плазмы крови точно отмеривают и наливают в центрифужную пробирку 2 мл плазмы крови. Отвешивают 20 мг сухого хлорида натрия, высыпают его в пробирку с плазмой и тщательно перемешивают до полного растворения. Наблюдают выпадение осадка.

Центрифужную пробирку с раствором уравнивают с центрифужной пробиркой, в которую наливают дистиллированную воду. Пробирки помещают в центрифугу и центрифугируют 15 минут при 3500 об/мин. Надосадочную жидкость сливают. Осадок представляет собой плотную массу с хорошо выраженной волокнистой структурой.

Осадок извлекают из пробирки и помещают на беззольный фильтр. Сжимая его, получают воздушно-сухой сгусток фибрина, который взвешивают на торзионных весах. Вес в норме составляет 9-12 мг на 1 мл цитратной плазмы. Для определения фибриногена в мг/дл полученную величину веса умножают на специально установленный коэффициент 22,2.

Самостоятельная работа студентов:

1. Студенты получают цитратную плазму крови.
2. Выделяют фибриноген из плазмы крови.
3. Определяют количество полученного фибриногена.

Занятие 22. Методы иммобилизации соединений

Цель занятия: сформировать навык проведения физической иммобилизации соединений.

Оборудование и материалы: 0,01% раствор фуксина, 0,1 раствор перманганата калия, ализарин, спирт этиловый, 96%; 0,1н и 1н растворы гидроксида натрия, 10% раствор хлорида бария, 10% раствор сульфата натрия, 15% раствор перекиси водорода, алюмокалиевые квасцы, 25% раствор аммиака, 15% серная кислота, 0,1н соляная кислота, колбы, мерные цилиндры, пробирки, пипетки, стеклянные палочки воронки, фильтры, сычужный фермент, молоко, силикагель, 1н раствор соляной кислоты, термостат, секундомер.

Теоретическая часть.

Иммобилизованные ферменты (ИФ) – это препараты, в которых молекулы ферментов связаны с матрицей или носителем. При этом каталитические свойства ферментов сохраняются полностью или частично. Способы иммобилизации ферментов могут быть физическими или химическими. Иммобилизация ферментов создает ряд преимуществ. К ним относятся: более высокая стабильность ферментных препаратов, возможность их удаления из реакционной среды и повторное использование, возможность создания непрерывных процессов на ферментных колонках. ИФ относительно стабильны к денатурирующим воздействиям – нагреванию, действию агрессивных сред, автолизу и т.д.

ИФ применяют в производстве L-аминокислот, 6-аминопенициллановой кислоты, из которой получают полусинтетические пенициллины, в синтезе преднизолона, для удаления лактозы из продуктов питания, в изготовлении ферментных электродов для экспресс-определения мочевины, глюкозы, холестерина и др., для создания аппаратов “искусственная почка” и “искусственная печень”, для удаления эндотоксинов, образующихся в процессе заживления ран и ожогов, при лечении некоторых онкологических заболеваний и т.д.

Адсорбция

Адсорбция фуксина на стекле. В колбу наливают 50 мл раствора фуксина, оставляют на 10-15 мин, затем раствор сливают и колбу ополаскивают до тех пор, пока промывная вода станет совершенно бесцветной. Отмечают окрашивание стенок колбы фуксином.

В колбу наливают 15-20 мл этанола и встряхивают в течение 1 -2 мин. Спирт окрашивается в розово-красный цвет за счет перехода в него ранее адсорбированного на стенках колбы фуксина.

Адсорбция на осажденном сульфате бария. В цилиндр наливают 25 мл раствора перманганата калия, добавляют несколько мл раствора гидроксида натрия, 25 мл раствора сульфата натрия и 50 мл раствора хлорида бария. Цилиндр закрывают пробкой, тщательно перемешивают и оставляют на некоторое время для осаждения образовавшегося сульфата бария. После осаждения сульфата бария к надосадочной жидкости добавляют по каплям раствор перекиси водорода до обесцвечивания жидкости. Содержимое перемешивают. Надосадочная жидкость в цилиндре полностью обесцвечивается, а осадок сохраняет окраску адсорбированного на частичках сульфата бария перманганата калия, не вступившего в реакцию с перекисью водорода. Иными словами, адсорбированное вещество настолько прочно связывается с адсорбентом, что не вступает в характерные для него реакции, даже если эти реакции протекают в системе, где находится адсорбент с адсорбирующимся веществом.

Адсорбция ализарина окисью алюминия. В мензурку наливают 25 мл квасцов и 5 мл аммиака. Содержимое мензурки доводят до 50 мл водой и размешивают стеклянной палочкой. Образуется студень гидроксида алюминия. В две пробирки наливают по 3-4 мл полученного студня. В одну из них добавляют 1-2 мл ализарина и кипятят, при этом студень окрашивается в розовый цвет адсорбированным на нем ализарином. Затем в обе

пробирки добавляют по 3-4 мл серной кислоты. Студень гидроокиси алюминия во второй пробирке растворяется, тогда как студень с адсорбированным ализарином в кислой среде изменяет свою окраску из розовой на желтую, но не растворяется.

Следовательно, адсорбция - не только физический процесс, но также в какой-то мере и химическое явление, приводящее к образованию комплекса с новыми свойствами.

Материал исследования: 0,01% раствор фуксина, 0,1 раствор перманганата калия, ализарин.

Реактивы: спирт этиловый, 96%; 0,1н и 1н растворы гидроксида натрия, 10% раствор хлорида бария, 10% раствор сульфата натрия, 15% раствор перекиси водорода, алюмокалиевые квасцы, 25% раствор аммиака, 15% серная кислота, 0,1н соляная кислота.

Оборудование: колбы, мерные цилиндры, пробирки, пипетки, стеклянные палочки воронки, фильтры.

Иммобилизация сычужного фермента на силикагеле:

1. Активация силикагеля. Для активации силикагеля его тщательно промывают водой, а затем, каждый раз меняя раствор, 3-4 раза обрабатывают 1н раствором гидроксида натрия, вновь тщательно промывают водой и потом 3-4 раза 1н соляной кислотой. Полученный силикагель длительно отмывают водой. Готовый к употреблению силикагель должен находится под слоем воды.

2. Адсорбция сычужного фермента на силикагеле. В свежеприготовленный водный раствор фермента (0,5 г фермента растворяют в 100 мл воды) вносят силикагель в количестве 10 г. Взвесь перемешивают и помещают в термостат при температуре 37 0С на 1 час, периодически перемешивают. За это время сычужный фермент адсорбируется на силикагеле. Извлеченный из термостата силикагель несколько раз промывают водой, высушивают на воздухе и хранят при температуре 4 0С в закупоренных флаконах.

3. Влияние ИФ на время свертывания молока. В три колбы наливают по 10 мл молока. В первую добавляют 1 г, во вторую 2 г силикагеля с иммобилизованным ферментом. Третья колба – контроль. По секундомеру измеряют время свертывания молока во всех трех колбах и делают выводы. После проведения опыта силикагель отмывают дистиллированной водой, высушивают и вновь используют для изучения скорости свертывания молока. В динамике регистрируют снижение активности иммобилизованного фермента.

Самостоятельная работа студентов:

1. Студенты осуществляют адсорбцию фуксина на стеклу стекле.
2. Студенты осуществляют иммобилизацию сычужного фермента на стеклу стекле.

Занятие 23. Метод получения нуклеината натрия из кормовых дрожжей

Цель занятия: изучить метод получения нуклеината натрия из кормовых дрожжей.

Оборудование и материалы: кормовые дрожжи, 10% раствор хлорида натрия, 1н соляная кислота, 1н гидроксид натрия, этанол, панкреатин (порошок), термостат, водяная баня, лед, фильтры, колбы, воронки, индикаторная бумага.

Теоретическая часть.

Получение нуклеината натрия

Нуклеинат натрия выделяется из кормовых дрожжей, которые содержат в среднем 7% РНК. Сначала проводят экстракцию РНК. Для этого отвешивают 50 г дрожжей, добавляют двойной объем 10% раствора хлористого натрия и помещают на кипящую водяную баню. Раствор РНК отделяют от дрожжевого шлама, охлаждают до 00С и подкисляют 1н соляной кислотой до рН 1-2.

Выпавшую в осадок техническую РНК растворяют в воде, доводя рН раствора добавлением 1н гидроксида натрия до рН 8-8,2, к раствору добавляют панкреатин (5% от общего объема раствора) и выдерживают около часа в термостате при температуре 37-400С.

Для инактивации фермента раствор кипятят 5-10 минут, после чего фильтруют. Для осаждения нуклеиновой кислоты к раствору добавляют охлажденный и подкисленный соляной кислотой до рН 1-2 этиловый спирт. Выпавший осадок фильтруют, промывают этанолом, растворяют в воде с добавлением гидроксида натрия до рН 6,2-6,5. Нуклеинат натрия осаждают спиртом, осадок фильтруют, промывают спиртом и сушат. Препарат имеет серо-желтоватый цвет, хорошо растворим в воде.

Самостоятельная работа студентов:

1. По методике студенты получают нуклеинат натрия из кормовых дрожжей.

Занятие 24. Методы анализа продуктов спиртового брожения

Цель занятия: изучить методы проведения качественных реакций на этиловый спирт.

Оборудование и материалы: дрожжи, 2% раствор глюкозы, 1% раствор виннокаменной кислоты, 10% раствор гидроксида натрия, концентрированная серная кислота, 30% уксусная кислота, 5% раствор йода в йодистом калии, ступка, пестик, аппарат для брожения, термостат, пробирки, пипетки, воронки, бумажные фильтры, стакан, индикаторная бумага, спирт этиловый, метанол, 1% раствор перманганата калия, концентрированная серная кислота, насыщенный раствор щавелевой кислоты, фуксинсернистый реактив, анилин, концентрированная соляная кислота, натронная известь, индикатор бромтимоловый синий, 0,05 н и 0,1 н растворы гидроксида натрия, 1% раствор салицилового альдегида, колбы с обратным холодильником, пробирки с притертыми пробками, пробирки для проведения химических реакций, пипетки, бюретки, колбы на 50 мл.

Теоретическая часть.

Спиртовое брожение лежит в основе получения этилового спирта, кормовых и пищевых дрожжей, пивоварения и виноделия. Возбудителями спиртового брожения могут быть дрожжи - сахаромицеты, некоторые мицелиальные грибы и бактерии. Среди названных организмов дрожжи занимают ведущее место, а получение с их помощью этанола относят к разряду наикрупнейших в мире.

В дрожжах содержится комплекс ферментов, под действием которого глюкоза, фруктоза и некоторые другие сахара превращаются в спирт и углекислый газ;



глюкоза

этанол

Для получения этилового спирта из дрожжей, 3 г дрожжей растирают в фарфоровой ступке с 10 мл 2% раствора глюкозы. Содержимое ступки переносят в стакан с носиком, добавляют еще 60 мл раствора глюкозы и по каплям 1% раствор виннокаменной кислоты до кислой реакции (определяют по индикаторной бумаге).

Содержимое стакана переносят в прибор для брожения, причем заполнять прибор жидкостью нужно таким образом, чтобы запаянное колено трубки было заполнено, а в открытом колене имелось некоторое количество жидкости. Прибор ставят в термостат при 37°C, периодически наблюдают за образованием углекислого газа. Когда газ заполнит 1/4 - 1/2 закрытого колена, прибор вынимают из термостата и осторожно прибавляют в широкое колено 10% раствор гидроксида натрия почти до края. Отверстие закрывают большим пальцем, и прибор несколько раз переворачивают. Углекислый газ реагирует с гидроксидом натрия с образованием соды, что приводит к созданию вакуума.

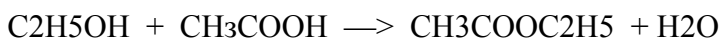
Качественные реакции на этиловый спирт:

Образование этилового спирта в процессе брожения легко доказывается по появлению йодоформа, который образуется при реакции этилового спирта с раствором йода в йодистом калии в присутствии щелочи:



Для этого из прибора отфильтровывают в пробирку несколько мл жидкости, к ней добавляют 2-3 капли раствора йода и по каплям 10% раствор гидроксида натрия до обесцвечивания окраски йода. Появляется запах йодоформа.

Образование этилацетата: нагревают 2 мл фильтрата с равным объемом уксусной кислоты и серной кислоты. Ощущается запах этилацетата (характерный запах свежих яблок).



Определение содержания примесей в этиловом спирте

В качестве примесей в этиловом спирте могут быть продукты его окисления (ацетальдегид и уксусная кислота), продукты дегидратации (непредельные соединения, обладающие восстановительной способностью), остатки продуктов сырья и полупродуктов синтеза. Например, если этиловый спирт был получен в результате брожения сахаристых веществ, в нем может быть примесь сивушных масел (смесь высших спиртов - бутилового и изоамилового), в гидролизном спирте, полученном из древесных опилок, может быть примесь метилового спирта, который очень ядовит. В качестве примеси в этиловом спирте могут быть дубильные вещества, если он хранился в дубовых бочках и т.д.

Определение содержания примесей альдегидов

Содержание альдегидов в этиловом спирте определяют колориметрическим методом путем сравнения окрасок растворов, полученных после реакции с фуксинсернистым реактивом.

В одну пробирку для колориметрирования из бесцветного прозрачного стекла вносят 10 мл 50% спирта, в другую - 10 мл стандартного раствора уксусного альдегида (50% этанол с известной концентрацией альдегида). В каждую пробирку добавляют по 2 мл фуксинсернистого реактива, пробирки закрывают пробками и взбалтывают. Через 20 мин сравнивают окраску растворов визуально, на белом фоне.

Образующаяся при реакции окраска, полученная с исследуемым спиртом, не должна быть интенсивнее окраски, полученной со стандартным раствором уксусного альдегида. Это свидетельствует о том, что альдегиды в спирте содержатся в норме.

Определение содержания сивушных масел

Сивушные масла представляют собой сложные многокомпонентные системы. Основными их компонентами являются изоамиловый и изобутиловый спирты. Поэтому при их анализе смесь этих спиртов используется в качестве типовых растворов.

В две колбы вместимостью 50 мл отмеривают: в одну 5 мл исследуемого спирта, в другую - 5 мл типового раствора (смесь спирта и известной концентрации примесей). В каждую колбу прибавляют по 0,2 мл 1% раствора салицилового альдегида и по 10 мл концентрированной серной кислоты. Содержимое колб энергично перемешивают. Через 20 мин сравнивают окраски растворов, визуально на белом фоне. Спирт считается кондиционным, если его окраска слабее или одинаковая по интенсивности с окраской типового раствора, содержащего допустимое ГОСТом количество примесей.

Определение содержания метилового спирта

Анализ основан на реакции окисления метанола до формальдегида перманганатом калия в кислой среде.

В две пробирки отмеривают: в одну 0,1 мл испытуемого спирта, в другую - 0,1 мл типового раствора метанола. При испытании ректифицированного спирта первого сорта и высшей очистки применяют типовой раствор с содержанием 0,05% метанола по объему. В каждую пробирку прибавляют по 5 мл 1% раствора перманганата калия и 0,4 мл серной кислоты, разбавленной в 2 раза водой. Закрывают пробирки пробками и перемешивают. Через 2 мин в каждую пробирку прибавляют по 1 мл насыщенного раствора щавелевой кислоты. Когда жидкость приобретет светло-желтую окраску, в пробирки приливают по 1 мл серной кислоты и после обесцвечивания раствора прибавляют по 5 мл фуксинсернистого реактива. Содержимое пробирок перемешивают. Через 35 мин сравнивают окраску испытуемого спирта и типовых растворов. Спирт считается выдержавшим пробу на метанол, если окраска его будет слабее или одинакова с окраской типовых растворов.

При малом содержании метанола в спирте указанное определение может быть недостаточно чувствительным, поэтому при анализе берут по 0,2 мл используемого спирта и типового раствора и дальнейшее определение ведут так же, как описано выше.

Повысить чувствительность метода можно увеличением продолжительности реакции до 60 мин. Важно, чтобы время реакции исследуемого спирта и типового раствора было строго одинаковым. Необходимо также точно соблюдать условия анализа.

Определение содержания фурфурола

Определение основано на способности фурфурола окрашивать гидрохлорид анилина в красный цвет.

В пробирку наливают 10 капель анилина и 3 капли концентрированной соляной кислоты. Добавляют 10 мл испытуемого спирта и перемешивают. Если в течение 10 мин раствор остается бесцветным, считается, что спирт выдержал испытание. Появление красного окрашивания указывает на наличие фурфурола.

Определение примесей кислот

Кислотность спирта обусловлена, главным образом, наличием свободной уксусной кислоты. Определение количества кислоты в спирте основано на титровании гидроксидом натрия с образованием соответствующих солей.

В коническую колбу на 500 мл с притертым шариковым холодильником помещают 100 мл испытуемого спирта, 100 мл дистиллированной воды и кипятят в течение 15 мин. После этого смесь охлаждают до комнатной температуры. Верхнюю часть холодильника закрыта трубкой с периодически обновляемой натронной известью. Колбу с жидкостью снимают с холодильника, добавляют в нее 10 капель раствора бромтимолового синего и титруют 0,05 н раствором гидроксида натрия до появления не исчезающей при взбалтывании в течение 1-2 мин голубой окраски.

Содержание кислот (Ск) в пересчете на уксусную (в мг/л) в безводном спирте вычисляют по уравнению:

$$C_k = 3 \cdot 10 \cdot 100 / C_c, \text{ где}$$

3 - количество уксусной кислоты, соответствующее 1 мл 0,05 н раствора гидроксида натрия, мг;

10 - коэффициент пересчета на 1 л спирта;

100 - коэффициент пересчета на безводный спирт;

Сс - крепость исследуемого спирта, % об.;

V - количество 0,05 н раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование 100 мл испытуемого спирта, мл.

Определение содержания примесей сложных эфиров

В спирте в качестве примесей содержится, главным образом, уксусноэтиловый эфир. Поэтому результаты анализов дают в пересчете на уксусноэтиловый эфир. Определение основано на их омылении гидроксидом натрия с образованием соответствующей соли уксусной кислоты и этилового спирта.

После определения содержания кислот к нейтрализованному спирту прибавляют 10 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия. Смесь кипятят в колбе с обратным холодильником в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры при закрытой верхней части холодильника трубкой с периодически обновляемой натронной известью, колбу отсоединяют. К содержимому колбы приливают 10 мл 0,1 н раствора серной кислоты. Избыток кислоты оттитровывают 0,05 н раствором гидроксида натрия.

Содержание эфиров (Сэф) в 1 л безводного спирта вычисляют в мг по формуле:

$$8,8 \times 10 \times 100$$

$$C_{эф} = [K(10 + V/2) - 10] / C_c, \text{ где}$$

K - поправочный коэффициент на титр раствора гидроксида натрия;

10 - коэффициент пересчета на 1 л спирта;

V - количество 0,05 н раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование избытка кислоты, мл;

8,8 - количество уксусноэтилового эфира, соответствующее 1 мл 0,1 н раствора гидроксида натрия,

100 - коэффициент пересчета на безводный спирт;

Сс- крепость исследуемого спирта, % об.

При установлении поправки коэффициента к титру 0,1 н раствора гидроксида натрия используют 0,1 н раствор серной кислоты. Для его определения в колбу вносят по 10 мл 0,1 н раствора серной кислоты и 0,1 н раствора гидроксида натрия. Избыток кислоты оттитровывают 0,05н раствором гидроксида натрия.

Поправочный коэффициент (К) к 0,1н раствору гидроксида натрия вычисляют по формуле:

$$K = \frac{10}{10 + v/2}, \text{ где}$$

10 - количество 0,1 н раствора гидроксида натрия и серной кислоты, мл;

v/2 - количество 0,05 н раствора гидроксида натрия, пошедшего на титрование избытка кислоты, мл. Раствор гидроксида натрия следует готовить с поправочным коэффициентом 0,97 – 0,99.

Самостоятельная работа студентов:

1. Студенты получают этиловый спирт из дрожжей.
2. Определяют его присутствие.
3. Определяют качество спирта по наличию примесей.

Тема 25. Метод получения нативной сыворотки

Цельзанятия: изучить технологию производства сыворотки крови.

Оборудование и материалы: спирт 70°, вата, иглы кровобрательные, лабораторная посуда, термостат, 0,5% хлороформ.

Теоретическая часть.

Технология получения нативной сыворотки

1. Сбор крови. Кровь собирают полый иглой или ножом с соблюдением асептики в стерильную посуду. Изъятие крови производят прижизненно или во время убоя. Кровь дефибринируют.

2. Получение сыворотки. Собранную дефибринированную кровь сепарируют с соблюдением асептики.

3. Консервирование сыворотки. Отделенную от форменных элементов и фибрина сыворотку консервируют хлороформом (0,5%).

4. Обработка сыворотки. Законсервированную сыворотку выдерживают в реакторе 5-10 ч при температуре 0-1°C для отделения от остатков фибрина. Сыворотку стерилизуют путем фильтрации через стерилизующие фильтры.

5. Розлив готового препарата. Отфильтрованную стерильную сыворотку разливают в стерильные флаконы по 250 и 500 мл. По внешнему виду нормальная сыворотка представляет собой жидкость желтовато-соломенного цвета со следующими физико-химическими показателями: рН 7,1-8,3, содержание белка 5,0-7,2% , количество золы – 0,2 – 0,5%.

При температуре 4-10°C продолжительность хранения такой сыворотки практически не ограничено. Нативную сыворотку крупного рогатого скота или лошадей используют для приготовления питательных сред для бактериологических целей.

Самостоятельная работа студентов:

1. Студенты берут кровь у МРС.
2. Получают сыворотку из крови.
3. Консервируют сыворотку.

Приложение 1

ОТКУДА
Название _____

Адрес _____

Тел/факс _____

КУДА
Областное государственное учреждение
**“СВЕРДЛОВСКАЯ ОБЛАСТНАЯ
ВЕТЕРИНАРНАЯ ЛАБОРАТОРИЯ”**
620142, г. Екатеринбург, ул. Белинского, 112а
Тел. 257-11-26 Тел/факс 257-56-62

СОПРОВОДИТЕЛЬНАЯ
от «__» _____ 20__ года
направляются для исследования в _____ отдел

материал от вынужденного убоя, патологический материал
(перечислить, какой) _____

от _____, возраст _____
(вид животного, порода)
принадлежащего _____
(Ф.И.О. владельца животного, организация)
адрес _____
(область, город, улица)

Причина вынужденного
убоя _____

Дата падежа (убоя) _____ Дата отбора материала _____
Кем отобран
материал _____
(должность, Ф.И.О.)

Клиническая
картина, _____

**Сведения о
вакцинации** _____
Предположительный диагноз _____
Перечень заболеваний для исследования

Проб(ы) направляет _____
(должность, Ф.И.О.) (подпись)

контактный телефон _____ М.п.
Пробы доставил _____
(должность, Ф.И.О.) (подпись)

Пробы принял ветеринарный врач _____
(Ф.И.О.) (подпись)

Приложение 2

ЗАДАНИЯ ПО ТЕМЕ «МЕТОДЫ ТИТРОВАНИЕ ВИРУСОВ»:

Рассчитайте значение средней эффективной дозы вируса при лабораторной диагностике вирусных болезней, используя кумулятивные данные.

Вариант 1

При диагностике гриппа птиц, разведениями исследуемого материала были заражены куриные эмбрионы, по 10 в каждом эксперименте. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
Пало	0	1	3	5	5	7	8	8	9	10

Вариант 2

При диагностике оспы овец, разведениями исследуемого материала были заражены культуры клеток, по 6 в каждом эксперименте. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
ООЕ:										
1 к-ра	0	1	6	8	15	21	30	39	>50	>50
2 к-ра	0	3	5	9	18	24	36	42	>50	>50
3 к-ра	0	2	7	10	21	24	39	45	>50	>50
4 к-ра	0	1	6	8	15	21	30	39	>50	>50
5 к-ра	0	2	5	9	18	24	36	42	>50	>50
6 к-ра	0	3	7	10	21	24	39	45	>50	>50

Вариант 3

При диагностике оспы птиц, разведениями исследуемого материала были заражены куриные эмбрионы, по 6 в каждом эксперименте. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
ООЕ:										
1 КЭ	1	4	6	8	16	22	31	40	>50	>50
2 КЭ	3	6	5	9	17	23	35	41	>50	>50
3 КЭ	2	6	7	10	21	24	39	45	>50	>50
4 КЭ	1	7	6	8	15	21	30	39	>50	>50
5 КЭ	2	6	5	9	18	24	36	42	>50	>50
6 КЭ	3	5	7	10	21	24	39	45	>50	>50

Вариант 4

При диагностике болезни Ауэски, разведениями исследуемого материала были заражены лабораторные крысы, по 8 в каждом эксперименте. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Пало	8	8	6	5	5	3	2	1	0	0

Вариант 5

При диагностике африканской чумы свиней, разведениями исследуемого материала были заражены культуры клеток, по 6 в каждом эксперименте. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------	------------

ЦПД	6	6	5	5	4	3	2	2	1	0
-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Вариант 6

При диагностике ЗКГ КРС, разведениями исследуемого материала были заражены культуры клеток, по 10 в каждом эксперименте. При микроскопии телец-включений типа А Коудри, получены следующие результаты:

Разведения	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
ЦПДо	10	10	8	7	5	4	2	1	0	0

Вариант 7

При диагностике ринопневмонии лошадей, разведениями исследуемого материала были золотистые хомячки, по 7 в каждом эксперименте. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Пало	7	6	6	5	4	3	1	0	0	0

Вариант 8

При диагностике болезни Марека, разведениями исследуемого материала были заражены культуры клеток, по 5 в каждом эксперименте. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
БОЕ:										
1 к-ра	2	5	6	9	16	26	33	40	>50	>50
2 к-ра	2	6	7	11	17	23	35	41	>50	>50
3 к-ра	2	6	7	10	20	23	36	44	>50	>50
4 к-ра	1	6	6	8	16	21	30	39	>50	>50
5 к-ра	2	6	5	9	18	24	36	43	>50	>50

Вариант 9

При диагностике гриппа лошадей, разведениями исследуемого материала были заражены куриные эмбрионы, по 10 в каждом эксперименте. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Заболело	10	9	7	7	5	4	2	1	0	0

Вариант 10

При диагностике гриппа свиней, с разведениями исследуемого материала была поставлена РГА, по 8 лунок с каждым разведением. Положительной считали агглютинацию не менее чем на 2 креста. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Агглютинация	8	7	5	5	4	2	2	1	0	0

Вариант 11

При диагностике парагриппа КРС, с разведениями исследуемого материала была поставлена РГА, по 9 лунок с каждым разведением. Положительной считали агглютинацию не менее чем на 2 креста. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Агглютинация	8	8	6	5	4	2	1	1	0	0

Вариант 12

При диагностике чумы КРС, разведениями исследуемого материала были заражены культуры клеток, по 8 в каждом эксперименте. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
ЦПДо	8	8	7	6	5	4	2	1	0	0

Вариант 13

При диагностике КЛО, разведениями исследуемого материала были заражены овца, по 3 каждым разведением. У животных регистрировали развитие инфекции. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Заболело	3	3	3	2	2	1	0	0	0	0

Вариант 14

При серотипировании вируса ящура, с разведениями исследуемого материала была поставлена РГА, по 5 лунок с каждым разведением. Положительной считали агглютинацию не менее чем на 2 креста. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}
Агглютинация	5	5	5	4	4	3	2	1	1	0

Вариант 15

При диагностике трансмиссивного гастроэнтерита свиней, разведениями исследуемого материала были заражены культуры клеток, по 6 в каждом эксперименте. Получены следующие результаты:

Разведения	10^{-10}	10^{-9}	10^{-8}	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}
БОЕ:										
1 к-ра	2	5	6	9	16	26	33	40	>50	>50
2 к-ра	3	6	8	11	17	25	35	41	>50	>50
3 к-ра	2	6	7	10	20	23	36	44	>50	>50
4 к-ра	1	7	6	12	16	21	36	45	>50	>50
5 к-ра	2	6	5	9	22	24	36	43	>50	>50
6 к-ра	3	5	7	10	21	24	39	45	>50	>50

Использованная литература:

1. Белоусова, Р.В. Ветеринарная вирусология: учебник / Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская, И.В. Третьякова: Международная ассоциация «Агрообразование».-М.: КолосС, 2007 – 424 с.
2. Белоусова, Р.В. Практикум по ветеринарной вирусологии: учебное пособие / Р.В. Белоусова, Н.И. Троценко, Э.А. Преображенская.- 3-е издание, дополненное и переработанное- М.: КолосС, 2006 – 248 с.
3. Блинов, В.А. Общая биотехнология в таблицах, рисунках и схемах/В.А. Блинов. – Саратов: гарнитура Таймс, 2008. – 102с.
4. Вопросы общей вирусологии: учебное пособие / Редакторы С.И. Киселев, И.Н. Жилинская.-СПб.: Проспект Науки, 2007.-374 с.
5. Гасманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология. Учебник для вузов./Р.Г. Гасманов, Н.М. Колычев, В.И. Плешакова.- М: Лань, 2010.- 488 с.
6. Гасманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология: учебник / Р.Г. Гасманов, Н.М. Колычев – 2-е издание, дополненное и переработанное - М.: КолосС, 2006 – 304 с.
7. Загоскина, Н.В. Биотехнология: теория и практика / Н.В. Загоскина, Л.В. Назаренко, Е.А. Калашникова, Е.А. Живухина. – М.: Оникс, 2009 г - 496 с.
8. Клунова, М.С. Биотехнология: учебник для высших учебных заведений / С.М. Клунова, Т.А. Егорова, Е.А. Живухина. – М.: изд. Центр «Академия», 2010. – 256с.
9. Коротяев, Л.И. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология / Л.И. Коротяев, С.А. Бабичев.- СПб.: СпецЛит, 2008.-781 с.
10. Кузьмина, Н.А. Основы биотехнологии. Учебное пособие для студентов биологического факультета. – Омск: Электронное издание, 2010.
11. Никитина, Е.В. Микробиология (учебник) / Е.В. Никитина, С.Н. Киямова, О.А. Решетник. – Спб: ГИОРД, 2009 - 368с.
12. Орехов, С.Н. Биотехнология. Учебное пособие / С.Н. Орехов.– М.: Электронное издание, 2006.
13. Сазыкин, Ю.О. Биотехнология: учебное пособие для студентов высших учебных заведений. – М.: Изд. Центр «Академия», 2008 – 256с.
14. http://bud.ru/?Rabota_s_virusosoderzhaniem_materialom

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	2
Тема 1. Вирусологическая лаборатория.	3
Тема 2. Приготовление вируссодержащего материала, очистка и концентрирование вирусов. Общие принципы лабораторной диагностики вирусных болезней.	6
Тема 3. Микроскопия элементарных и внутриклеточных телец включений.	8
Тема 4. Методы электронной микроскопии в вирусологии.	10
Тема 5. Методы люминесцентной микроскопии в вирусологии	11
Тема 6-7. Использование лабораторных животных в диагностических вирусологических исследованиях	15
Тема 8-9. Культивирование вирусов на куриных эмбрионах	18
Тема 10. Культивирование вирусов на культурах клеток	22
Тема 11. Методы титрования вирусов	32
Тема 12. Реакция гемагглютинации (РГА) и реакция задержки гемагглютинации (РЗГА) в вирусологии	26
Тема 13. Реакция гемадсорбции (РГад) и реакция задержки гемадсорбции (РЗГад) в вирусологии.	30
Тема 14. Реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и диффузной преципитации (РДП) в вирусологии.	32
Тема 15. Иммуноферментный анализ (ИФА) в вирусологии	34
Тема 16. Реакции связывания комплемента (РСК) и нейтрализации (РН) и их использование в вирусологии	37
Тема 17. Применение полимеразной цепной реакции (ПЦР) и метода ДНК-зондов в вирусологии.	40
Тема 18. Решение диагностических задач.	42
Тема 19. Метод выделения рибонуклеопротеинов	46
Тема 20. Методика составления рецептур питательных сред для культивирования дрожжей, клеток растений и животных	48
Тема 21. Методы отделения биомассы продуцента и разрушения клеток	50
Тема 22. Методы иммобилизации соединений	53
Тема 23. Метод получения нуклеината натрия из кормовых дрожжей	54
Тема 24. Методы анализа продуктов спиртового брожения	54

Тема 25. Метод получения нативной сыворотки	56
ПРИЛОЖЕНИЕ 1	57
Задачи по теме титрование вирусов	61
Использованная литература	66
Содержание	67