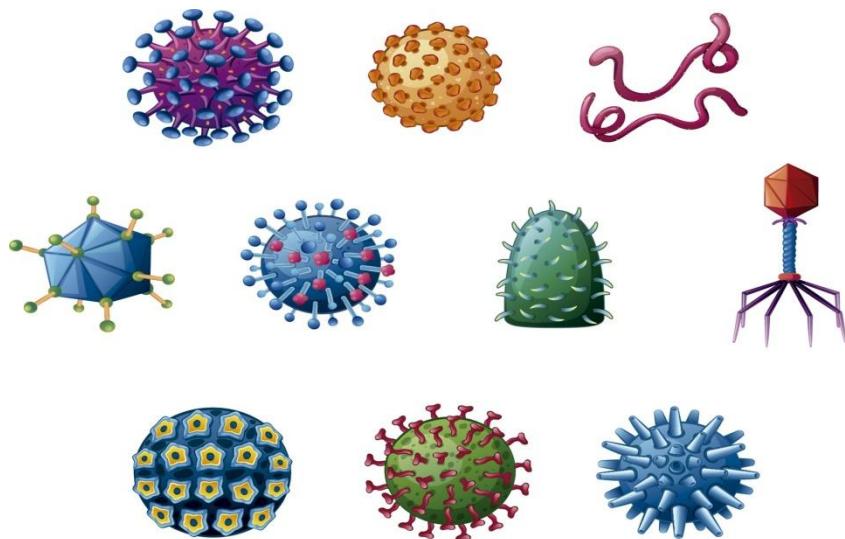


МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ

# ВИРУСОЛОГИЯ

*Практикум*



Пенза 2022

**МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ

Кафедра биологии, биологических технологий и ветеринарно-санитарной экспертизы

С.А. Сашенкова, Г.В. Ильина, Д.Ю. Ильин

**ВИРУСОЛОГИЯ**

*Практикум  
для студентов технологического факультета,  
обучающихся по направлению подготовки  
36.03.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза  
и специальности 36.05.01 Ветеринария*

Пенза 2022

УДК 578  
ББК 28.3  
С22

Рецензент – кандидат биологических наук, доцент кафедры ветеринарии ФГБОУ ВО Пензенский ГАУ **А.В. Остапчук.**

Печатается по решению методической комиссии технологического факультета Пензенского ГАУ от 19 сентября 2022 г., протокол № 2.

Сашенкова, С.А.

**С22      Вирусология:** практикум / С.А. Сашенкова, Г.В.Ильина, Д.Ю. Ильин; Пензенский государственный аграрный университет – Пенза: ПГАУ, 2022. – Текст: электронный.  
1CD (160)

Учебное пособие составлено в соответствии с программой курса «Вирусология» для студентов, обучающихся по направлению подготовки 36.03.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза и по специальности 36.05.01 Ветеринария. В нем даны краткие теоретические сведения по основным разделам курса. Содержатся методические указания по выполнению лабораторных работ, а также кейсы заданий для аудиторной и самостоятельной работы, тестовые задания.

© С.А. Сашенкова,  
Г.В. Ильина,  
Д.Ю. Ильин, 2022  
© ФГБОУ ВО  
Пензенский ГАУ, 2022

## ВВЕДЕНИЕ

Впервые вирусы были открыты в 1892 году Д.И. Ивановским. В результате наблюдений он высказал предположение, что болезнь табака, под названием мозаичной, представляет собой не одно, а два совершенно различных заболевания одного и того же растения: одно из них – рябуха, возбудителем которого является грибок, а другое – неизвестного происхождения. Возбудитель мозаичной болезни табака не мог быть обнаружен в тканях больных растений с помощью микроскопа и не культивировался на искусственных питательных средах.

Ученый мир не сразу признал открытие вирусов Д.И. Ивановским. Даже в 20-х годах прошлого века высказывалось много предположений, что вирусы – это либо мельчайшие простейшие организмы, либо такие формы бактерий, которые могут проходить через фильтры. Выдвигались даже гипотезы, что вирусы – это яды, которые выделяются внутри клеток под воздействием каких-то неизвестных факторов.

Перелом наступил лишь после того, как Ф. Д'Эрель открыл вирусы, паразитировавшие внутри различных микробов. Оказалось, что микробы тоже заражаются и гибнут от своих «микробных» вирусов. Д'Эрель назвал их бактериофагами, то есть «пожирателями микробов». Он придумал даже специальную окраску, с помощью которой сумел увидеть вирусы под сильным увеличением обычного оптического микроскопа.

Слово «*вирус*» в древнеримском языке служило для обозначения понятия «отрава». Оксфордский словарь английского языка толкует слово «*вирус*» как «болезнетворный яд, яд заразных болезней, подобных оспе». Отсюда и название науки изучающей вирусы – *вирусология*.

Первоначально вирусология развивалась в рамках микробиологии и лишь в середине XX века выделилась в самостоятельную дисциплину. Вирусология занимает важное место среди медико-биологических наук, так как вирусные болезни широко распространены у животных и человека; кроме того, вирусы служат моделями, на которых изучаются основные проблемы генетики и молекулярной биологии.

*Общая вирусология* изучает природу вирусов, их строение, размножение, биохимию, генетику. *Ветеринарная вирусология* ис-

следует патогенные вирусы, их инфекционные свойства, разрабатывает меры предупреждения, диагностики и лечения вызываемых ими заболеваний.

В задачи вирусологии как науки входит изучение морфологии и химического состава, принципов систематики и номенклатуры вирусов, особенностей их репродукции и изменчивости, патогенеза и иммуногенеза при вирусных болезнях, а также методических приемов диагностики и специфической профилактики наиболее распространенных и экономически значимых болезней, вызываемых вирусами.

Целью дисциплины вирусология, согласно рабочим программам по направлению подготовки 36.03.01 Ветеринарно-санитарная экспертиза и специальности 36.05.01 Ветеринария является овладение теоретическими основами вирусологии и приобретение знаний и навыков профилактики и диагностики вирусных болезней животных.

В задачи дисциплины входят:

- изучение особенностей биологии и систематики вирусов и взаимодействия их с зараженным организмом;
- усвоение основных принципов диагностики вирусных болезней сельскохозяйственных животных;
- овладение современными вирусологическими методами лабораторной диагностики;
- изучение перспективных и экологически безопасных технологических процессов изготовления вакцин и диагностикумов.

Практикум содержит теоретический материал и практические задания для лабораторных и самостоятельных работ с учетом требований ФГОС по направлению подготовки Ветеринарно-санитарная экспертиза и специальности Ветеринария.

# БИОЛОГИЯ ВИРУСОВ

## Устройство и работа вирусологической лаборатории

### *Общие положения*

Современные требования к лабораторным диагностическим комплексам изложены в правилах лабораторной практики GLP. Вирусологические отделы лабораторий и научно-исследовательских ветеринарных станций призваны осуществлять лабораторную диагностику вирусных инфекций, контролировать заболеваемость животных, вызываемую вирусами в межэпизоотический период, а также учитывать состояние и напряженность специфического постинфекционного и поствакцинального противовирусного иммунитета, участвовать в организации и проведении профилактических мероприятий в борьбе с вирусными и хламидийными заболеваниями животных в обслуживаемом регионе.

Структура вирусологической лаборатории определяется задачами и особенностями ее деятельности. Размещать лабораторию желательно в двухэтажном здании или в изолированном отсеке. Боксы предпочтительнее располагать с северной, теневой стороны здания, чтобы избежать попадания в них прямых солнечных лучей, или следует застеклить окна боксов молочным или матовым стеклом. Полы в коридорах и комнатах для сотрудников могут быть паркетными, покрытыми лаком; в остальных – из плотного, влагонепроницаемого, устойчивого к дезинфектантам материала. Деревянные полы покрывают пластиком. Стены и потолки лаборатории должны быть также устойчивыми к дезинфектантам, легко подвергаться мойке. В боксах всю площадь целесообразно отделять кафельной плиткой. Двери боксов должны быть раздвижными. Это позволяет сэкономить площадь и избежать колебания воздуха. В плоскости двери устраивают окошко с небольшой площадкой. Целесообразно иметь боксы следующего назначения: для получения и культивирования клеток – 1-2 бокса; для заражения культуры клеток – 1-2, для заражения куриных эмбрионов – 1-2 бокса; для заражения подопытных животных – 1 бокс; для вскрытия подопытных животных – 1 бокс; для склада стерильного стекла – 1 помещение.

Основные диагностические работы должны проводиться в настольных или стационарных ламинарных боксах (разного класса) с системой защиты оператора, предупреждения контаминации исследуемого материала.

даемого материала, защиты окружающей среды от вредных и опасных выбросов.

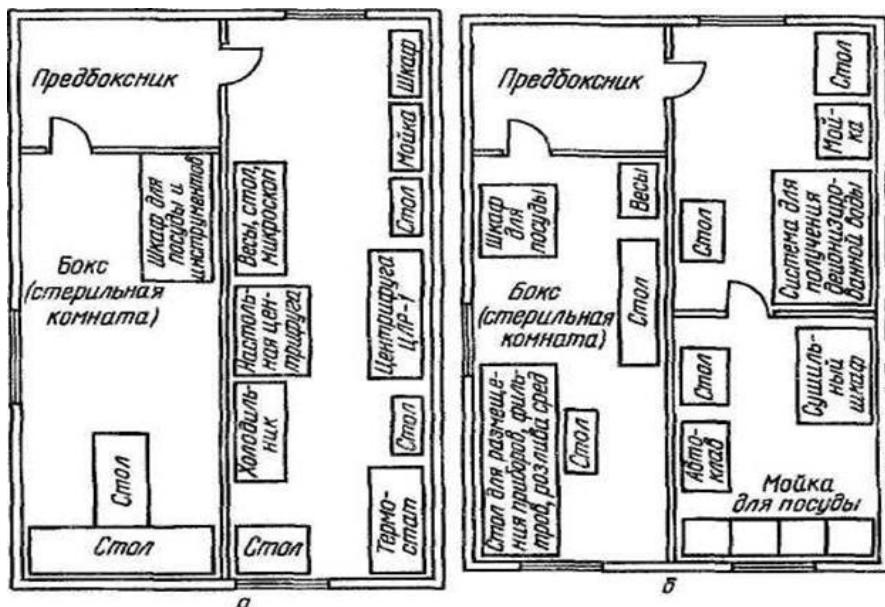
Помещения несколько больших размеров (примерно 4x4 м) выделяют для серологических исследований, уничтожения инфекционного материала, приготовления и стерилизации лабораторной посуды и других материалов, приготовления питательных сред и растворов, а также для сотрудников.

Лаборатория (отдел) вирусологии должна быть обеспечена холодной и горячей водой, желательны подача пара и газа, наличие централизованного вакуум-проводка и подачи воздуха под давлением.

Каждый бокс комплектуют соответствующей мебелью и оборудованием. Примерная схема размещения оборудования и приборов представлена на рисунке 1. Наиболее важен стол, размер которого зависит от выполняемых на нем работ. В связи с тем, что многие работы приходится выполнять вдвоем, стол рекомендуется располагать параллельно стене, чтобы два работника сидели друг против друга, или ставить его к стене в виде буквы Т, что позволяет более экономно использовать площадь стола. Шкафчики для стеклянной посуды и мелкого инвентаря можно устроить под столом или повесить на стену. Покрытие лабораторного стола должно быть устойчивым к действию дезинфицирующих веществ. Лабораторные стулья лучше всего металлические, так как они легко очищаются и дезинфицируются. Над рабочим местом устанавливают бактерицидные лампы (БУВ-30), которые позволят значительно снизить количество микроорганизмов в воздухе лаборатории. У входа в бокс кладут резиновый губчатый коврик, пропитанный дезраствором. В предбокснике находятся стерильные халаты, колпаки, косынки, маски и тапочки, перчатки, которые надевают перед работой в боксе, и, в зависимости от назначения бокса, соответствующее оборудование (термостат, холодильник, водяная баня, центрифуга и пр.).

Уборку помещений проводят влажным способом: полы, стены, мебель протирают марлей, увлажненной дезраствором.

Для вирусологической лаборатории любого типа обязательной частью оборудования должен быть настольный бокс, содержащий бактерицидную лампу, еще лучше – ламинарный шкаф с подачей стерильного воздуха (рисунок 2).



*Рисунок 1 – Схема устройства и размещения оборудования в вирусологической лаборатории: а) для работы с культурами клеток; б) для приготовления сред и подготовки биологического материала*



*Рисунок 2 – Ламинарный шкаф и одежда сотрудника лаборатории*

При работе в вирусологической лаборатории необходимо строго соблюдать методы и правила асептики и антисептики!

*Асептика* – система мероприятий и приемов работы, предупреждающих попадание микроорганизмов и вирусов из окружающей среды в организм человека, а также в исследуемый материал. Она предусматривает использование стерильных инструментов и

материалов, обработку рук сотрудников, соблюдение особых санитарно-гигиенических правил и приемов работы.

*Антисептика* – комплекс мероприятий, направленных на уничтожение микроорганизмов и вирусов, способных вызвать инфекционный процесс при попадании на поврежденные или интактные участки кожи и слизистых оболочек. В качестве антисептиков используют различные химические вещества: 70% этиловый спирт, 5% спиртовой раствор йода, 0,5–3% раствор хлорамина, 0,1% раствор перманганата калия, 0,5–1% раствор формалина, 1–2% спиртовые растворы метиленового синего или бриллиантового зеленого.

*Дезинфекция* – обеззараживание объектов окружающей среды путем уничтожения патогенных для человека и животных микроорганизмов и вирусов физическими способами и с помощью химических веществ: растворами хлорной извести (0,1–10%), формалина, хлорамина (0,5–5%), фенола (3–5%), лизола (3–5%), едкой щелочи (2–3%) и др. Выбор дезинфицирующего вещества и его концентрации зависит от материала, подлежащего дезинфекции.

В лабораториях для дезинфекции боксов чаще всего применяют пары формалина (30–35 мл 40% раствора формальдегида на 1 м<sup>3</sup> помещения), β-пропиолактон (1,1 л на 100 м<sup>3</sup> помещения) или испаряют карболовую кислоту (не реже одного раза в неделю) и ежедневно делают влажную уборку с применением растворов хлорамина, гидроксида натрия и др.

*Стерилизация* – обеспложивание, т.е. полное уничтожение микроорганизмов и вирусов в различных материалах. Стерилизацию проводят физическими (воздействием высокой температуры, путем ультрафиолетового облучения, фильтрацией жидкостей через бактериальные фильтры) и химическими методами. Стерилизации подвергается посуда и питательные среды.

Режим работы вирусологической лаборатории регламентируется законами Российской Федерации, международными правилами проведения диагностических лабораторных исследований, правилами внутреннего распорядка. Весь персонал лаборатории проходит инструктаж и обучение безопасным методам труда, обеспечивается спецодеждой, спецобувью, средствами санитарной защиты и защитными приспособлениями в соответствии с действующими нормами. Вход в производственные помещения посторонним лицам категорически запрещен. Сотрудники вирусологической лаборатории обязаны соблюдать правила работы, предупреждающие за-

грязнения бактериями и грибами исследуемого материала, возможность заражения персонала и распространения инфекции.

Запрещено выходить за пределы лаборатории в халатах и спецобуви или надевать верхнюю одежду на халат, курить, принимать пищу в производственных помещениях и хранить в них продукты питания. В боксе работают в стерильном халате, маске, шапочке, в некоторых случаях надевают очки и перчатки. При работе с особо опасными инфекциями используют специальные скафандры. Обязательно меняют обувь и переодеваются в предбокснике. Не допускаются хождение и разговоры во время работы.

***Весь материал, поступающий в лабораторию на исследование, должен рассматриваться как инфицированный!*** С инфекционным материалом следует обращаться крайне осторожно. При распаковке его банки необходимо протирать снаружи дезинфицирующим раствором и ставить их на поднос или в кювет. Рабочее место на столе покрывают несколькими слоями марли, увлажненной 3–5% раствором хлорамина. Жидкости, содержащие вирусы, переливают над кюветами с дезинфицирующим раствором. При работе с пипеткой пользуются грушей. Пипетки, предметные стекла, стеклянную посуду и резиновые изделия, задействованные в работе с инфекционным материалом, обеззараживают погружением в 5% раствор хлорамина или растворы фенола, лизола, серной кислоты. Запрещается выносить из лаборатории оборудование, инвентарь, материалы и т.д. без предварительной их дезинфекции. По окончании работы рабочее место приводят в порядок и дезинфицируют. Вирусодержащий материал, необходимый для дальнейшей работы, ставят на хранение в холодильник и опечатывают. Руки в перчатках промывают в банке с 5% раствором хлорамина, затем перчатки снимают, обеззараживают вторично, дезинфицируют и моют.

### *Задания*

1. Используя рисунок 1, начертите схему устройства вирусологической лаборатории. Какими законодательными актами регламентируется устройство и правила работы вирусологических лабораторий? Пользуясь дополнительными источниками информации, выпишите название этих законодательных и регламентирующих документов.

2. Дайте определение асептики, антисептики, дезинфекции и стерилизации. Перечислите методы дезинфекции и стерилизации. В чем особенности каждого метода?
3. Составьте памятку по технике безопасности для вирусологической лаборатории.
4. Познакомьтесь с оборудованием, использующимся для вирусологических исследований.

## **Химический состав и физическая структура вирусов**

### *Общие положения*

Вирусы состоят из фрагмента генетического материала, либо ДНК, либо РНК, составляющей сердцевину вируса, и окружающей эту сердцевину защитной белковой оболочкой, которую называют *капсидом*. Полностью сформированная инфекционная частица называется вирионом. У некоторых вирусов, таких как вирусы герпеса или гриппа, есть еще и дополнительная липопротеидная оболочка, которая возникает из плазматической мембранны клетки-хозяина. В отличие от всех остальных организмов вирусы не имеют клеточного строения. Оболочка вирусов часто бывает построена из идентичных повторяющихся субъединиц – *капсомеров*. Из капсомеров образуются структуры с высокой степенью симметрии, способные кристаллизироваться. Это позволяет получить информацию об их строении как с помощью кристаллографических методов, основанных на применении рентгеновских лучей, так и с помощью электронной микроскопии.

Как только в клетке-хозяине появляются субъединицы вируса, они сразу же проявляют способность к самосборке в целый вирус. Самосборка характерна и для многих других биологических структур, она имеет фундаментальное значение в биологических явлениях.

Непременным компонентом вирусной частицы является какая-либо одна из двух нуклеиновых кислот, белок и зольные элементы. Эти три компонента являются общими для всех без исключения вирусов, тогда как остальные липиды и углеводы – входят в состав далеко не всех вирусов. Вирусы, в состав которых наряду с белком и нуклеиновой кислотой входят также липоиды и углеводы, как правило, принадлежат к группе сложно устроенных вирусов. Кроме

белков, входящих в состав нуклеопротеидного «ядра», вирионы могут содержать еще вирус-специфические белки, которые были встроены в плазматические мембранные зараженных клеток и покрывают вирусную частицу, когда она выходит из клетки или «отпочковывается» от ее поверхности. Кроме того, у некоторых вирусов существует субмембранный матриксный белок между оболочкой и нуклеокапсидом. Вторую большую группу вирус-специфических белков составляют некапсидные вирусные белки. Они в основном имеют отношение к синтезу нуклеиновых кислот вириона. Белки выполняют разнообразные функции, обеспечивая прохождение жизненного цикла вируса.

Так, кроме защитной функции капсидные белки обеспечивают проникновение вируса в клетку хозяина, поэтому это могут быть ферменты и белки, наделены иммунными свойствами (обуславливают антигенные свойства). Ферментные белки могут обеспечивать как растворение клеточной стенки хозяина (капсидные), так и осуществлять транскрипцию и репликацию (некапсидные). Суперкапсидные белки формируют *шипы* или *пепломеры*, которые обычно имеют рецепторную функцию, обеспечивая адсорбцию на чувствительной клетке.

Всего на белки приходится от 50–75% массы вирионов. Они подразделяются на две группы структурные и неструктурные. Структурные входят в состав вириона и, в свою очередь, делятся на капсидные и суперкапсидные. Неструктурные (временные) вирусные белки – предшественники вирусных белков, ферменты синтеза ДНК/РНК полимеразы, обеспечивают транскрипцию и репликацию вирусного генома, белки регуляторы, полимеразы.

На липиды в сложных вирусах приходится от 15 до 35%. В основном они входят в состав *суперкапсида* (дополнительной оболочки). Липидный компонент стабилизирует структуру вирусной частицы и является частью клеточной мембранные хозяина, которая разрушается при выходе вирусной частицы из клетки.

Углеводы в составе вирусов обычно составляют до 10–13%, но их количество существенно варьирует. Например, в составе вируса гриппа и классической чумы птиц углеводов содержится до 17%. Они входят в состав гликопротеидов, играют существенную роль в структуре и функции белков.

Нуклеиновые кислоты – постоянная составная часть вирусной частицы и представлены либо ДНК, либо РНК. В структурном пла-

не нуклеиновые кислоты бывают различными. Так в вирусах встречаются типы ДНК: линейная двусpirальная с открытыми концами; линейная двусpirальная с замкнутыми концами; линейная односпиральная; кольцевая односпиральная. Типы РНК: линейная односпиральная; линейная фрагментированная; кольцевая односпиральная; линейная двусpirальная фрагментированная.

По морфологическим признакам и форме все вирусы подразделяются на: *палочковидные, шаровидные, кубоидальные, булавовидные и нитевидные*. Основными являются первые четыре, а нитевидные считаются промежуточной формой. В зависимости от расположения капсомеров в белковой оболочке все вирусы подразделяются на три группы симметрии: *спиральный тип, кубический и комбинированный или смешанный* (рисунок 3)



Рисунок 3 – Типы симметрии вирусов

Первый тип симметрии имеют вирусы, наделенные крупными размерами и обладающие высоким полиморфизмом. Капсомеры у них уложены в виде спирали с разным диаметром и таким образом чаще всего имеют палочковидную или шаровидную форму, иногда они покрыты второй оболочкой (*пеплосом* или *суперкапсидом*). Нуклеиновая кислота скручена в виде пружины и располагается витками иногда соединенными с белковыми молекулами.

У вирусов с кубическим типом симметрии капсомеры располагаются в виде правильного многогранника (икосаэдра). У большинства вирусов капсомеры имеют форму пяти-шестигранных призм, которые скручены в виде клубка и обычно образуют шаровидную или кубоидальную формы.

Комбинированный тип симметрии характерен для бактериофагов. Все разновидности бактериофагов имеют головку по типу кубической симметрии и хвостовой отросток со спиральным строением. Головка покрыта белковой оболочкой, которая состоит из однородных белковых субъединиц. В её полости располагается одна из нуклеиновых кислот. Хвостовой конец состоит из полого стержня, который заканчивается шестиугольной пластинкой. Хвостовой конец окружен воротничком, к которому прикреплен чехол, покрывающей весь стержень.

### *Задания*

1. Используя рисунок 1, зарисуйте разные типы вирусных частиц.
2. Заполните таблицы 1 и 2.

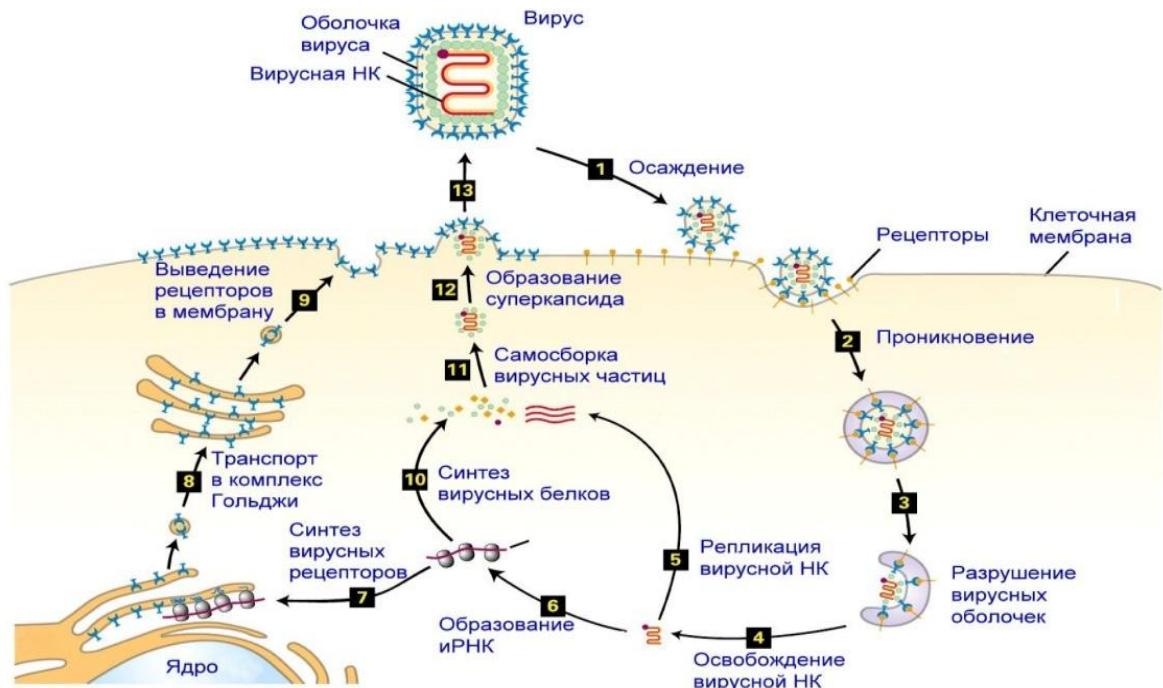
*Таблица 1 – Химический состав и строение вирусов*

Составная часть	Химический состав	Особенности организации	Выполняемые функции
Суперкапсид			
Капсид			
Генетический материал			

*Таблица 2 – Классификация вирусов*

Подход	Группы	Примеры
По типу нуклеиновой кислоты		
По особенностям нуклеиновой кислоты		
По форме капсида		
По наличию оболочек		
По хозяевам		

3. Рассмотрите рисунок 4. Зарисуйте жизненный цикл вируса, отметив основные этапы размножения.



*Рисунок 4 – Жизненный цикл вируса*

## Генетика и систематика вирусов

### *Общие положения*

Число генов у вирусов значительно варьирует: от трех – четырех генов у просто устроенных вирусов (парвовирусы) до 150 генов и больше у сложно устроенных (вирус оспы). Геном вирусов животных является гаплоидным, за исключением ретровирусов, которые имеют диплоидный геном, представленный двумя идентичными молекулами РНК. У вирусов с фрагментарным геномом (вирусы гриппа, реовирусы) каждый фрагмент обычно представляет собой один ген.

Так же, как и геном эукариотической клетки, ДНК-геном ряда вирусов животных имеет мозаичную структуру, при которой смысловые последовательности чередуются с неинформативными последовательностями.

Вирусам, как и всем живым организмам, свойственны наследственность и изменчивость. Основной особенностью вирусного генома является то, что наследственная информация у вирусов может быть записана как на ДНК, так и на РНК. Геном ДНК-содержащих вирусов двухнитевой (исключение составляют парвовирусы, имеющие одннитевую ДНК), несегментированный и проявляет инфекционные свойства. У вирусов, принадлежащих к родам

Poxvirus и Herpesvirus геном представлен двумя цепочками ДНК разной длины. Геном большинства РНК-содержащих вирусов однонитевой (исключение составляют реовирусы и ретровирусы, обладающие двунитевыми геномами) и может быть сегментированным (представители родов Retrovirus, Orthomyxovirus, Arenavirus и Reovirus) или несегментированным.

Вирусные РНК в зависимости от выполняемых функций подразделяются на две группы. К первой группе относятся РНК, способные непосредственно транслировать генетическую информацию на рибосомы чувствительной клетки, т.е. выполнять функции иРНК и мРНК. Их называют плюс-нити РНК и обозначают как +РНК (*позитивный геном*). Они имеют характерные окончания («шапочки») для специфического распознавания рибосом.

У другой группы вирусов РНК не способна транслировать генетическую информацию непосредственно на рибосомы и функционировать как иРНК. Такие РНК служат матрицей для образования иРНК, т.е. при репликации первоначально синтезируется матрица (+РНК) для синтеза –РНК. Такой тип РНК определяют как минус-нить и обозначают –РНК (*негативный геном*). У вирусов этой группы репликация РНК отличается от транскрипции по длине образующихся молекул: при репликации длина РНК соответствует материнской нити, а при транскрипции образуются укороченные молекулы иРНК. Молекулы +РНК проявляют инфекционность, а –РНК не проявляют инфекционные свойства и для воспроизведения должны транскрибироваться в +РНК.

Иключение составляют ретровирусы, которые содержат однонитевую +РНК, служащую матрицей для вирусной РНК-зависимой ДНК-полимеразы (обратной транскриптазы). При помощи этого фермента информация переписывается с РНК на ДНК, в результате чего образуется ДНК-провирес, интегрирующий в клеточный геном.

Так же как и у прочих форм жизни нуклеиновые кислоты вирусов подвержены мутациям. Фенотипически мутации вирусного генома проявляются изменениями в антигенной структуре, неспособности или, наоборот, способности вызывать продуктивную инфекцию в чувствительной клетке. У вирусов выделяют *спонтанные* и *индукционные* мутации.

Скорость спонтанного мутагенеза в ДНК-геномах значительно ниже ( $10^{-8} - 10^{-11}$  на каждый включенный нуклеотид), чем у РНК-

геномных ( $10^{-3} - 10^{-4}$  на каждый включенный нуклеотид). Более высокая частота спонтанных мутаций связана с низкой точностью репликации РНК-геномов, которая вероятно связана с отсутствием у РНК-репликаз корректирующей активности, свойственной ферментам, реплицирующим ДНК. Наиболее часто спонтанные мутации наблюдаются у ретровирусов, что связано с более высокой частотой сбоев в обратной транскрипции, не способных к самокоррекции.

Индуцированные мутации у вирусов получают при действии различных химических и физических мутагенов, которые подразделяют на действующие *in vivo* и *in vitro*.

Вирусные мутации классифицируют по изменениям фенотипа и генотипа. По фенотипическим проявлениям мутации вирусов разделяют на четыре группы:

- мутации, не имеющие фенотипического проявления;
- летальные мутации, т.е. полностью нарушающие синтез или функцию жизненно важных белков и приводящие к утрате способности к репродукции;
- условно летальные мутации, т.е. мутации с потерей способности синтезировать определенный белок или с нарушением его функции только в определенных условиях;
- мутации, имеющие фенотипическое проявление, например изменение размеров бляшек под агаровым покрытием или термостабильности.

По изменению генотипа мутации у вирусов подразделяют на точечные (локализующиеся в индивидуальных генах) и генные (затрагивающие более обширные участки генома).

Зарождение вирусами чувствительных клеток носит множественный характер, т.е. в клетку проникает сразу несколько вирионов. При этом вирусные геномы в процессе репликации могут кооперироваться или интерферировать. Кооперативные взаимодействия между вирусами представлены генетическими рекомбинациями, генетической реактивацией, комплементацией и фенотипическим смешиванием.

Генетическая рекомбинация чаще встречается у ДНК-содержащих вирусов или РНК-содержащих вирусов с фрагментированным геномом (вирус гриппа). При генетической рекомбинации происходит обмен между гомологичными участками вирусных геномов.

*Генетическая реактивация* наблюдается между геномами родственных вирусов с мутациями в разных генах. При перераспределении генетического материала формируется полноценный геном.

*Комплементация* происходит когда один из вирусов, инфицирующих клетку, в результате мутации синтезирует нефункциональный белок. Немутантный вирус, синтезируя полноценный белок, восполняет отсутствие его у мутантного вируса.

*Фенотипическое смешивание* происходит при смешанном заражении чувствительной клетки двумя вирусами, когда часть потомства приобретает фенотипические признаки, присущие двум вирусам, при неизменном генотипе.

При множественном инфицировании чувствительной клетки между вирусами могут возникать интерферирующие взаимодействия. *Интерференцией* вирусов называют состояние невосприимчивости к вторичному заражению клетки, уже инфицированной вирусом. При гетерологической интерференции инфицирование одним вирусом полностью блокирует возможность репликации второго вируса в пределах одной клетки. Механизмы гетерологической интерференции связаны с угнетением адсорбции другого вируса путем блокирования или разрушения специфических рецепторов, а также с ингибированием трансляции мРНК любой гетерологичной мРНК в инфицированной клетке. Кроме того, первичное заражение может индуцировать образование интерферона, ингибирующего репликацию второго вируса.

Гомологическая интерференция, т.е. интерференция между гомологичными вирусами, характерна для многих вирусов, особенно при повторных пассажах *in vitro* и при высокой множественности инфицирования. В таких условиях образуется много дефектных вирусных частиц, обычно не способных к репродукции. Однако размножение дефектных вирусов возможно при совместном заражении с полноценным вирусом (вирус-помощник). При этом дефектный вирус может вмешиваться в репликативный цикл вируса-помощника и образовывать дочерние дефектные интерферирующие (ДИ) вирусные частицы. ДИ-частицам присущи три основных свойства: дефектность (повреждение в важных генах), способность к интерференции (ДИ-частицы препятствуют репликации полноценного вируса или других гомологичных вирусов) и способность к самообогащению за счет стандартного вируса. Циркуляция ДИ-

частиц и коинфекция с полноценным вирусом вызывают вялотекущие, длительные формы инфекции.

Кроме взаимодействий, происходящих между вирусами, при смешанной инфекции происходят также взаимодействие между вирусом и клеткой-хозяином. При взаимодействии клеток с ДНК-содержащими вирусами может происходить вирусная трансформация клетки. В результате трансформации у клеток изменяются морфологические, биохимические и ростовые характеристики, может появляться способность к опухолевому росту. Представляет интерес трансформация клеток под действием РНК-геномных ретровирусов. У ретровирусов трансформация и репликация не являются взаимоисключающими, поскольку трансформированные клетки способны реплицировать вирус. Геномы трансформирующих вирусов обычно интегрируют с геномом трансформируемой клетки.

В 1966 г. на Московском международном микробиологическом конгрессе был учрежден Международный комитет по номенклатуре вирусов (ICTV), преобразованный в 1973 г. в Международный комитет по таксономии вирусов (МКТВ), который занимается классификацией вирусов до настоящего времени.

В основу классификации вирусов положены такие признаки как структура генома, форма капсида и размер вирусной частицы. С использованием универсальной системы – условно выбранной иерархии, соответствующей виду-роду-подсемейству-семейству-порядку. Таксоны ниже вида и выше порядка в вирусологии первоначально не использовались. Однако к сегодняшнему дню классификация вирусов претерпела девять редакций. Развитие технологии секвенирования вывели на первое место классифицирующего признака информацию о геноме. Теперь, когда технологии и методы молекулярной биологии относительно легкодоступны, подход к классификации вирусов основан на изучении и сравнении последовательностей нуклеотидов и аминокислот. Степень сходства геномов и белков вирусов оценивается с помощью компьютерных программ. Получаемые схемы могут быть представлены в виде филогенетических деревьев, отражающих вероятное эволюционное развитие вирусов.

Наряду с молекулярно-генетическими признаками также находят применение в классификации вирусов следующие критерии:

- тип нукleinовой кислоты (РНК или ДНК), её структура (од-

но- или двунитчатая, линейная, циркулярная, непрерывная или фрагментированная);

- стратегия вирусного генома (т.е. используемый вирусом путь транскрипции, трансляции, репликации);
- строение вириона (наличие липопротеидной (суперкапсида), размер и морфология, тип симметрии, число капсомеров;
- антигенные и физико-химические свойства;
- феномены генетических взаимодействий;
- экологические взаимодействия (круг восприимчивых хозяев, ареал географического распространения);
- механизмы патогенности (характер изменений в образование внутриклеточных включений, изменения экспрессии генов клеток хозяина, апоптоз и трансформация клеток);
- способы передачи и резистентность к факторам внешней среды ( $\gamma$ -излучению, температуре, действию детергентов, противовирусным препаратам);
- особенности инфекционного процесса и его эпидемиология.

В 2018 году классификация вирусов была существенно дополнена. Верхним рангом теперь является Царство. Рейх (... vira). Далее следуют: ствол или тип (... viricota), подтип (... viricotina), класс (... viricetes), подкласс (... viricetidae), заказ, подчинение (... virineae), семья (... viridae), подсемейство (... virinae), род (... virus), вид (...virus).

Вирусы отнесены к царству Vira. В основу классификации положен тип нуклеиново кислоты, образующей геном. Соответственно выделяют рибовирусы (РНК-вирусы) и дезоксирибовирусы (ДНК-вирусы). Категории подсемейств и родов разработаны не для всех вирусов. Видовые названия вирусов обычно связывают с вызываемыми ими заболеваниями (например, вирус бешенства) либо по названию места, где они были впервые выделены (например, вирусы Коксаки, вирус Эбола). Если семейство включает большое количество видов, то видовые названия дают в соответствии с антигенной структурой и разделяют их на типы (например, аденоовирус 32 типа или вирус герпеса 1 типа). Реже используют фамилии учёных, впервые их выделивших (например, вирус Эпстайна-Барр или вирус саркомы Рауса). Иногда используют устаревшие названия групп вирусов, отражающих их уникальные эпидемиологические характеристики (например, арбовирусы).

К вирусам отнесены *вироиды* [от virus и греч. eidos, сходство]

— мелкие кольцевые однонитевые суперспирализованные молекулы РНК (аналогичную организацию имеет геном вируса гепатита D). Поскольку у вироидов нет белковой оболочки, они не проявляют выраженных иммуногенных свойств, и поэтому их нельзя идентифицировать серологическими методами. Вироиды вызывают заболевания у растений. В качестве безымянного таксона в царство Vira также включены и *прионы*. Это особый класс инфекционных агентов, не содержащих нуклеиновую кислоту. Представлены белками третичной структуры, которые, используя клетку подобно вирусам, увеличивают свою численность. Прионы вызывают заболевания — трансмиссивные губчатые энцефалопатии (ТГЭ) у различных млекопитающих, в том числе губчатую энцефалопатию крупного рогатого скота («коровье бешенство»).

### Задания

1. РНК-содержащий вирус в составе капсида имеет белок со следующим фрагментом последовательности аминокислот: -Гли – Сер – Глу – Тир – Асп. Под действием азотистой кислоты (мутагенный фактор) цитозин в результате дезаминирования превращается в урацил. Какое строение будет иметь участок белка этого вируса, если все цитидиловые нуклеотиды подвергнутся указанному химическому превращению, используйте таблицу 3?

2. Полипептид, входящий в состав капсида ДНК-содержащего вируса имеет следующий порядок аминокислот: мет – тир – тре – сер – ала... Определите один из вариантов последовательности нуклеотидов в обеих цепочках фрагмента молекулы ДНК, кодирующей данный полипептид.

3. Участок +РНК имеет следующую последовательность нуклеотидов:

5'- УЦААГГААААУЦГУГУУУ - 3'

Произошла мутация, в результате которой аминокислота Иле в молекуле вирусного белка заменилась на аминокислоту Мет. Определите последовательность нуклеотидов в мутированном геноме вируса и последовательность аминокислот структурного белка вируса до и после мутации. Ответ поясните.

4. Участок цепи ДНК-содержащего вируса имеет следующую последовательность нуклеотидов:

3'-АГГГЦЦГААТТЦАЦГГТТТЦ-5'

Какова последовательность аминокислот в полипептиде, соответ-

ствующем этой генетической информации? Как изменится последовательность аминокислот, если под влиянием радиации будут выбиты второй, пятый и восьмой слева нуклеотиды? Определите последовательность нуклеотидов в геноме исходного и мутированного вируса. Ответ поясните.

*Таблица 3 – Соответствие кодонов и-РНК аминокислотам*

Первое основание	Второе основание				Третье основание
	У	Ц	А	Г	
У	Фен	Сер	Тир	Цис	У
	Фен	Сер	Тир	Цис	Ц
	Лей	Сер	стоп	стоп	А
	Лей	Сер	стоп	Три	Г
Ц	Лей	Про	Гис	Арг	У
	Лей	Про	Гис	Арг	Ц
	Лей	Про	Глн	Арг	А
	Лей	Про	Глн	Арг	Г
А	Иле	Тре	Асн	Сер	У
	Иле	Тре	Асн	Сер	Ц
	Иле	Тре	Лиз	Арг	А
	Мет	Тре	Лиз	Арг	Г
Г	Вал	Ала	Асп	Гли	У
	Вал	Ала	Асп	Гли	Ц
	Вал	Ала	Глу	Гли	А
	Вал	Ала	Глу	Гли	Г

Нуклеотиды: У — урацил, Ц — цитозин, А — аденин, Г — гуанин.

Аминокислоты: ала — аланин, арг — аргинин, асн — аспарагин, асп — аспарагиновая кислота, вал — валин, гис — гистидин, гли — глицин, глн — глутамин, глу — глутаминовая кислота, иле — изолейцин, лей — лейцин, лиз — лизин, мет — метионин, про — пролин, сер — серин, тир — тирозин, тре — треонин, три — триптофан, фен — фенилаланин, цис — цистеин, (стоп) — кодоны определяют окончание синтеза полипептидной цепи.

5. Вирус имеет позитивную геномную последовательность, в которой закодирован фрагмент белка капсида:

5'-УУУАУААУГАГЦАУ-3'

Какие аминоислоты входят в состав белка капсида? Если под влиянием радиации будут выбиты 3 и 4 нуклеотиды, то к каким изменениям в аминокислотном составе белка это приведет?

6. Вирус имеет негативную геномную последовательность, в которой закодирован фрагмент белка капсида:

**3' - ЦАЦЦГАГУУЦАГ- 5'.**

Какие аминоислоты входят в состав белка капсида? Если под влиянием радиации будут выбиты 3 и 4 нуклеотиды, то к каким изменениям в аминокислотном составе белка это приведет?

7. Вирусом табачной мозаики (РНК-содержащий вирус) синтезируется участок белка с аминокислотной последовательностью: Ала – Тре – Сер – Глу – Мет-. Под действием азотистой кислоты (мутагенный фактор) цитозин в результате дезаминирования превращается в урацил. Какое строение будет иметь участок белка вируса табачной мозаики, если все цитидиловые нуклеотиды подвергнутся указанному химическому превращению? Определите последовательность нуклеотидов в исходном и мутированном геноме вируса.

8. Вирус имеет негативную геномную последовательность, в которой закодирован фрагмент белка капсида

**5'-ЦАГЦУАГУЦЦГ-3'.**

Какие аминоислоты входят в состав капсида? Если под влиянием радиации будут выбиты 3 и 4 нуклеотиды, то к каким изменениям в аминокислотном составе белка это приведет?

9. Одна из цепей ДНК вируса имеет последовательность нуклеотидов 5'-АААГТГТЦАГАГЦТ-3'. Какие аминокислоты входят в состав белка капсида, кодируемый этим фрагментом. Измениться ли аминокислотный состав белка, если второй слева нуклеотид заменить на цитозин? К чему приведет замена на цитозиновый нуклеотид четвертого слева нуклеотида?

10. В ходе синтеза вирусного белка в клетке приняли участие т-РНК с антикодонами АУГ, ГАУ, ЦАГ, ГГЦ. Определите последовательность нуклеотидов в РНК-содержащем вирусе с негативным и позитивным геномами.

11. Фрагмент генома вируса гриппа птиц содержит следующую последовательность нуклеотидов:

**3' -ГЦАУГУАГЦ ААГЦГЦ- 5'.**

Определите последовательность аминокислот в одном из белков капсида, который будет синтезироваться в клетке? Какие антикодоны будут иметь т-РНК, которые примут участие в процессе биосинтеза?

12. Фрагмент генома вируса лейкоза крупного рогатого скота имеет следующую последовательность нуклеотидов:

**5' -УУУЦГЦГАГЦЦАГ- 3'**

Определите последовательность аминокислот в двухцепочечной молекуле ДНК, которая будет синтезироваться в процессе обратной транскрипции. Какие аминокислоты здесь закодированы? Как будет происходить размножение этого вируса в клетке хозяина?

13. Фрагмент гена ДНК с ретровирусом имеет следующую последовательность нуклеотидов 3' -ГТЦ ЦТА АЦЦ ГГА ТТТ- 5'. Определите последовательность нуклеотидов РНК-вируса и аминокислот в полипептидной цепи белков капсида, если смысловыми являются 3, 4, 5 триплеты.

14. Определите порядок следования аминокислот в участке молекулы белка, если известно, что он кодируется такой последовательностью нуклеотидов ДНК:

5' -ТГАТГЦГТТТАТГЦГЦЦ - 3' .

Как изменится белок, если химическим путем будут удалены 9-й и 13-й нуклеотиды?

15. Фрагмент генома ДНК-содержащего вируса имеет следующую последовательность нуклеотидов:

5' -АЦАТГЦЦАГГЦТАТЦЦАГЦ- 3'

Определите последовательность нуклеотидов в транскирируемой цепи. Информационная часть гена начинается с триплета, кодирующего аминокислоту Мет. Определите последовательность аминокислот информационной части гена. Ответ поясните.

16. Фрагмент генетического аппарата вируса представлен молекулой РНК и имеет следующую последовательность нуклеотидов: 5' -УУУАУААУГАГЦААУ- 3'. Определите нуклеотидную последовательность фрагмента двухцепочечной ДНК провируса, синтезируемой в результате обратной транскрипции. Установите аминокислотный состав белка вируса, если матрицей для синтеза служит цепь РНК комплементарная вирусной.

## **Бактериофаги, строение и применение**

### *Общие положения*

*Бактериофагия* – это процесс взаимодействия бактериофага с бактериальной клеткой и в переводе означает «пожирание бактерий». Крайнее выражение процесса бактериофагии – лизис бактерий. Явление бактериофагии впервые заметил Н.Ф. Гамалея в 1898 г., наблюдая просветление свежей культуры сибиреязвенной па-

лочки на жидкой среде. Просветление он объяснил лизисом сибирязвенных бацилл, а действующий фактор назвал бактериолизином.

Широкое и систематическое изучение этого явления было проведено Ф.Эррелем, выделившим в 1917 г. литический агент из испражнений больных дизентерией и назвавшим этот агент *бактериофагом*. Он установил, что капля фильтрата из испражнений выздоравливающего человека, внесенная в пробирку с культурой дизентерийных палочек, вызывала постепенное растворение бактерий (просветление жидкости с культурой). Капля отфильтрованной просветленной жидкости обладала способностью растворять свежую взвесь дизентерийных палочек. Полученная жидкость в ничтожном количестве просветляла новую взвесь и т.д. Таким образом, при многократном пассировании через культуру дизентерийных палочек действие литического агента не ослабевало, а значительно усиливалось (феномен Ф.Эрреля), поэтому Эррель сделал заключение, что литический агент – это живой агент, ультрамикроскопический паразит бактерий.

Действие бактериофага наблюдалось и на твердых питательных средах. При смешивании литического агента с бактериями на фоне сплошного бактериального роста на агаровой среде можно было увидеть стерильные пятна круглой или неправильной формы. Эти стерильные участки возникали на месте лизиса бактерий и были названы Эррелем «негативными колониями» бактериофага.

Ф. Эррель рекомендовал бактериофаг для лечения инфекционных заболеваний. В 1927–1928 гг. он применил фаг во время эпидемии холеры в Индии: для уничтожения вибрионов вливал в колодцы по 30–40 мл бактериофага. Среди населения, пользовавшегося водой из этих колодцев, смертность снизилась с 62 % до 8%.

Размножаются бактериофаги только в живых бактериальных клетках. В основном, стадии взаимодействия фага с клеткой такие же, как и у других вирусов: адсорбция, проникновение в клетку, синтез НК и белков, морфогенез, выход из клетки. Но имеются особенности. Фаги обладают еще более строгой специфичностью взаимодействия. Определенный фаг взаимодействует с определенным видом или подвидом бактерий (это послужило основанием для их наименования по видовым или родовым названиям чувствительных к ним бактерий: стафилофаги, колифаги, дизентерийные фаги

Флекснера и т.п.). На бактерии адсорбируется много фагов, но для лизиса клетки достаточно одного вириона.

Различают: а) *поливалентные* фаги – взаимодействуют с родственными видами бактерий; б) *моновалентные* – взаимодействуют с одним определенным видом; в) *типовые* фаги – взаимодействуют с отдельными вариантами (типами) данного вида бактерий.

Фаги делятся на *вирулентные* и *умеренные*. Вирулентные фаги проникают в клетку, размножаются в ней и вызывают ее лизис. Умеренные фаги проникают в клетку, встраиваются в хромосому бактерии и реплицируются вместе с генами бактерии (т.е. передаются по наследству), не вызывая лизиса. Встроенный в хромосому бактерии фаг называется *профагом*. Бактериальные клетки, содержащие профаг, называются *лизогенными*, а само явление – *лизогения*. Лизогенные культуры не отличаются от исходных по основным свойствам, но имеют: а) иммунитет к последующему заражению этим же фагом; б) дополнительные свойства (образование токсинов, измененные антигенные свойства), обусловленные генами фага. Изменение свойств бактерий под влиянием профага называется *фаговой конверсией*. Под влиянием УФ лучей и химических веществ профаг может превращаться в полноценную фаговую частицу, т.е. в вирулентный фаг. Это явление называется *индукцией фага*.

Если умеренный фаг переходит в вирулентную форму, он может захватить часть хромосомы бактерий и при лизисе перенести эту часть в другую бактериальную клетку. Если эта клетка станет лизогенной, то она приобретет новые свойства. Таким образом, умеренные фаги – мощный фактор изменчивости микроорганизмов.

Умеренные фаги могут нанести вред микробиологическому производству: культуры микроорганизмов, используемые для производства вакцин, антибиотиков, могут стать лизогенными, и в результате появляется опасность, что профаг превратится в вирулентную форму (индукция фага) и лизирует весь штамм.

Морфология фагов очень разнообразна, поэтому в зависимости от строения выделяют пять основных групп (рисунок 5).

Бактериофаги очень широко распространены в природе, они обнаруживаются там, где находятся чувствительные к ним бактерии – в воде, почве, молоке, в испражнениях больных кишечными заболеваниями, в гное и мокроте больных при других бактериальных инфекциях.

Для получения фага содержащий фаг материал (например, испражнения больных дизентерией) засевают в жидкую питательную среду (бульон) и выдерживают в термостате при 37°C 18–20 часов для накопления фага. Затем бульонную культуру фильтруют через бактериальные фильтры для отделения фага от бактериальных клеток. Фильтрат добавляют к свежей культуре дизентерийной палочки, а после ее просветления (свидетельство присутствия и размножения фага и лизиса бактериальных клеток) вновь проводят фильтрацию и добавляют к свежей культуре дизентерийной палочки, т.е. проводят многократное пассирование через культуру чувствительных к фагу бактерий, в результате чего увеличивается количество (титр) выделяемого фага. После накопления достаточного количества фага бульонную культуру вновь отфильтровывают и получают препарат фага. Таким образом, препараты фага – фильтраты бульонных культур лизированных ими бактерий (прозрачные жидкости светло-желтого цвета). Фаги также выпускают в виде таблеток с кислотоустойчивым покрытием, в форме мазей, аэрозолей и свечей (готовят из фильтратов).



Рисунок 5 – Морфология бактериофагов

На препаратах бактериофага обязательно указывается титр фага или количество фаговых частиц в единице объема или в 1 мг

(или в 1 таблетке) препарата.

Количество фаговых частиц можно определить путем посева на чувствительную бактериальную культуру, растущую сплошным газоном на плотной питательной среде. В результате размножения фага, вызывающего лизис бактерий, образуются «стерильные пятна» (бляшки) – негативные колонии фага (они имеют характерную для данного фага форму). Число колоний равно числу фаговых частиц, т.к. один фаг инфицирует одну бактериальную клетку, а стерильное пятно образуется уже в результате его репродукции.

Титр фага – наибольшее разведение фага, которое способно еще вызывать лизис чувствительных к нему бактерий.

Титрование – установление титра – можно осуществить на жидких и плотных питательных средах. Для этого препарат бактериофага разводят от  $10^{-1}$  до  $10^{-9}$  и более. К каждому разведению добавляют одинаковое количество сухой бульонной культуры соответствующих бактерий. Титр определяется после выдерживания в термостате по просветлению бульона в последней пробирке. Например, если первые шесть пробирок остались прозрачными, а в последующих разведениях и в контрольной пробирке имеется рост культуры, то титр фага  $10^{-6}$ . При титровании на плотных средах разведения фага наносят на засеянную сплошным газоном бактериальную культуру. Титр определяется по последней чашке, где еще имеются "стерильные пятна". На практике для лечебных целей чаще всего применяются бактериофаги с титром  $10^{-7}$  и  $10^{-8}$ .

Литическая активность бактериофага, его вирулентность определяются методом титрования на жидкой и плотной питательной среде. Определение вирулентности методом Аппельмана проводится по следующей схеме: набирается ряд пробирок, содержащих по 4,5 мл мясо-пептонного бульона; в первую из них добавляется бактериофаг в количестве 0,5 мл, тщательно перемешивается другой пипеткой и в количестве 0,5 мл переносится в следующую пробирку, из второй – 0,5 мл в третью и т.д. В серии пробирок бактериофаг разводится 1:10; 1:100; 1:1000 и т.д. Во все пробирки, включая и контрольную, содержащую только 4,5 мл бульона, вносят по 250 млн микробных тел сухой культуры соответствующих бактерий, затем ставят их на 18–20 часов в термостат, после чего учитывают результат. Степень лизиса отмечается плюсами следующим образом: четыре плюса (+++) – абсолютная прозрачность среды, равная стерильному бульону; три плюса (+++) – почти полная про-

зрачность, лишь незначительно отличающаяся от стерильного бульона; два плюса (++) – муть, значительная по сравнению со стерильным бульоном, но незначительная по сравнению с контрольной пробиркой; один плюс (+) – явная муть, но все же более слабая, чем в контрольной пробирке, минус (–) – муть, как в контрольной пробирке. За титр бактериофага при определении методом Аппельмана принимают то наибольшее разведение его, которое вызывает полное растворение соответствующих микробов.

Определение вирулентности на плотной питательной среде методом Отто заключается в следующем: на определенные сегменты агаровых пластинок в бактериологических чашках, хорошо подсушенных в термостате и предварительно засеянных сплошным газоном соответствующей культуры, наносится по одной капле исследуемого бактериофага определенного разведения, соответствующего разведению в аппельмановском ряду. Капли подсушиваются и чашки помещаются в термостат на 18–20 часов. Результат учитывается по степени лизиса и обозначается плюсами: четыре плюса (++++) – полный лизис; на месте закапывания бактериофага культура не растет; три плюса (+++) – лизис с наличием единичных колоний культуры; два плюса (++) – лизис в виде сливных участков с островками роста культуры; один плюс (+) – лизис в виде отдельных стерильных пятен на сплошном газоне культуры; минус (–) – сплошной рост культуры, не обнаруживается ни одного стерильного пятна.

Применение фага основано на его строгой специфичности. Они используются для:

а) диагностики инфекционных заболеваний – с помощью известного (диагностического) фага можно определить видовую или типовую принадлежность выделенной культуры. Определение фаговара – *фаготипирование* – имеет большое значение для выявления вариантов (типов) внутри вида, позволяет установить источник и пути распространения инфекции. В настоящее время разработано фаготипирование р. *Salmonella*, р. *Vibrio*, стафилококка. С помощью известной бактериальной тест-культуры можно определить неизвестный фаг в исследуемом материале, что свидетельствует о присутствии в нем соответствующих возбудителей. Присутствие возбудителей в исследуемом материале можно установить по нарастанию титра фага при внесении такого фага в исследуемый материал;

б) лечения и профилактики заболеваний. Лечебный эффект препаратов тем больше, чем раньше от начала болезни начато их применение. Установлена большая эффективность профилактического применения фагов. С профилактической целью их назначают лицам, соприкасавшимся с больным или бактерионосителем.

### *Задания*

1. Зарисуйте виды фагов, используя рисунок 3, дайте их характеристику. Где распространены фаги и как их классифицируют?

2. Приведите примеры препаратов бактериофагов, использующихся в ветеринарной практике, используя дополнительную литературу и информационные источники. Что такое титр фага и как он определяется? Каков титр у препаратов бактериофагов, взятых в качестве примеров? Как используется выбранный препарат? Можно ли его использовать для профилактики бактериальных инфекций у животных?

3. Проведите исследование проб водопроводной и речной воды на наличие колифагов. Для этого разлейте питательный бульон с культурой кишечной палочки на четыре пробирки по 10 мл. Подпишите пробирки по номерам. В первую добавить 1 мл препарата бактериофага, во вторую – 1 мл речной воды, в третью – 1 мл водопроводной воды, четвертую оставьте для контроля. Поместите штатив с пробирками в термостат до следующего занятия. Через 24 – 48 ч. проведите оценку лизической активности. Заполните таблицу 4 и сделайте вывод по результатам эксперимента.

*Таблица 4 – Обнаружение колифагов в пробах воды*

№ пробирки	1	2	3	4
Состав и характеристика до начала инкубации (прозрачность, мутность, цвет)				
Характеристика после инкубации (прозрачность, мутность, цвет)				
Вывод				

## **Подготовка биологического материала для вирусологических исследований**

### *Общие положения*

Для проведения вирусологических исследований взятый от больных животных и трупов вирусологический материал необходимо очистить и подготовить.

*Методы очистки вируссодержащего материала* подразделяются на механические физические, химические и биологические. Материал необходимо освободить от взвешенных плотных частиц песка, от обрывков тканей и клеточных элементов, от бактериальной и грибковой микрофлоры.

#### *Механические:*

*Фильтрация.* Рабочую суспензию освобождают от сравнительно крупных взвешенных твердых частиц через бактериальные фильтры (свечи Пастера, Беркефельда, фильтры ВГНКИ, фильтры Зейтца). При этом вируссодержащий материал освобождается от клеточных элементов и бактериальной микрофлоры.

*Центрифugование.* 10 % рабочую суспензию наливают в стерильные центрифужные пробирки и центрифигируют при 6–8 тыс. об/мин 10–15 минут. При этом осаждаются не только частицы песка, стекла, обрывки клеток, но и бактериальная микрофлора. В надосадочной жидкости останется чистое вещество. Отбирают 2/3 надосадочной жидкости в стерильных условиях.

#### *Физические:*

*Метод термолизиса.* Рабочую суспензию помещают в стерильную пробирку и её погружают в сосуд с сухим льдом ( $-70^0\text{C}$ ) и  $96^0\text{C}$  спиртом; через 15–20 минут накрывают и выдерживают до замораживания, а затем пробирку с рабочей суспензией переносят в термостат на 30 минут. Эту манипуляцию повторяют 3–4 раза. При такой обработке происходит разрыв тканей, микробных клеток и освобождение вируса. Затем готовят 10 % рабочую суспензию, которую при 4000 об/мин центрифигируют 10–15 минут. В осадок уходят обрывки тканей, микробы и клеточные элементы, а в надосадочной жидкости остается чистый вирус.

*Химический метод очистки* используется при работе с известными вирусами, на которые эфир или хлороформ не оказывает губительного действия. Для этого в пробирку с 10%-ной рабочей суспензией добавляют равный объем хлороформа или эфира и поме-

щают в холодильник при температуре минус 10–20°C на 20 минут. Затем суспензию встряхивают 20 минут и центрифугируют при 3000–4000 об/мин в течение 20–30 минут. Хлороформ, эфир действует губительно на микрофлору, но не действует на вещество, так микрофлора погибает через 10–15 минут.

#### *Биологический метод очистки.*

Известно, что многие антибиотики не оказывают губительного действия на вещества, надежно убивают бактериальную микрофлору. С этой целью к рабочей суспензии добавляют пенициллин - для подавления грамм «+» микрофлоры, стрептомицин для подавления грамм «-» микрофлоры и нистатин для подавления грибковой микрофлоры в дозе от 500 до 2000 ЕД./мл в зависимости от степени бактериального загрязнения материала, и выдерживать 1 час. Для проверки суспензии на стерильность в отношении бактериальной микрофлоры делают посевы на МПА, МПБ, МППБ среду Сабуро или Чапека. Если в течение 3 суток роста микрофлоры нет, то суспензия считается стерильной и она пригодна к дальнейшей вирусологической работе по культивированию вирусов. Этот метод используется наиболее часто в лабораториях для очистки вирусодержащего материала от бактериальной микрофлоры.

#### *Подготовка органов и тканей.*

При проведении исследований органов и тканей на содержание вирусов их необходимо высвободить из клеток. Для этого материал тщательно измельчают ножницами и растирают в ступке, иногда со стерильным кварцевым песком (для лучшего измельчения). Из растертого материала обычно готовят 10 %-ную суспензию на фосфатном буфере или растворе Хенкса. Полученную суспензию центрифугируют при 1500–3000 об/мин, надосадочную жидкость отсасывают в стерильные флаконы и освобождают от микрофлоры, либо, пропуская через бактериальные фильтры (это делают редко, так как теряется много вируса за счет адсорбции на фильтре), либо обрабатывая антибиотиками широкого спектра действия (пенициллин, стрептомицин, нистатин, тетрациклин, кристалломицин и т.д.). Дозы антибиотиков, применяемых для этой цели, могут колебаться в довольно широких пределах: от 100 до 1–2 тыс. ЕД. и более на 1 мл в зависимости от характера исследуемого материала. Следует избегать излишне больших доз антибиотиков, так как их избыток при дальнейшем внесении в культуру клеток может вызвать неспецифическую дегенерацию последних. Предпочтитель-

ность тех или иных доз антибиотиков и оптимальный режим центрифугирования в каждом конкретном случае указываются в инструкции по диагностике соответствующих вирусных болезней.

Экспозиция супензии с антибиотиками не менее 30–60 минут при комнатной температуре, затем материал подвергают бактериологическому контролю на наличие бактерий, грибов путем посева на МПА, МПБ, МППБ и среду Сабуро. После получения отрицательного результата бактериологического контроля вирусодержащий материал используют для заражения лабораторных животных, куриных эмбрионов или культур клеток. В случае положительного бактериологического контроля супензию вируса подвергают дополнительной обработке антибиотиками и повторно ставят контроль. Супензию хранят при минус 20 °С – минус 70 °С.

*Подготовка выделений из носа, глаз.*

Тампоны, погруженные в соответствующий раствор, встряхивают 10–15 мин, тщательно отжимают, полученную жидкость центрифугируют 20 мин при 2–3 тыс.об/мин. Надосадочную жидкость отсасывают в стерильную пробирку и в нее добавляют пенициллин и стрептомицин по 500–1000 ЕД. на 1 мл, выдерживают и после бактериологического контроля используют для заражения. Из осадка клеток готовят мазки для РИФ.

*Подготовка фекалий.*

Пробу кала (приблизительно 1 г) помещают в баночку с бусами, содержащую 10 мл раствора Хенкса или фосфатно-буферного раствора. После гемогенизации материала встряхиванием и последующего центрифугирования при 2–3 тыс.об/мин в течение 30 мин надосадочную жидкость отсасывают пипеткой, добавляют пенициллин, стрептомицин по 500–1000 ЕД./мл, нистатин 30 ЕД./мл и 200 мкг тетрациклина на 1 мл. После 30–60-минутного контакта производят посев па стерильность, замораживают и хранят при минус 10 °С – минус 20 °С. В день заражения исследуемый материал оттаивают и повторно центрифугируют для удаления вновь образующегося после замораживания осадка. Неиспользованный материал хранят в замороженном состоянии до конца исследования.

Исследование кала может быть заменено ректальными мазками, обработка которых требует меньше времени, а частота выделения вируса при этом не только не меньше, но иногда выше, чем при исследовании кала.

### *Подготовка мочи.*

Мочу обрабатывают антибиотиками (500–1000 ЕД/мл) и используют для заражения.

### *Подготовка содержимого папул, пузырьков и кожных чешуек.*

Содержимое папул, пузырьков и пустул, чешуйки и корки исследуют при кожных высыпаниях. Содержимое папул и пузырьков разводят физиологическим раствором 1:5, а корки, чешуйки после растирания суспендируют в солевом растворе 1:5-1:10 и центрифугируют при 2–3 тыс. мин в течение 10–15 мин. После обработки пенициллином и стрептомицином (по 200–500 ЕД./мл) материал используют для заражения.

### *Подготовка крови.*

Для выделения вируса может быть использована либо цельная дефибринированная, либо «лаковая» кровь, либо кровь с антикоагулянтом. В последнем случае берут 5 мл крови в пробирку с 5–6 каплями гепарина и замораживают. После оттаивания гемолизированную кровь центрифугируют при 23 тыс. об./мин в течение 15 мин, добавляют пенициллин и стрептомицин из расчета 100–200 ЕД./мл и после проверки на стерильность используют для заражения. Для этих целей пригодна и свернувшаяся кровь. Ее растирают в ступке и добавляют небольшое количество раствора Хенкса (1:1 или 1:2).

### *Отбор крови для серологических исследований.*

Для серологической диагностики необходимо иметь сыворотки двух проб крови (парные сыворотки), взятых в начале и в конце болезни. Первую пробу берут как можно раньше – в инкубационный период или в начале проявления клинических симптомов болезни, вторую – во время выздоровления или через 2–3 недели после заболевания. Брать кровь и готовить сыворотку необходимо стерильно, нельзя применять антикоагулянты или консерванты, которые могут сделать сыворотку антитокомплементарной, а в реакции нейтрализации оказывать инактивирующее действие на вирус или оказаться токсичными для культур клеток либо просто нестерильными. Кровь в объеме 10–15 мл берут в стерильные пробирки с резиновыми пробками, выдерживают при комнатной температуре до образования сгустка, обводят стеклянной палочкой (или другим инструментом) и переносят в холодильник при 4 °C на 18–20 ч. После максимальной ретракции сгустка сыворотку отсасывают, добавляют антибиотики – пенициллин и стрептомицин по 100 ЕД./мл, про-

водят высевы на бактериологические среды. Вместо отстаивания в холодильнике можно после обведения кровь центрифугировать.

Серологические методы вирусологической диагностики требуют исследования парных сывороток, поэтому необходимо правильно сохранять первые пробы, пока не будут получены вторые. Хранить сыворотки необходимо в холодильнике при 4 °C или в замороженном состоянии, строго соблюдая порядок нумерации и соответствие записей в журнале и пробах.

#### *Методы концентрации вирусов в рабочей суспензии.*

При многих вирусных инфекциях наблюдается феномен посмертной аутостерилизации. В таком случае количество вирусных частиц настолько мало, что их выделить не удается, поэтому применяют концентрацию вируса. Может использоваться 3 метода: дифференциального центрифугирования, фильтрации рабочей суспензии через коллоидные фильтры, адсорбционный метод

#### *Метод дифференциального центрифугирования.*

Метод основан на том, что вирусные частицы в жидкости значительно легче суспензируются, чем обрывки тканей или микроорганизмов. Для этого 10 % рабочую суспензию разливают в стерильные центрифужные пробирки и центрифугируют 2,5–3 тыс. об/мин – 10–15 мин. (оседают твердые частицы и тканевые элементы). Затем берется 2/3 надосадочной жидкости, центрифугируется при 6,0 – 8,0 тыс. об/мин - 15–20 мин. (оседают микроорганизмы). Вновь берется 2/3 надосадочной жидкости, центрифугируется 20–25 тыс. об/мин - 20–25 мин. (оседают вирусы). Осторожно удаляют 2/3 надосадочной жидкости, встряхивают, вирусы суспензируются и его концентрация в 2–3 раза будет выше, чем в первоначально приготовленной рабочей суспензии, и он будет очищен от тканевых элементов и микроорганизмов.

#### *Метод фильтрации рабочей суспензии через коллоидные фильтры.*

Поры коллоидных фильтров пропускают только воду, но не пропускают микробы и вирусы. При фильтрации 10 % рабочей суспензии вирусы адсорбируются на поверхности фильтра, микробы нет. Фильтр промывают фосфатно-буферным раствором. При этом удаляются крупные тканевые частицы и значительная часть микрофлоры. Фильтр измельчают и помещают в меньший объем стерильного фосфатного буфера. Центрифугируют 10–15 минут при 8000 об/мин. При этом в осадок уйдут частицы коллоидного

фильтра, бактериальная микрофлора. А в надосадочной жидкости останется вирус, и его концентрация будет больше, чем в исходном растворе.

#### *Адсорбционный метод (по Соколову).*

Метод основан на способности вирусов адсорбироваться на поверхности эритроцитов. Спектр адсорбционной способности вируса широк – частицы глины, гипса, угля, гидроокись алюминия и др., что находит применение в вирусологической практике. Для этого берется 20 мл вируссодержащей жидкости, добавляется 1 %-ая взвесь отмытых эритроцитов кур или других животных (1% к объему жидкости). Смесь встряхивают, помещают в холодильник при температуре + 4 °C + 5 °C на 2–3 часа. При этом вирус адсорбируется на эритроцитах. Смесь центрифугируют при 1,5 – 2,5 тыс. об/мин – 5–10 минут, в результате чего в осадок выпадают эритроциты вместе с адсорбированным вирусом. Надосадочную жидкость сливают, добавляют к осадку 2 мл физиологического раствора, осадок встряхивают, помещают в термостат при температуре 37 °C на 2 часа, где происходит элюция (сползание) вируса с эритроцитов. Суспензию центрифугируют при 1,5 – 2,0 тыс. об/мин - 5–10 минут. В осадок выпадают эритроциты, а в надосадочной жидкости находится вирус концентрация которого в 10 раз больше, чем в исходном вируссодержащем материале.

### *Задания*

1. Используя кусочки тканей внутренних органов и крови животных, проведите их подготовку к дальнейшим вирусологическим исследованиям с использованием методов центрифугирования, биологической очистки и концентрации вирусов.

2. Из пробирки с приготовленной суспензией проведите контрольный посев на МПА. Пробирки подпишите, поставьте в штативы и поместите в холодильник при температуре +4 °C до следующего занятия. Чашки Петри также подписываются и ставятся в термостат при температуре +25 °C.

3. Опишите методы извлечения, очистки и концентрации вирусов из биологических материалов, направленных на исследование. Какие биологические материалы отбираются от больных и падших животных?

4. Используя учебники, материалы лекций и дополнительную литературу опишите методику сбора, транспортировки и хранения проб для вирусологических исследований.

## **Культивирование вирусов**

### *Общие положения*

Культивирование вирусов человека и животных проводят с целью лабораторной диагностики вирусных инфекций, для изучения патогенеза и иммунитета при вирусных инфекциях, а также для получения диагностических и вакцинных препаратов. Вирусы культивируют на трех биологических моделях: в организме лабораторных животных, в развивающихся эмбрионах птиц (чаще на куриных эмбрионах) и культурах клеток (тканей).

Выращенные вирусы определяют с помощью методов индикации и идентификации. *Индикация* вирусов, т.е. обнаружение факта их репродукции, основана на выявлении различных биологических свойств вирусов и особенностей их взаимодействия с чувствительными клетками. *Идентификация* (определение вида, типа) вирусов осуществляется, в основном, с помощью иммuno-логических реакций, основанных на взаимодействии антигенов вирусов и соответствующих им антител.

*Лабораторных животных* (взрослых или новорожденных белых мышей, хомяков, кроликов, обезьян и др.) заражают исследуемым вирусодержащим материалом различными способами (подкожно, внутримышечно, интраназально, интрацеребрально и т. д.) в зависимости от тропизма вирусов. Использование животных для культивирования вирусов в диагностических целях весьма ограничено из-за видовой невосприимчивости животных ко многим вирусам человека, контаминации животных посторонними микробами, а также по экономическим и этическим соображениям.

О репродукции вирусов в организме животных судят по развитию у них видимых клинических проявлений заболевания, патоморфологическим изменениям органов и тканей, а также на основании *реакции гемагглютинации* (РГА) с суспензией из органов, содержащих вирусы. РГА основана на способности многих вирусов вызывать склеивание (агглютинацию) эритроцитов человека, птиц и млекопитающих в результате взаимодействия вирусных белков (гемагглютининов) с рецепторами эритроцитов.

*Куриные эмбрионы* (5–12-дневные) заражают путем введения исследуемого материала в различные полости и ткани зародыша. Таким образом, можно культивировать вирусы гриппа, герпеса, натуральной оспы и др. Достоинствами модели являются: возможность накопления вирусов в больших количествах; отсутствие скрытых вирусных инфекций; доступность для любой лаборатории. О репродукции вирусов в куриных эмбрионах свидетельствуют: специфические поражения оболочек и тела эмбриона (осины, кровоизлияния); гибель эмбриона; положительная РГА с вирусодержащей жидкостью, полученной из полостей зараженного зародыша.

Методику культивирования вирусов в развивающихся эмбрионах птиц используют при промышленном выращивании вирусов. Однако многие вирусы не размножаются в эмбрионах птиц, поэтому почти неограниченные возможности для культивирования вирусов появились после открытия метода культур клеток.

*Культуру клеток* (тканей) наиболее часто применяют для культивирования вирусов. Метод культур клеток разработан в 50-х годах XX века Дж. Эндерсон и соавт., получившими за это открытие Нобелевскую премию. Клетки, полученные из различных органов и тканей человека, животных, птиц и других биологических объектов, размножают вне организма на искусственных питательных средах в специальной лабораторной посуде. Большое распространение получили культуры клеток из эмбриональных и опухолевых (злокачественно перерожденных) тканей, обладающих, по сравнению с нормальными клетками взрослого организма, более активной способностью к росту и размножению.

При выращивании культур клеток необходимо выполнение ряда условий:

1) соблюдение правил асептики; 2) использование лабораторной посуды из нейтрального стекла (пробирки, флаконы, матрасы) или специальных реакторов для получения биотехнологической продукции; 3) использование сложных по составу питательных сред (среда 199, Игла), содержащих минеральные соли, аминокислоты, витамины, глюкозу, сыворотку крови животных или человека, буферные растворы для поддержания стабильного pH; 4) добавление антибиотиков к питательной среде для подавления роста посторонних микробов; 5) соблюдение оптимальной температуры (36–38,5 °C) роста клеток.

В зависимости от техники приготовления различают одно-

слойные, суспензионные и органные культуры клеток:

*Однослойные культуры клеток* – клетки способны прикрепляться и размножаться на поверхности химически нейтрального стекла лабораторной посуды в виде монослоя. Они получили наибольшее применение в вирусологии.

*Суспензионные культуры клеток* – клетки размножаются во всем объеме питательной среды при постоянном ее перемешивании с помощью магнитной мешалки или во вращающемся барабане. Их используют для получения большого количества клеток, например, при промышленном получении вирусных вакцин.

*Органные культуры* – цельные кусочки органов и тканей, сохраняющие исходную структуру вне организма (применяются ограниченно).

Культуры клеток в процессе их культивирования способны проходить десятки генераций. По числу жизнеспособных генераций культуры клеток подразделяют на: 1) первичные, или первично-трипсинизированные; 2) перевиваемые, или стабильные; 3) полуперевиваемые.

*Первичные культуры* способны размножаться только в первых генерациях, т. е. выдерживают не более 5–10 пассажей после выделения из тканей. В основе получения первичных культур лежит обработка кусочков тканей (эмбриональных, опухолевых или нормальных) протеолитическими ферментами, например трипсином, который разрушает межклеточные связи в тканях и органах с образованием изолированных клеток.

*Перевиваемые, или стабильные, культуры* клеток способны размножаться в лабораторных условиях неопределенно длительный срок (десятки лет), т.е. выдерживают многочисленные пассажи. Их получают преимущественно из опухолевых или эмбриональных тканей, обладающих большой потенцией роста. Перевиваемые культуры клеток имеют преимущества перед первичными культурами. К ним относятся: продолжительность их культивирования, высокая скорость размножения опухолевых и эмбриональных клеток, меньшая трудоемкость, способность культур сохранять свои свойства в замороженном состоянии в течение многих лет, возможность использования международных линий культур во многих лабораториях мира. Однако злокачественный характер клеток и соматические мутации, претерпеваемые нормальными клетками в процессе многочисленных генераций, ограничивают использование

этого вида культур, в частности невозможно их применение в производстве вирусных вакцин.

*Полуперевиваемые культуры* клеток имеют ограниченную продолжительность жизни и выдерживают 40–50 пассажей. Их обычно получают из диплоидных клеток эмбриона человека. В процессе пассажей эти культуры сохраняют диплоидный набор хромосом, характерный для соматических клеток исходной ткани, и не претерпевают злокачественной трансформации. Поэтому полу-перевиваемые культуры клеток могут быть использованы как в диагностике, так и в производстве вакцин.

Внедрение в вирусологию метода культур клеток позволило выделить и идентифицировать многочисленные ранее неизвестные вирусы, так как почти к каждому вирусу можно подобрать соответствующие чувствительные клетки, в которых он способен репродуцироваться. Метод дал возможность изучать взаимодействие вирусов с клеткой на молекулярном уровне, получать высококачественные вакциновые и диагностические препараты, проводить вирусологические исследования в стандартных условиях.

О репродукции вирусов в культуре клеток, зараженных вирусодержащим материалом, можно судить на основании следующих феноменов: *цитопатогенного действия* (ЦПД) вирусов, или *цитопатического эффекта*, образования внутриклеточных *включений*; образования «блешек»; реакций *гемадсорбции* и *гемагглютинации*; «цветной» реакции.

ЦПД – патологические изменения морфологии клеток, вплоть до их гибели, возникающие в результате репродукции вирусов, и наблюдаемые под микроскопом. В зависимости от особенностей репродуцирующихся вирусов ЦПД может отличаться. В одних случаях быстро вакуолизируется цитоплазма, разрушаются митохондрии, округляются и гибнут клетки, а в других – формируются гигантские многоядерные клетки (так называемые симпласты) или наблюдается явление клеточной пролиферации, которое в итоге заканчивается деструкцией клеток. Таким образом, характер ЦПД позволяет использовать этот феномен не только для индикации вирусов, но и для их ориентировочной идентификации в культуре клеток.

Некоторые вирусы можно обнаружить и идентифицировать по внутриклеточным *включениям*, которые образуются в ядре или цитоплазме зараженных клеток. Часто включения представляют собой

скопления вирусных частиц или отдельных компонентов вирусов, иногда могут содержать клеточный материал. Выявляют включения с помощью светового или люминесцентного микроскопа после окрашивания зараженных клеток соответственно анилиновыми красителями или флюорохромами. Включения могут отличаться по величине (от 0,2 до 25 мкм), форме (округлые или неправильные) и численности (одиночные и множественные). Характерные цитоплазматические включения формируются в клетках, инфицированных вирусом натуральной оспы (тельца Гварниери), бешенства (тельца Бабеша–Негри), а внутриядерные включения – при заражении адено-вирусами или вирусами герпеса.

«Бляшки», или «негативные колонии», — представляют собой ограниченные участки разрушенных вирусами клеток в сплошном монослое культур клеток. Они видны невооруженным глазом в виде светлых пятен на фоне окрашенного монослоя живых клеток. Добавление агара в питательную среду ограничивает распространение вирусов по всему монослою после выхода их из разрушенной клетки и обеспечивает взаимодействие вирусов только с соседними клетками. Каждая «бляшка» образуется потомством одного вириона. Подсчитав количество «бляшек», можно определить концентрацию вирусов в исследуемом материале. Кроме того, «бляшки» разных групп вирусов отличаются по размеру, форме, срокам появления. Поэтому метод «бляшек» используют для дифференциации вирусов, а также для селекции штаммов и получения чистых линий вирусов.

В основе *реакции гемадсорбции* лежит способность культур клеток, инфицированных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты. Целый ряд вирусов (гриппа, парагриппа и др.) обладают гемадсорбирующими свойствами, что позволяет использовать реакцию гемадсорбции для индикации этих вирусов даже при отсутствии выраженного ЦПД в культуре клеток. Механизмы реакции гемадсорбции и гемагглютинации сходны. Поэтому для обнаружения репродукции некоторых вирусов в культуре клеток можно использовать реакцию гемагглютинации с культуральной жидкостью, т.е. с питательной средой, содержащей размножившиеся вирусы.

О репродукции вирусов в культуре клеток можно также судить по так называемой «цветной» реакции. Она регистрируется по изменению цвета индикатора, находящегося в питательной среде

для культур клеток. Если вирусы не размножаются в культуре клеток, то живые клетки в процессе своего метаболизма выделяют кислые продукты, изменяющие pH среды и, соответственно, цвета индикатора. При репродукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается (клетки гибнут), и среда сохраняет первоначальный цвет индикатора.

### Задания

1. Зарисуйте строение куриного эмбриона, обозначив его части и способы заражения, используя рисунок 6. Опишите последовательность действий при культивировании вирусов на куриных эмбрионах.

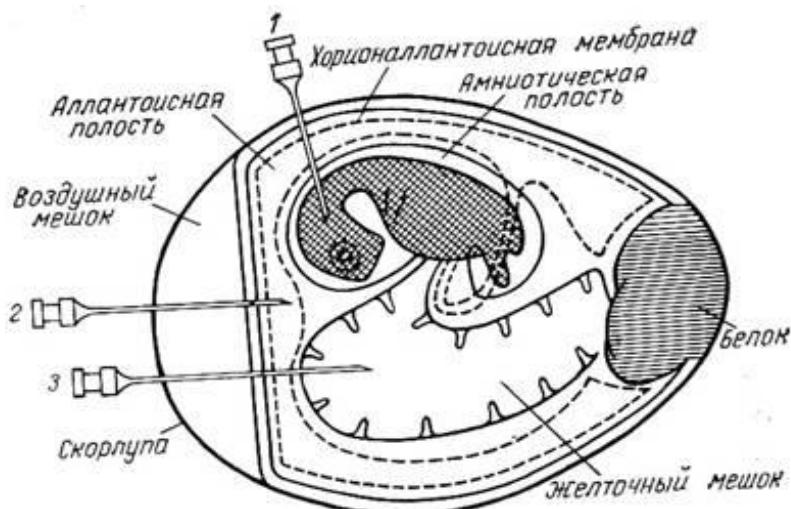


Рисунок 6 – Культивирование вируса на куриных эмбрионах

2. Используя общие положения и дополнительную литературу, дайте ответы на вопросы. Какими требованиями должны обладать лабораторные животные, использующиеся для культивирования, диагностики и накопления вируса? Какими способами проводится маркировка зараженных животных? Какими должны быть условия содержания здоровых и зараженных животных? Как проявляется действие вируса на лабораторных животных?

3. Ознакомьтесь с материалом таблиц 5 и 6. Составьте схему проведения диагностики бешенства и гриппа свиней с использованием лабораторных животных. Сколько животных нужно подобрать для проведения исследований по каждому варианту? Через ка-

кое время могут появиться симптомы размножения вируса? Как осуществляется фиксация наблюдений?

*Таблица 5 – Использование лабораторных животных  
в качестве биологической пробы при вирусных  
болезнях сельскохозяйственных животных и птиц*

Вид животного	Восприимчивость к вирусу	Метод введения	Признаки размножения
Кролики	Бешенство	Интрацеребрально, внутримышечно	Параличи, гибель
	Ящур (новорожденные)	Подкожно	Параличи, гибель
	Болезнь Ауески	Внутримышечно, подкожно	Энцефалитическая, зудневая, менингитальная форма, гибель
	Контагиозная экзема овец	Скарификация кожи, слизистые оболочки	Оспенные поражения в местах введения
	Миксомы кроликов	Внутримышечно, подкожно	Отек в области головы, гениталий
Морские свинки	Бешенство	Интрацеребрально	Параличи, гибель
	Ящур (новорожденные)	Внутрикожно	Афты на месте введения
	Везикулярный стоматит	Внутрикожно	Везикулы, поражение печени и почек
	Ринопневмония лошадей	Внутрибрюшинно	Аборты
	Чума плотоядных	Подкожно, перорально	Подъем температуры
Белые крысы	Грипп свиней	Интеранозально	Поражение органов дыхания, гибель
	Болезнь Ауески	Интеранозально, подкожно	Параличи, гибель
Белые мыши	Бешенство	Интрацеребрально, подкожно	Параличи, гибель
	Ящур (новорожденные)	Интрацеребрально	Спастическая парапления, параличи, гибель
	Болезнь Ауески	Подкожно, интрацеребрально	Параличи, гибель
	Везикулярный стоматит	Внутрибрюшинно, интрацеребрально	Симптомы энцефалита, гибель

*Продолжение таблицы 5*

	Грипп лошадей	Интрацеребрально	Конъюктивит, симптомы пневмонии, гибель
	Грипп свиней	Интрацеребрально	Конъюктивит, симптомы пневмонии, гибель
	Африканская чума однокопытных	Интрацеребрально	Симптомы энцефалита, гибель

*Таблица 6 – Максимальные объемы, вводимого вирусного материала для лабораторных животных, мл*

Методы введения	Кролики	Морские свинки	Белые крысы	Белые мыши
Внутрикожно	0,1	0,1	0,05	0,02
Подкожно	5,0	3,0	3,0	0,5
Внутримышечно	5,0	2,0	1,0	0,3
Внутрибрюшинно	10,0	5,0	2,0	1,0
Внутривенно	5,0	2,0	2,0	1,0
Интрацеребрально	1,0	0,3	0,1	0,03
Интероназально	0,3	0,05	0,03	0,02

4. Используя общие положения и дополнительную литературу, заполните таблицу 7. Дайте характеристику видов культур клеток. Какие из них широко используются в вирусологии и с какой целью?

*Таблица 7 – Характеристика культур клеток*

Виды культур клеток	Характеристика	Цитопатические эффекты
Однослойные		
Сусpenзионные		
Органные		
Первичные		
Перевиваемые		
Полуперевиваемые		

1. Проведите заражение куриного эмбриона вирусодержащей супензией, приготовленной на предыдущем занятии, в аллантоисную полость. Подпишите и поместите куриные эмбрионы в

термостат. На следующем занятии опишите полученные цитопатические эффекты.

## **Индикация и идентификация вирусов методами микроскопии**

### *Общие положения*

Световая вирусоскопия применяется для обнаружения с помощью светового микроскопа, в мазках из патологического материала при ряде вирусных заболеваний животных, внутриклеточных телец-включений и элементарных телец.

Долгое время считалось, что вирусы не видимы в световой микроскоп, однако, позже было установлено, что некоторые наиболее крупные вирусы величиной 200–300 нм, при отдельных способах окраски, находятся на границе видимости в световом микроскопе. Эти множественные внутриклеточные частицы были впервые установлены Боллингером еще в 1873 году. В 1904 году Борелю удалось обнаружить подобные образования в клетках кожи птиц, больных оспой. В 1906 году Пашен обнаружил и описал аналогичные тельца при оспе овец. Вскоре ученые обнаружили подобные образования при оспе человека, крупного рогатого скота, коз, кроликов и других видов животных и птиц. Эти внутриклеточные образования, обнаруженные в инфицированных вирусом клетках кожи, были названы *элементарными тельцами*. При изучении этих телец в электронном микроскопе было абсолютно доказано, что мелкая и крупная внутриклеточная зернистость представляет собой отдельные зрелые вирионы крупных вирусов или их скопление в клетке. Путем изоляции элементарных телец из пораженной клетки с последующим заражением ими чувствительных животных, во всех случаях воспроизведено типичное заболевание.

Таким образом, элементарные тельца представляют собой отдельные зрелые вирионы (подобно кокку, бактерии, бацилле) или их скоплений в клетке.

Кроме элементарных телец, при некоторых вирусных заболеваниях, в цитоплазме и ядре пораженных клеток были обнаружены сравнительно крупные образования, получившие название телец-включений.

В одной инфицированной клетке их количество может колебаться от одного до шести образований. По форме эти образования

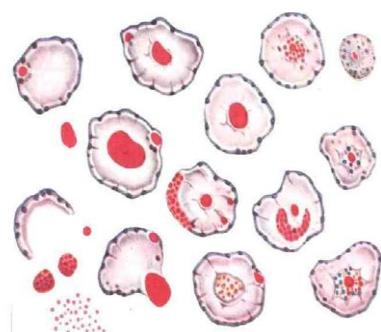
могут быть круглые, овальные, реже квадратные, треугольные и др. Размеры их колеблются от 1–20 мкм. Поэтому их хорошо видно в обычный световой микроскоп, в препаратах окрашенных специальными методами. В окрашенных препаратах тельца-включения имеют оксифильное родство и воспринимают определенный спектр краски, в то время как клеточные структуры имеют основное тинкториальное родство к краскам. Поэтому тельца-включения избирательно окрашиваются в различный цвет, а клеточные структуры в голубой или фиолетовый цвет. При других способах окраски тельца-включения окрашиваются в соответствующий цвет, более интенсивный, по сравнению с цитоплазмой или ядром, и становятся хорошо видимы в клетках.

Поскольку тельца-включения и элементарные тельца строго специфичны, обнаруживаются только при определенных вирусных заболеваниях и не встречаются в клетках здоровых людей и животных, то обнаружение их с учетом эпизоотической ситуации, клинических симптомов болезни и картины вскрытия, является основанием для постановки окончательного диагноза. При коротком инкубационном периоде болезни телец-включений может и не быть, а поэтому для диагностики этих заболеваний применяют другие методы исследований.

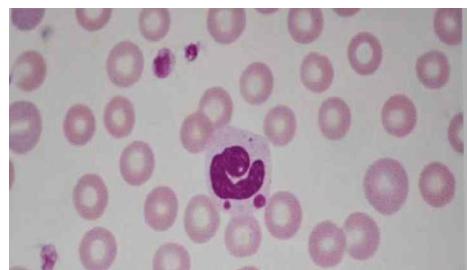
Хорошо изучены элементарные тельца Боллингера при осиптиц, тельца Пашена при осипе овец, тельца Гварнери- при осипвакцине, тельца Бабеша-Негри- при бешенстве, внутриядерные тельца Иост-Догена- при болезни Борна лошадей (инфекционном энцефаломиелите лошадей), тельца Гейнтарца- при чуме плотоядных, тельца Руборта- при инфекционном гепатите плотоядных и др. при некоторых заболеваниях в пораженных клетках встречаются безымянные тельца-включения (рисунок 7).

Происхождение большинства телец-включений до настоящего времени изучено недостаточно. Одни ученые считают, что тельца-включения это скопление вирусов. Другие, что тельца-включения есть скопление незрелых и погибших вирионов под действием защитных механизмов клетки хозяина. Третья группа считает, что тельца-включения это скопление инактивированных вирусов и нарушенного клеточного метаболизма под действием вируса. Четвертая группа ученых утверждает, что тельца-включения есть одна из стадий репродукции вируса.

*Развитие внутриядерных включений (тельца Рубарта) в клетках печени*



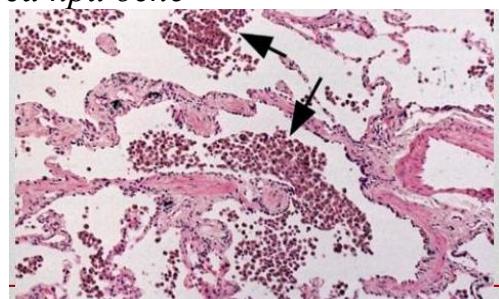
*Включения внутри клетки нейтрофила при чуме собак (тельца Гейнтица)*



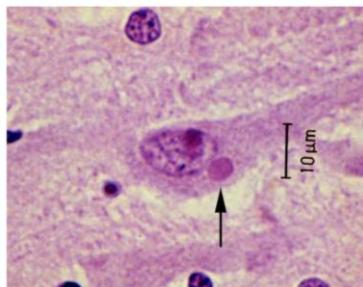
*Тельца Барреля при оспе овец*



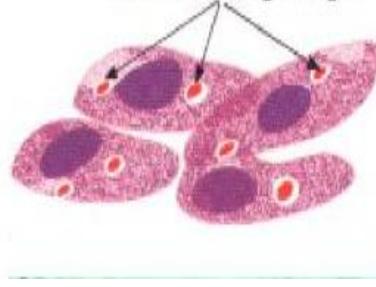
*Тельца Пашина в клетках эпидермиса при оспе*



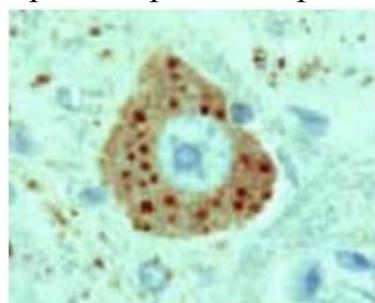
*Тельца Бабеша- Негри при бешенстве*



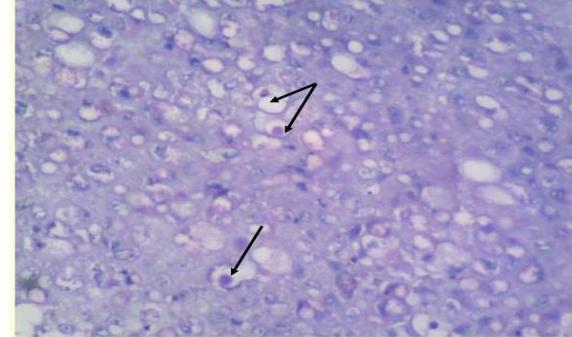
*Тельца Гварнери*



*Характерные ядерные включения при герпесе, гриппе и др.*



*Тельца Болингера в цитоплазме клеток при оспе птиц*



*Рисунок 7 – Тельца-включения в клетках, регистрирующихся при вирусных инфекциях*

Множество научных гипотез относительно происхождения телец-включений связано с тем, что изолированными очищенными тельцами-включениями не всегда удается воспроизвести вирусное заболевание у чувствительных животных.

Наиболее распространенными способами окрашивания препаратов для обнаружения телец-включений является их окраска по методу Романовского, Муромцева. Для обнаружения элементарных телец-окраска по Морозову, Романовскому, Михину.

#### *Окраска по Романовскому*

Этим методом окрашивают элементарные тельца Пашена, Боллингера и другие.

Мазки-отпечатки высушивают на воздухе, фиксируют 3-5 мин. метиловым спиртом 10–15 мин., или в смеси эфира со спиртом (1:1). Затем их погружают в раствор краски Романовского. Приготовленный по следующей прописи: 1 каплю основного раствора краски смешивают с 1 мл дистиллированной воды. Окрашивание проводят на предметном стекле, в специальных ванночках или чашках Петри методом подливания краски под препарат, красят 30–40 минут, затем мазок промывают, высушивают фильтровальной бумагой, ополаскивают спиртом, снова промывают и высушивают. При микроскопии на голубом фоне препарата элементарные тельца Пашена будут красные, а тельца-включения – темно-фиолетовые.

Элементарные тельца Пашена хорошо обнаруживаются при окраске препарата по Морозову. Это сложный метод окраски, в основе которого лежит обработка препарата солями серебра.

При микроскопии препаратов, окрашенных этим методом, элементарные тельца на светло-коричневом фоне клеток имеют вид темно-коричневых округлых зерен. Они могут располагаться группами, одиночно или в виде цепочек.

#### *Окраска по методу Муромцева*

Чаще применяется для обнаружения телец-включений Бабеша-Негри при бешенстве.

Мазки фиксируют в метиловом спирте 3–5 минут, теплой смесью спирта с эфиром наполовину. Фиксирующие жидкости не оказывают негативного действия на качество окрашивания в течение 2–3 недель, поэтому их сохраняют в фиксирующей жидкости.

После фиксации мазок ополаскивают в дистиллированной воде и погружают на 10 минут в синьку Мансона (100 мл дистилли-

рованной воды добавляют 5–8г буры, 2 грамма кристаллической метиленовой сини, которую разбавляют дистиллированной водой 1:40). Непромытый мазок выдерживают в 10 % растворе танина до перехода цвета мазка из сине-фиолетового в светло-голубой. Затем мазок промывают водой, высушивают фильтровальной бумагой. Мазок микроскопируют в иммерсионной системе без покровного стекла. Цитоплазма нервных клеток светло-голубого цвета, ядра клеток синие, тельца Бабеша-Негри розово-фиолетовые или красные с темными включениями.

### *Окраска по методу Михина*

Мазки фиксируют, высушивают фильтровальной бумагой и окрашивают 30–40 минут краской Романовского, разведенной 1:10. Затем мазки промывают подкисленным спиртом (1 капля ледяной уксусной кислоты на 30 мл 96 ° спирта), а затем водой. Мазки высушивают фильтровальной бумагой и микроскопируют. Фон мазка должен быть фиолетово-розовый, нервные клетки голубого цвета, ядра клеток темно-фиолетовые, а тельца Бабеша-Негри розово-красные с точечными включениями темно-синего цвета.

Цитопатическое действие вируса (ЦПД) может проявляться на клеточном, тканевом и организменном уровне. Первые два выявляются при микроскопировании клеток и тканей.

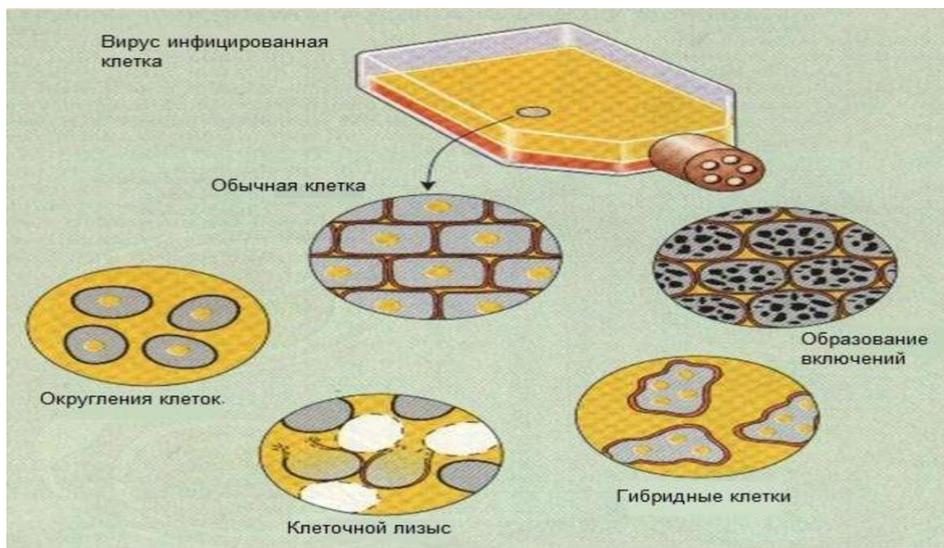
### *Задания*

1. Просмотреть готовые препараты из патматериала с тельцами Бабеша-Негри, Пашена, Руборта, окрашенные по методу Муромцева и Морозова. Зарисовать и обозначить тельца, используя рисунок 7.

2. Приготовить мазок из патматериала. Провести окраску по методу Романовского и микроскопировать. Сделать схематический рисунок поля зрения и выводы.

3. В чем особенности электронной микроскопии? Каковы принципы работы электронного микроскопа? Какое значение имеет электронная микроскопия в вирусологии?

4. Под микроскопом рассмотрите препараты цитопатического действия вирусов. Используя рисунок 8, зарисуйте цитопатические действия вирусов на клеточном и тканевом уровнях. Почему происходят эти изменения в тканях при их заражении вирусом?



*Рисунок 8 – Цитопатическое действие вирусов на клетки и ткани.*

## **ПЦР диагностика в вирусологии**

### *Общие положения*

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) – метод, позволяющий провести многократное увеличение (амплификацию) количества определенных молекул ДНК в анализируемом образце (в том числе в биологическом материале или чистой культуре).

Главные преимущества ПЦР как диагностического метода – очень высокая чувствительность, позволяющая обнаружение крайне малых концентраций возбудителей в образцах, а также регулируемая специфичность, позволяющая обнаруживать или идентифицировать возбудителей на родовом, видовом или субвидовом уровне. Основной недостаток ПЦР вытекает из его крайне высокой чувствительности – образцы очень легко загрязнить ДНК из положительного контроля, другого образца или продукта ПЦР, что приведет к ложноположительной реакции. Это накладывает жесткие ограничения на условия, в которых производится смешивание ПЦР и работа с готовыми продуктами ПЦР.

### *Проведение ПЦР.*

Готовится реакционная смесь, содержащая следующие компоненты:

1. Выделенную ДНК из исследуемого образца;
2. Буферный раствор;

3. Ионы Mg<sup>2+</sup> (необходимы для работы фермента);
4. Два праймера – одноцепочечные короткие молекулы ДНК (длина чаще всего от 18 до 24 нуклеотидов), комплементарные концам разных цепей обнаруживаемой последовательности ДНК;
5. Смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов;
6. Термостойкую ДНК-полимеразу (чаще всего используется Таф-полимераза – полимераза, выделенная из *Thermus aquaticus* ).

Затем данная реакционная смесь помещается в амплификатор, который фактически представляет собой программируемый термостат. В амплификаторе проводится 30–40 циклов смены температур. Каждый из этих циклов состоит из трех этапов (рисунок 9):

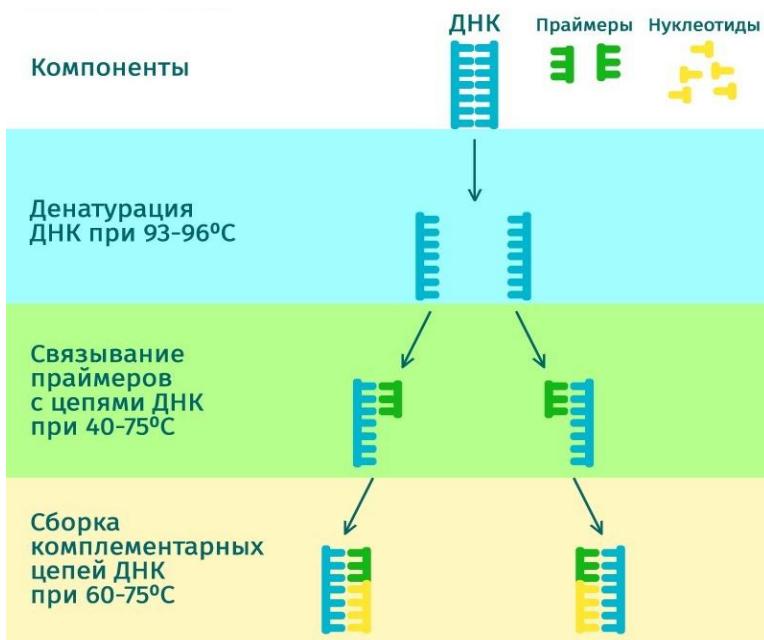
1. Денатурация (температура 94 °C) – разрываются водородные цепи, и цепочки ДНК расходятся.

2. Отжиг праймеров (температура обычно в районе 50–60°C) – к концам цепей ДНК присоединяются праймеры. Вообще, при снижении температуры энергетически выгоднее воссоединение исходных цепей ДНК из исследуемого образца (ренатурация), однако концентрация праймеров в реакционной смеси на много порядков больше концентрации ДНК из образца (по крайней мере, на начальных циклах ПЦР), поэтому реакция отжига праймеров протекает быстрее ренатурации ДНК. Температура отжига выбирается в зависимости от температур плавления (денатурации) праймеров.

3. Элонгация (температура обычно 72 °C) – ДНК-полимераза достраивает праймеры по матрице длинных цепей ДНК. Температура соответствует оптимальной температуре работы используемой ДНК-полимеразы.

На ранних циклах ПЦР количество двухцепочных молекул ДНК, размер которых определяется расстоянием между местами посадки праймеров, удваивается с каждым циклом. Также образуется малое количество более длинных молекул ДНК, которым можно пренебречь.

Таким образом, на ранних циклах количество продукта ПЦР описывается формулой  $m \times 2^n$ , где  $m$  – исходное количество искомой ДНК в пробе,  $n$  – число циклов. Затем реакция выходит на плато. Это происходит из-за накопления продукта реакции, снижения концентрации праймеров и дезоксинуклеотидтрифосфатов, а также за счет повышения концентрации пирофосфата.



*Рисунок 9 – Схема одного цикла ПЦР*

Рассмотрим существующие разновидности ПЦР.

#### *Конвенциональная ПЦР.*

В данном варианте постановки ПЦР реакция идет заранее выбранное число циклов (30–40), после чего анализируется, произошло ли накопление двуцепочечных молекул ДНК в реакционной смеси. Данный вариант постановки ПЦР при использовании в качестве способа диагностики является качественным методом. Положительная реакция свидетельствует о наличии хотя бы следовых количеств искомых молекул ДНК в образце. Отрицательная реакция свидетельствует об их отсутствии. Количественная оценка содержания исходных молекул ДНК в образце невозможна из-за выхода реакции на плато.

Основным методом выявления наличия продукта является *электрофорез в агарозном или полиакриламидном геле*. Продукты ПЦР разделяются в геле под действием электрического поля в соответствии с их молекулярной массой. В гель добавляется интеркалирующий краситель (флуоресцирующий в связанном с двухцепочечной ДНК состоянии – чаще всего бромистый этидий). Таким образом, при облучении ультрафиолетом можно будет увидеть наличие или отсутствие полоски, соответствующей ДНК необходимой молекулярной массы. При проведении ПЦР в диагностических целях всегда ставятся положительный и отрицательный контроли реакции, с которыми сравниваются образцы.

### *ПЦР в реальном времени.*

В данном варианте постановки ПЦР количество продукта ПЦР в реакционной смеси регистрируется постоянно в ходе протекания реакции. Это позволяет построить кривую протекания реакции и, исходя из неё, рассчитать количество искомых молекул ДНК в образцах.

Один из видов проведения ПЦР в реальном времени – с использованием интеркалирующего красителя, который добавляется прямо в реакционную смесь (чаще всего используется SYBRGreen). Другой вид – с использованием одного из видов флуоресцирующих зондов, связывающихся с участком внутри ПЦР-продукта, что позволяет повысить специфичность обнаружения. Детекция флуоресценции происходит непосредственно в приборе в ходе протекания реакции.

Помимо возможности количественного обнаружения, существуют и другие достоинства ПЦР в реальном времени по сравнению с конвенциональной. Данный вариант ПЦР более прост, быстр, а также не требует открывания пробирок с продуктами ПЦР, что уменьшает вероятность загрязнения других образцов. Основной недостаток – более высокая стоимость амплификатора со встроенной возможностью детекции флуоресценции по сравнению с обычным.

### *Цифровая количественная ПЦР.*

Новый, дорогостоящий и пока малораспространенный вариант ПЦР, позволяющий более точно определять количество ДНК в образце. В данном варианте реакционная смесь, содержащая флуоресцентный краситель, разбивается на огромное число микроскопических объемов (например, капелек в эмульсии). После протекания ПЦР анализируется, в какой доле капелек реакция оказалась положительной и, соответственно, наблюдается флуоресценция. Эта доля будет пропорциональна числу искомых молекул ДНК в образце.

### *ПЦР с обратной транскрипцией.*

В данном случае перед тем или иным вариантом ПЦР производится реакция обратной транскрипции (РНК в ДНК) с использованием фермента ревертазы. Таким образом, этот метод позволяет проводить качественное или количественное обнаружение молекул РНК. Это может использоваться для детекции РНК-содержащих

вирусов или определения уровня транскрипции (количества мРНК) того или иного гена.

### Задания

1. Используя рисунок 8, схематично зарисуйте последовательность реакций в одном цикле ПЦР, указав температуру и особенности процесса.
2. Что служит биологическим материалом для ПЦР диагностики и как его следует готовить?
3. Рассмотрите рисунок 10. Для чего предназначены приборы, использующиеся на разных этапах ПЦР? Какие методы лежат в основе работы этих приборов?



Рисунок 10 – оборудование и этапы ПЦР диагностики

4. С помощью материалов лекций и дополнительной информации заполните таблицу 8.

Таблица 8 – Разновидности ПЦР

Разновидности ПЦР	Особенности	Использование

## **Реакции индикации и идентификации вирусов**

### *Общие положения*

Для лабораторной диагностики вирусных инфекционных заболеваний широко используются различные *серологические реакции*, основанные на способности вирусов (антигенов) взаимодействовать с определенными веществами, прежде всего белками (антителами). Они направлены на выявление в сыворотке крови и других жидкостях организма антител, либо самих антигенов этих инфекционных заболеваний, содержащихся в органах, тканях и жидкостях животного организма. Поэтому в зависимости от анализируемого материала используются:

1. Препараты, содержащие антитела – *диагностические сыворотки*: агглютинирующие, преципитирующие, антитоксические, гемолитические, противовирусные, люминесцирующие, антиглобулиновые;
2. Препараты, содержащие антигены – *диагностикумы*: бактериальные, эритроцитарные, вирусные, токсины, аллергены;
3. Диагностические бактериофаги.

Самым простым способом индикации вирусов может служить *реакция агглютинации* (РА) – это ориентировочная проба, которая основана на способности вирусов взаимодействовать с белками, приводя к их выпадению в осадок. Реакция может проводиться на стекле или в лунках планшета. Применяется для определения наличия вируса возбудителя, выделенного от больного. При постановке реакции на предметное стекло наносят диагностическую агглютинирующую сыворотку (в разведении 1:10 или 1:20), затем вносят культуру от больного животного. Реакция положительная, если в капле появляется хлопьевидный осадок. Рядом ставят контроль: вместо сыворотки наносят каплю раствора натрия хлорида.

Эту же реакцию можно поставить в лунках планшета или в пробирках, что позволяет получить разные увеличивающиеся разведения. Агглютинацию учитывают по количеству осадка и степени просветления жидкости в пробирках. Реакцию считают положительной, если агглютинация отмечается в разведении, близком к титру диагностической сыворотки (это разведение, при котором происходит агглютинация). Реакция сопровождается контролями: сыворотка, разведенная изотоническим раствором натрия хлорида,

должна быть прозрачной, взвесь микробов в том же растворе - равномерно мутной, без осадка.

*Реакция непрямой (пассивной) гемагглютинации* (РНГА или РПГА) является разновидностью РА. Этот метод обладает высокой чувствительностью. С помощью РНГА можно решить две задачи: определить антитела в сыворотке крови больного, к которой добавляют антигенный эритроцитарный диагностикум, представляющий собой эритроциты, на которых адсорбированы известные антигены; определить наличие антигенов в исследуемом материале. В этом случае реакцию иногда называют реакцией обратной непрямой гемагглютинации (РОНГА). При постановке к исследуемому материалу добавляют антителенный эритроцитарный диагностикум (эритроциты с адсорбированными на их поверхности антителами). Эритроциты в этой реакции выполняют роль носителей и пассивно вовлекаются в образование иммунных агрегатов. При положительной реакции пассивно склеенные эритроциты покрывают дно лунки ровным слоем с фестончатыми краями («зонтик»); при отсутствии агглютинации эритроциты скапливаются в центральном углублении лунки, образуя компактную «пуговку» с резко очерченными краями. Реакция отличается высокой чувствительностью и позволяет выявлять сравнительно небольшие концентрации антител в исследуемых сыворотках. При необходимости обнаружения антигена в исследуемом материале эритроциты предварительно нагружают специфическими антителами и также ставят РПГА.

*Реакция преципитации* (РП) – это осаждение растворимого антигена при действии антител в присутствии электролита. Видимый эффект реакции (феномен преципитации) – помутнение (образование мутного кольца или осадка – *преципитата*).

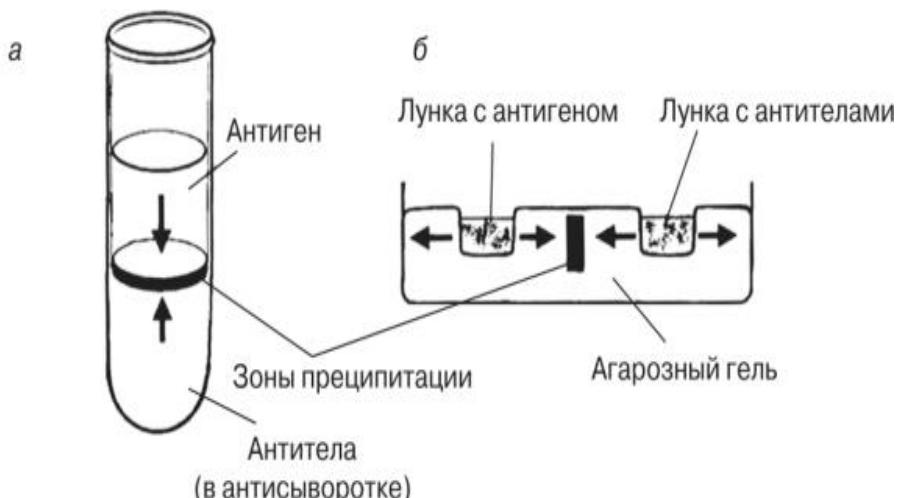
РП применяют для обнаружения неизвестного антигена при ряде инфекционных заболеваний, в том числе вирусных. Эта реакция отличается очень высокой чувствительностью и позволяет обнаружить антиген в разведении 1:1 000 000 и 1: 10 000 000. Для её проведения необходим антиген (*преципитиноген*) - это различные лизаты или экстракты тканей и др., представляющие собой белки и их комплексы с углеводами или липидами). Раствор преципитиногена прозрачный. Вторым компонентом являются антитела (*преципитины*), которые находятся в сыворотке крови или в иммунных диагностических преципитирующих сыворотках, которые содержат

известные антитела. В качестве электролита выступает изотонический раствор хлорида натрия.

#### *Способы постановки РП.*

**1. Реакция кольцепреципитации** – проводится в специальных преципитационных пробирках (диаметр – 0,4–0,5 см, высота – 7–8 см). В пробирку вносят 0,2–0,3 мл преципитирующей сыворотки и по стенке длинным носиком пастеровской пипетки осторожно насылаивают такое же количество преципитиногена. Затем осторожно из горизонтального положения пробирки ставят вертикально (рисунок 11 а).

Учет результатов реакции проводят по появлению белого кольца на границе антиген-антитело. При положительной реакции наблюдается образование такого кольца, в этом случае антиген соответствует антителу и происходит их связывание.



**2. Реакция преципитации в геле** – проводится в чашках Петри или на предметных стеклах, куда помещают слой агарового геля. При застывании геля в нем вырезают лунки, в которые помещают антигены или антитела, или и то и другое. Различают два метода РП в геле:

а) метод *простой (радиальной) иммунодиффузии*: один из компонентов реакции иммунитета (антиген или антитело) помещают в лунку, а другой компонент – смешивают с агаром; при положительном результате (антиген соответствует антителу) вокруг лунки образуется кольцо преципитата (рисунок 11 б);

б) метод *двойной иммунодиффузии*: и антитело и антиген помещают в отдельные лунки, они диффундируют в агаровом геле навстречу друг другу; при положительном результате на месте встрече антитела и антигена образуются линии преципитации.

*Иммуноэлектрофорез* – это метод, который сочетает электрофорез и реакцию преципитации. Смесь антигенов (например, белков сыворотки крови) разделяется в геле при помощи электрофореза. Затем, чтобы найти и определить нужный белок (неизвестный антиген), используют диагностическую преципитирующую сыворотку, которая содержит антитела к этому белку (известное антитело). Для этого в канавку параллельно белкам вносится диагностическая сыворотка. Если среди белков имеется тот, который соответствует антителу, находящемуся в сыворотке, то вокруг него образуются линии преципитации.

*Реакция гемадсорбции* (РГадс) основана на способности культур клеток, инфицированных вирусами, адсорбировать на своей поверхности эритроциты. «Цветная» реакция оценивается по изменению цвета индикатора, находящегося в питательной среде культивирования. Если вирусы не размножаются в культуре клеток, то живые клетки в процессе своего метаболизма выделяют кислые продукты, что ведет к изменению рН среды и соответственно цвета индикатора. При продукции вирусов нормальный метаболизм клеток нарушается (клетки гибнут), и среда сохраняет свой первоначальный цвет.

*Реакция торможения гемадсорбции* (РТГадс.). Принцип реакции базируется на явлении гемадсорбции. Оно заключается в том, что эритроциты приобретают способность адсорбироваться на поверхности культур клеток, которые испытали модификацию в результате появления в оболочке гликопротеинов вирусов. Антитела иммунной сыворотки при взаимодействии с поверхностными антигенами вирусов, представленными в оболочке, связывают их, вследствии чего тормозится адсорбция эритроцитов на клетках.

Компонентами реакции являются вирусы, способные к гемадсорбции, культура клеток, в которой они развиваются, противовирусная сыворотка с разведением 1:10 и больше, 0,4–1,0 % завись эритроцитов петуха, гвинейской свинки или человека, трижды отмытая физраствором или раствором Хенкса. Специфические сыворотки, которые используют в опыте, предварительно обрабатывают ферментами, которые разрушают рецепторы, поддауют температур-

ному влиянию, чтобы освободить от неспецифических ингибиторов гемагглютинации. Реакцию ставят в пробирках или на специальных стеклянных пластинах, на которых есть монослои культуры клеток. Одно из преимуществ РТГадс заключается в том, что ее можно ставить к появлению цитопатического эффекта.

### *Реакция нейтрализации.*

Основными составляющими компонентами реакции нейтрализации (РН) являются: иммунная вируснейтрализующая (опытная) и нормальная (контрольная) сыворотки одного и того же вида животного или человека; содержащий живые вирусы материал, являющийся антигеном; биологические объекты (мыши, куриные эмбрионы), на которых обнаруживают вируснейтрализующее действие иммунной сыворотки. Применяют два варианта постановки реакции нейтрализации. При одном из них берут постоянную дозу сыворотки и различные разведения вируса, при втором – постоянное разведение вируса и различные разведения сыворотки. Во всех случаях последовательность проведения реакции следующая:

- 1) предварительный контакт вируссодержащего материала с соответствующей иммунной сывороткой (один из этих компонентов заведомо известен, наличие другого определяется);
- 2) введение этой смеси в чувствительную биологическую систему (белым мышам или куриным эмбрионам);
- 3) учёт наличия или отсутствия нейтрализации.

Сыворотки получают либо от больных людей, либо применяют диагностические сыворотки от иммунизированных животных. Перед постановкой реакции сыворотки инактивируют, прогревая при температуре 56–60 °C.

Антигены (вируссодержащие взвеси) получают из материала от больных вирусными инфекциями, готовят из органов и тканей заражённых вирусом животных, куриных эмбрионов, а также из инфицированных клеточных культур и подвергают очистке. Перед употреблением антиген титруют для определения его активности.

Биологические объекты выбирают с учётом свойств вируса, чувствительности самого объекта к действию вируса, а также задач и условий исследования.

### *Постановка реакции нейтрализации (I вариант)*

Ставят для идентификации выделенного вируса. Для постановки реакции берут два ряда пробирок, из которых первый ряд является опытным, а второй – контрольным. В первый ряд пробирок

наливают определённое количество неразведённой диагностической иммунной сыворотки, во второй – контрольный – такое же количество неразведённой нормальной сыворотки того же вида животного. Отдельно в пробирках готовят несколько разведений вируса, чтобы при добавлении их в пробирки опытного, контрольного ряда получились последовательные 10-кратные разведения вируса (например,  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  и т.д.). Сыворотки и добавляемые разведения вируса должны быть в одинаковых объёмах, например по 0,2 мл. Пробирки с приготовленной смесью ставят в термостат при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  обычно на 1–2 часа. После этого опытные и контрольные смеси вводят мышам или в куриные эмбрионы. Каждым разведением для достоверности опыта заражают не менее 4 мышей или куриных эмбрионов.

За заражёнными животными (опытными и контрольными) устанавливают наблюдение в течение 2-х недель, регистрируют заболевших и погибших мышей. Учёт реакции проводят путём сопоставления количества погибших опытных и контрольных мышей от соответствующего разведения вируса. Определяют 50 %-ную смертельную дозу –  $\text{LD}_{50}$ , проводя подсчёт по Риду и Менчу. Высчитывают индекс нейтрализации (ИН) по формуле, определяющей количество доз, нейтрализуемых сывороткой:

Титр вируса в опыте с иммунной сывороткой

ИН менее 10 – отрицательный;

ИН – 11–49 – сомнительный;

ИН равный 50 и выше – положительный.

Заряженные эмбрионы инкубируют при температуре  $35\text{--}37^{\circ}\text{C}$  от 48 до 72 ч. Затем яйца вскрывают, аллантоисную или амниотическую жидкость отсасывают и в ней определяют наличие вируса при помощи реакции гемагглютинации. Если гемагглютинация наступила в контроле (смесь нормальной сыворотки с разведениями вируса) и отсутствует в опыте (смесь иммунной сыворотки с разведениями вируса), то сыворотка обладает нейтрализующим действием. Конечный титр вируса в контроле и в опыте определяют путём статистической обработки.

*Постановка реакции нейтрализации (II вариант)*

Реакцию ставят с различными разведениями исследуемой сыворотки и постоянной дозой известного живого вируса. Для этого к двукратным возрастающим разведениям сыворотки добавляют равные объёмы определённого разведения вируса (рекомендуется

брать 100 или 1000 LD<sub>50</sub> вируса). Далее поступают как и в I варианте, то есть выдерживают опытные и контрольные смеси 1–2 часа в термостате, после чего вводят их мышам или куриным эмбрионам.

При постановке реакции нейтрализации на мышах за титр изучаемой сыворотки принимают разведение, дающее защитный эффект у 50 % мышей. В реакции на куриных эмбрионах титром сыворотки считается то наибольшее её разведение, которое ещё способно задержать гемагглютинирующую действие вирусов у 50 % заражённых куриных эмбрионов.

#### *Реакция иммунофлюоресценции (РИФ).*

Один из компонентов иммунной реакции, как правило антитело, метится (конъюгируется) флюоресцирующим красителем. Чаще всего для этого используют флюоресцеинизотиоцианаты (ФИТЦ), дающие зеленое свечение в ультрафиолетовом свете, и тетраметилродаминазотионат (ТРИТЦ) – оранжево-красное свечение. Антитела, которые метят флюорохромом, должны обладать физико-химической гомогенностью. Наиболее подходящими для мечения являются моноклональные антитела, обладающие средством к строго определенным рецепторам антигена. Вторым компонентом выступает антиген (искусственный или известный). Для РИФ могут использоваться антигены, локализованные в клетке или на клетке, срезах тканей.

#### *Варианты постановки РИФ:*

1. *Прямая РИФ.* Для каждого изучаемого антигена используется гомологичная иммунофлюоресцентная сыворотка. Компоненты реакции соединяют и после инкубации проверяют на свечение в ультрафиолетовом свете. Если оно присутствует, то реакции считается положительной поскольку произошло соединение антигена с антителом (рисунок 11);

2. *Непрямая РИФ (РНИФ)* основана на использовании двух различных антисывороток. Вначале применяют немеченные антитела к искусству антигену (или искусственные антитела в сыворотке к известному антигену). Затем образовавшийся комплекс АГ+АТ обрабатывают антилюминесцентной сывороткой, содержащей меченные флюорохромом антитела к иммуноглобулином того вида животных, чья сыворотка использовалась на первом этапе реакции (рисунок 12);

3. *Антикомплементарный метод РИФ (РИФСК)* основан на способности комплемента (сыворотки морских свинок) фиксиро-

ваться на иммунном комплексе. В этом варианте используют люминесцентные сыворотки против глобулинов (комплемента) морской свинки

4. РГИФ (*реакция гашения иммунофлюоресценции*). Используется для выявления титра антител в исследуемой сыворотке, при наличии известного клеточного антигена и специфической к нему люминесцентной сыворотки. На первом этапе на известный антиген наносят исследуемую сыворотку, и если в ней есть соответствующие антигену антитела, они занимают его эпитопы. При добавлении на втором этапе люминесцентной сыворотки к данным антигенам, присоединение люминесцентных антител к эпитопам происходит не будет. Свечения не наблюдается.

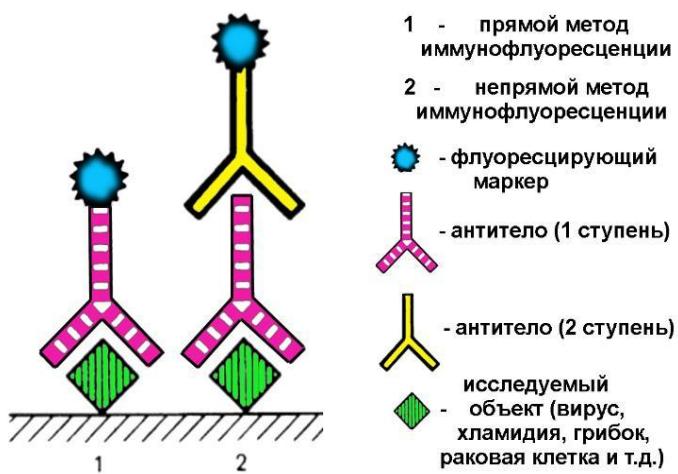


Рисунок 12 – Схема реакций иммунофлюоресценции

### Иммуноферментный анализ (ИФА).

Особенностью метода ИФА является использование функционально активной биологической молекулы фермента, соединенного с иммунореагентами. Комплекс конъюгированных иммунореагентов с ферментами проявляет функциональную активность, т. е. сохраняется высокая специфичность и способность фермента расщеплять добавленный субстрат с образованием легко обнаруживаемых продуктов. В связи с этим можно регистрировать и учитывать количественно взаимодействие иммунореагента. Ферменты применяют только те, которые расщепляют субстрат с образованием продуктов легко (улавливаемых) определяемых. Кроме того, они должны содержать в структуре определенные реакционные группы, по которым идет связывание с молекулой иммунореагента не меняя

его специфичности, быть чистыми и сохранять ферментативную активность в конъюгированном с иммунореагентом виде. В качестве субстрата в зависимости от реагента используют 5- аминосалициловую кислоту, ортофенилendiамин, пирогаллол и другие. В настоящее время ферменты могут быть связаны как с антителами, так и антигенами.

### *Классификация и варианты ИФА.*

Существует множество вариантов ИФА. Прежде всего ИФА включает две группы способов постановки реакции: твердофазный (гетерогенный) – ТИФА и гомогенный – ГИФА. Они в свою очередь подразделяются на различные модификации.

*Гетерогенный способ – твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФА).* При этом способе АГ или АТ предварительно адсорбируют на твердый носитель (сорбционно и ковалентно). В качестве твердой фазы используют различные микропористые (сефароза, стекло, биогель ) и непористые носители (полистирол, полихлорвинил, нейлон, полистирен и другие). По физическому состоянию это могут быть гели, шарики, диски, титрационные панели.

Существуют *неконкуренческие и конкуренческие варианты*. При неконкуренческих вариантах реакция АГ-АТ происходит на поверхности твердой фазы, ингредиенты добавляются последовательно и определяется количество метки, связавшейся с носителем. При этом количество связавшейся метки прямо пропорционально количеству искомого АТ или АГ в исследуемом образце. При конкуренческих вариантах постановки реакции немеченный исследуемый образец и известное количество меченого искомого вносят в лунки, сенсибилизируют АГ или АТ одновременно, где происходит конкуренция между первым и вторым образцами за связывание с твердофазным иммуносорбентом. В этом случае количество связанной с твердой фазой метки обратно пропорционально количеству искомого образца.

*Конкуренческие методы* на первом этапе предполагают прикрепление к твердой фазе антител против искомого антигена. Затем вносят испытуемую пробу и известное количество АГ, меченого ферментом, который конкурирует за центры связывания антител. Или на первом этапе к твердой фазе прикрепляется АГ к искомым АТ (например, в сыворотке больного). Затем вносят исследуемую сыворотку и известное количество конъюгирующей с ферментом иммунной сыворотки. Эти сыворотки конкурируют за связывание с

эпитопами антигена.

*Радиоиммунологический анализ* (РИА). Главной отличительной особенностью является использование радиоактивных меток, соединенных с антителами или анигенами. Наиболее широко используют две разновидности РИА: радиоиммунопреципитация (РИП) и твердофазный радиоиммунологический анализ (ТФ РИА).

*Методика РИП* заключается в формировании в растворе радиоактивного иммунного комплекса (при предварительном введении в состав одного из участников реакции антиген-антитело радиоактивной метки). Отделении этого комплекса от не вошедших в него макромолекул и анализе его радиоактивного компонента с помощью разных физико-химических методов (электрофорез, адсорбция и др.).

ТФ РИА заключается в формировании иммунного комплекса не в растворе, а на твердой фазе, где предварительно иммобилизируют антиген или антитело. На иммобилизованный антиген (или антитело) последовательно сорбируются остальные компоненты. Такая методика дает возможность удалять из смеси не вошедшие в иммунный комплекс макромолекулы с помощью простой промывки. Наиболее простым вариантом является прямой анализ, основанный на эффекте прямой адсорбции антигена на твердую фазу.

*Реакция связывания комплемента* (РСК) – это метод серологического анализа, где используются две системы антиген-антитело: специфическая и индикаторная (гемолитическая).

Для проведения РСК необходимы пять компонентов: диагностируемый антиген, диагностические антитела, антиген-индикатор (эритроциты барана), индикаторные антитела (кроличьи гемолизины), комплемент.

Специфическое взаимодействие антигена и антитела сопровождается связыванием комплемента. Образовавшийся комплекс визуально не проявляется. В качестве индикатора используется гемолитическая система. Гемолитическая сыворотка сенсибилизирует эритроциты к действию комплемента, в присутствии которого происходит лизис эритроцитов (гемолез). Если гемолиза нет, значит комплемент связан первой системой, и, следовательно, антиген в ней соответствует антителу – положительный ответ. Если антитело не соответствует антигену, комплекс не образуется и комплемент, оставаясь свободным, соединяется со второй системой, вызывая гемолиз – реакция отрицательная.

Для постановки РСК все ингредиенты реакции подготавливают и титруют до проведения основного опыта:

1. Сыворотку (больного или диагностическую) накануне проведения реакции прогревают на водяной бане при температуре 56°C в течение 30 мин для инактивации ее собственного комплемента. Некоторые сыворотки, особенно иммунизированных животных, обладают антисывороточными свойствами, т.е. способностью связывать комплемент в отсутствии гомологичного антигена. Антисывороточность устраняют путем обработки их углекислым газом, прогреванием при температуре 57–58°C, однократным замораживанием при температуре –20°C или –70°C и удалением осадка центрифугированием, добавлением к сыворотке комплемента в объеме 1:10 сыворотки и прогреванием ее после инкубации на холоде в течение 18–20 ч. Для предотвращения антисывороточности сывороток их хранят в лиофилизированном виде или замороженном состоянии при низких температурах.

2. Антигеном для РСК могут быть культуры различных убитых микроорганизмов, их лизаты, компоненты бактерий, патологически измененных и нормальных органов, тканевых липидов, вирусы и вирусодержащие материалы. Антисывороточность антигенов устраняют при помощи таких методов, как термолиз (многократное замораживание и оттаивание), обработка жирорастворителями (эфиром, хлороформом, ацетоном), спиртами (метанолом, этиловым спиртом) и т.д.

3. В качестве комплемента используют сыворотку морской свинки, взятую непосредственно перед опытом; можно также применять сухой комплемент. Чтобы получить основной раствор для последующего титрования, комплемент разводят 1:10 изотоническим раствором натрия хлорида.

4. Эритроциты барана используют в виде взвеси на изотоническом растворе натрия хлорида. Кровь (100–150 мл) берут из яремной вены, помещают в стерильную банку со стеклянными бусами, дефибринируют путем встряхивания в течение 10–15 мин и фильтруют через 3–4 слоя стерильной марли для удаления фибрина. Эритроциты отмывают 3 раза изотоническим раствором натрия хлорида, доливая его к осадку эритроцитов до первоначального объема крови. Эритроциты можно хранить 5–6 дней при температуре 4–6°C. Срок хранения эритроцитов увеличивается при их консервировании с формалином.

5. Гемолитическую сыворотку для РСК получают следующим образом. Иммунизируют кроликов путем введения им в вену уха 50% взвеси отмытых эритроцитов барана (по 1 мл 4–6 раз через день). Через 7 дней после последней инъекции получают пробную сыворотку. Если титр сыворотки не ниже 1:1200, то делают кровопускание. Сыворотку прогревают 30 мин при температуре 56 °C. Для предупреждения бактериального пророста в гемолитическую сыворотку добавляют консервант (мертиолят 1:10000 или 1 борную кислоту).

6. Гемолитическая система состоит из смешанных в равных объемах гемолитической сыворотки (взятой в тройном титре) и 3 взвеси эритроцитов барана. Для сенсибилизации эритроцитов гемолизинами смесь выдерживают в термостате при температуре 37 °C в течение 30 мин.

Итак, сыворотки содержат антитела к определенным инфекционным антигенам. Различают следующие их виды:

*Агглютинирующие сыворотки* получают путем иммунизации кроликов взвесью убитых микроорганизмов или их антигенов с последующим взятием у них крови и приготовлением сыворотки. Агглютинирующие сыворотки применяют для идентификации микроорганизмов и вирусов в реакции агглютинации. Недостатком таких сывороток является то, что они способны давать групповые реакции агглютинации.

В настоящее время большинство сывороток используется *адсорбированными* – содержат только типовые или видовые антитела, соответствующие определенному типу или виду антигена. Для получения таких сывороток применяют метод Кастеллани – метод адсорбции. Этот метод заключается в истощении сыворотки на групповые агглютинины путем насыщения ее родственными гетерогенными бактериями или вирусами. При этом происходит адсорбция групповых антител, а специфические антитела остаются в сыворотке. Таким путем можно получить *монорецепторные сыворотки* – сыворотки, содержащие антитела только к одному антигену, и *поливалентные сыворотки*, дающие реакции агглютинации с двумя-тремя родственными бактериями или вирусами, имеющими общий антиген. *Титром* агглютинирующей сыворотки называется то ее наибольшее разведение, при котором идет реакция агглютинации.

*Преципитирующие сыворотки* получают иммунизацией кроликов антигенами бактерий, их экстрактами и токсинами. Титром

преципитирующей сыворотки называется то максимальное разведение антигена, при котором идет реакция преципитации. Преципитирующие сыворотки выпускаются с высоким титром – не менее 1:100000. Это связано с тем, что антиген, определяемый в реакции преципитации, имеет мелкодисперсную структуру и в единице объема его может содержаться больше, чем в таком же объеме сыворотки - антител.

*Гемолитические сыворотки* получают путем иммунизации кроликов звесью эритроцитов барана. Титром сыворотки называют то ее максимальное разведение, которое в присутствии комплемента вызывает гемолиз 3 % звеси эритроцитов барана. Гемолитические сыворотки используют для титрования комплемента и при постановке реакции связывания комплемента в индикаторной системе.

*Противовирусные сыворотки* получают путем иммунизации различных животных в зависимости от вида вируса. Например, сыворотку против аденоовирусов получают иммунизацией кроликов, сыворотку против вируса гриппа – иммунизацией белых хорьков и т.д.

Диагностические противовирусные сыворотки используются для определения вида или типа вируса в РТГА, РСК, РН.

*Люминесцирующие сыворотки* представляют собой иммунные сыворотки, содержащие специфические антитела, меченные флюоресцирующими красителями. При приготовлении люминесцирующих сывороток проводят присоединение к глобулиновой фракции иммунной сыворотки различных флюорохромов путем прочной химической связи. Люминесцирующие сыворотки используют при постановке РИФ.

*Антиглобулиновые сыворотки* содержат антитела к иммуноглобулинам сыворотки человека или кролика – в зависимости от того, какая иммунная сыворотка используется в реакции. Их получают путем иммунизации животных иммуноглобулинами человека или кролика. Такие сыворотки используют для постановки непрямой РИФ, реакции ИФА.

Препараты, содержащие антигены называют *диагностикумами*. Среди них выделяют следующие виды.

*Бактериальные диагносткумы* содержат инактивированную микробную звесь или отдельные антигенные компоненты бактерий. Примером таких диагносткумов являются бактериальные ди-

агностикумы сальмонелл брюшного тифа, паратифа А и В, шигелл Флекснера, Зонне, единый бруцеллезный диагностикум и др.

*Эритроцитарные диагностикумы* представляют собой эритроциты (обработанные танином или формалином) с адсорбированными на их поверхности антигенами. Они используются в РНГА (реакция непрямой гемагглютинации) для обнаружения антител.

*Вирусные диагностикумы* содержат инактивированные вирус-содержащие жидкости или живые вирусные частицы, используются при серологической диагностике вирусных инфекций в реакциях связывания комплемента, торможения гемагглютинации, нейтрализации для обнаружения антител и определения их титра.

### *Задания*

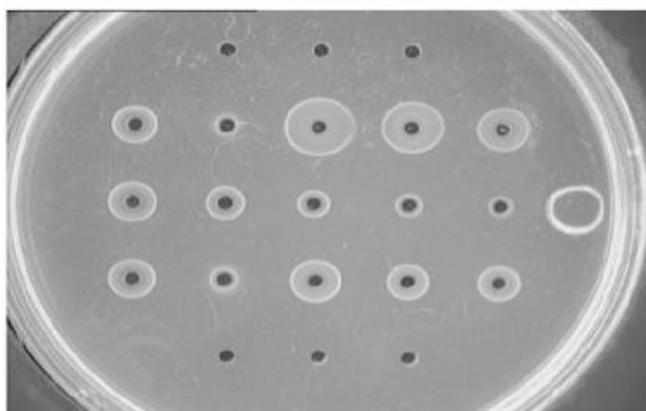
1. Используя общие положения и дополнительную информацию, заполните таблицу 9.

*Таблица 9 – Серологические методы индикации и идентификации вирусов*

Название реакции	Суть реакции	Компоненты	Положительный результат	Разновидности

2. Самостоятельно проведите реакцию преципитации и гемагглютинации. Составьте схему этих реакций. Для чего они используются?

3. Проведите учет реакции кольцепреципитации по Манчини, используя рисунок 13. Для построения калибровочного графика используйте третий сверху ряд лунок.



*Рисунок 13 – Результат реакции кольцепреципитации в геле*

4. Охарактеризуйте сыворотки и диагностикумы, использующиеся для вирусологических исследований. Как их получают?

5. Выполните тестовое задание

1. К наиболее широко применяемым методам серологических исследований относятся:

- а) реакции диффузной преципитации в геле;
- б) реакция преципитации;
- в) иммуноферментный метод;
- г) реакция пассивной гемагглютинации;
- д) реакция агглютинации;
- е) реакция связывания комплемента.

2. Реакцией непрямой (пассивной) гемагглютинации называется:

- а) специфическое склеивание и осаждение корпскулярных антигенов под действием антител в присутствии электролита;
- б) осаждение антигена из раствора под действием антител в присутствии электролита;
- в) реакция с использованием эритроцитарных диагностикумов.

3. Перечислите положения, справедливые для иммуносерологической диагностики инфекционных заболеваний:

- а) анализ сыворотки крови;
- б) ретроспективность;
- в) необходимость выделения микробных культур;
- г) абсолютная чувствительность и специфичность;
- д) обязательное использование методов иммунохимического анализа.

4. Латекс-агглютинацией называют реакцию, в которой:

- а) в качестве носителя Аг или АТ используются частицы латекса;
- б) в качестве носителя Аг или АТ используются эритроциты;
- в) специфически связываются корпскулярные антигены под действием антител в присутствии электролита;
- г) происходит лизис эритроцитов.

5. В непрямом конкурентном формате ИФА используются:

- а) иммобилизованные на твердой фазе специфические антитела, а меченный ферментом и немеченный антиген конкурируют за связь с иммобилизованным антителом;
- б) меченные ферментом антитела (специфические или вторичные) и иммобилизованный на твердой фазе конъюгат антиген-белок-носитель;

в) препарат с антигеном и известную, предположительно соответствующую ему, люминесцирующую сыворотку.

6. Моновалентные диагностические сыворотки содержат:

- а) антигены одного вида;
- б) антитела против одного Аг;
- в) антитела против нескольких Аг;
- г) нескольких видов.

7. Укажите фазы серологической реакции:

- а) специфическая;
- б) иммунологическая;
- в) неспецифическая;
- г) неиммунологическая.

8. Реакция нейтрализации основана на:

- а) способности специфически склеивать и осаждать корпускулярных антигенов под действием антител в присутствии электролита;
- б) способности антител иммунной сыворотки нейтрализовывать повреждающее действие микроорганизмов или их токсинов;
- в) осаждении антигена из раствора под действием антител в присутствии электролита.

9. Укажите индикаторы, используемые в иммуносеродиагностике инфекционных заболеваний:

- а) культуральные свойства бактерий;
- б) фрагменты геномных молекул;
- в) антигены;
- г) антитела;
- д) цитокины;

10. Реакция торможения гемагглютинации, вызываемой вирусами, используется для:

- а) выявления вируса в курином эмбрионе без определения вида;
- б) выявления вируса в культуре клеток без определения вида;
- в) идентификации вируса;
- г) определение цитопатогенного действия.

### **Контрольные вопросы**

1. Структура вирусологической лаборатории.

2. Основы обеспечения безопасных условий труда. Правила работы в вирусологической лаборатории.

3. Классификация диагностических препаратов и питательных сред, используемых для диагностики вирусных инфекций.
4. Методы обнаружения вирусов в материале от больных и трупов животных.
5. Методы выделения вирусов из материала больных животных и трупов.
6. Выделение вируса на культуре клеток.
7. Выделение вируса на куриных эмбрионах.
8. Доказательство этиологической роли вируса.
9. Серологическая индикация вирусов.
10. Серологическая идентификация вирусов.
11. Серологические исследования в вирусологии.
12. Общий принцип серологических реакций и их отличие друг от друга.
13. Ретроспективная диагностика вирусных болезней животных.
14. Компоненты, используемые в серологических реакциях.
15. ПЦР диагностика вирусов

## ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ

### Инфекции, вызываемые ДНК-содержащими вирусами

#### Общие положения

**Оспа** – контагиозная вирусная болезнь многих видов млекопитающих и птиц, характеризующееся лихорадкой и папулезнопустулезной сыпью на коже и слизистых оболочках. К оспе восприимчивы крупный рогатый скот, лошади, свиньи, овцы и козы. Оспой болеет и человек. Оспа крупного рогатого скота (коров) заразна для животных всех видов и для человека; оспа овец и коз – только для этих животных.

Возбудитель оспы того или иного вида животного – ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Poxviridae, содержащийся в осенних пустулах. Вирус имеет сложное строения (рисунок 14) и сравнительно большие размеры (260x390 нм), поэтому видны в обычном световом микроскопе.

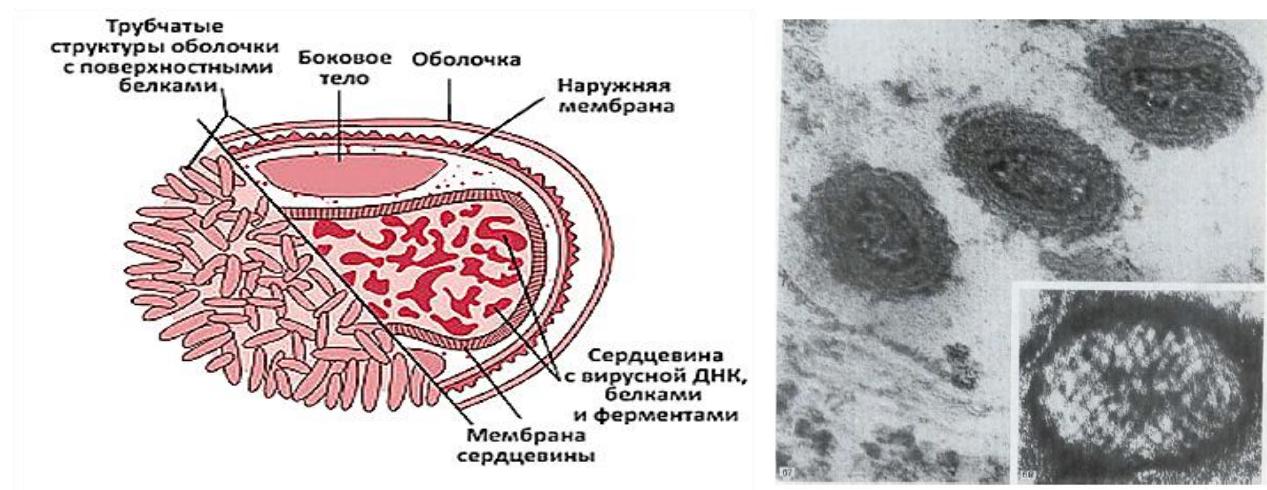


Рисунок 14 – Схема строения вируса оспы и фотография вирусных частиц под микроскопом

Вирусы чувствительны к высокой температуре: кипячение убивает их моментально, при 70 °C они гибнут за 5 минут, при 60°C – за 10 минут. Они хорошо переносят высушивание, а низкая температура их консервирует. Так, вирус оспы коров при +40 °C остается жизнеспособным 18 месяцев, при замораживании – более 2 месяцев. На шерсти больных овец сохраняется также до 2 месяцев, в овчарнях до 6 месяцев.

Для исследования в лаборатории от больных или павших животных направляют содержимое пустул, участки пораженной кожи, лимфу.

Для специфической профилактики используют осповакцину, которую наносят на свежее скарифицированную кожу животных в области внутренней поверхности ушной раковины или промежности. Иммунитет пожизненный.

**Нодулярный дерматит** – болезнь КРС, характеризующаяся лихорадкой, поражением лимфатической системы, отеками подкожной клетчатки и внутренних органов, образованием кожных узлов (бугров), поражением глаз и слизистых оболочек дыхательного и пищеварительного трактов. Восприимчивые животные: крупный рогатый скот, буйволы и зебу. Также вирус может размножаться в организме овец и коз. Человек к заболеванию не восприимчив.

Возбудитель болезни ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Poxviridae.

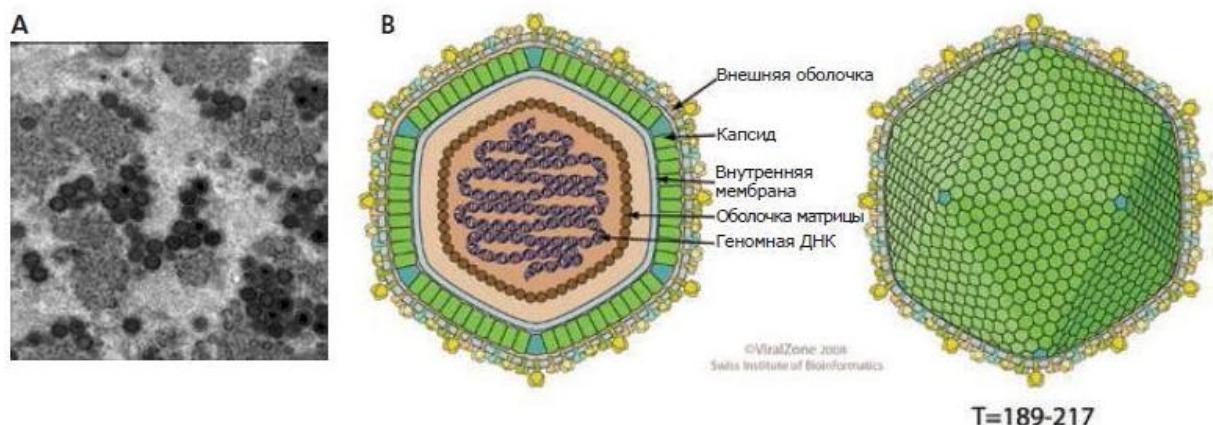
Вирус хорошо переносит трехкратное замораживание и оттаивание. Он может сохранять жизнеспособность в пораженных участках кожи не менее 33 дней, в слюне 11 дней, в крови и в некоторых внутренних органах 4 дня. Инактивируется при температуре 55 °C в течение 2 часов, при 65 °C – за 30 минут. Инактивируется в щелочной и кислых средах.

**Африанская чума свиней** – высококонтагиозная природно-очаговая вирусная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, геморрагическим диатезом, дистрофическими и некротическими поражениями внутренних органов и высокой летальностью. Довольно долго АЧС стационарно регистрировали только в Африке. В дальнейшем заболевание выявили в странах Европы.

Возбудителем болезни является ДНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Iridovirida (рисунок 15).

Вирус весьма устойчив при высушивании, замораживании и гниении. При 5 °C он сохраняет активность до 7 лет, при комнатной температуре – 19 месяцев, при 37 °C – 30 дней, 56 °C – 70 мин., 60°C – 20 мин. В среде, содержащей 25% сыворотки с pH 13,4, вирус сохраняется до 7 суток. В крови свиньи при 4 °C выживает до 18 месяцев, в трупах инактивируется через 2,5 месяца, в навозе – через 160 дней. В мясе больного животного при хранении в холо-

дильнике вирус обнаруживается на протяжении 155 дней, в копченой ветчине – до 5–6 месяцев.



Вирус обнаруживается во всех органах и тканях животных. Из организма выделяется с носовыми истечениями, фекалиями, мочой, слюной и выдыхаемым воздухом. Для лабораторной диагностики используют сыворотку крови, паренхиматозные органы (печень, селезенку). Определяют наличие антител к вирусу в сыворотке крови и антигенов в мазках-отпечатках.

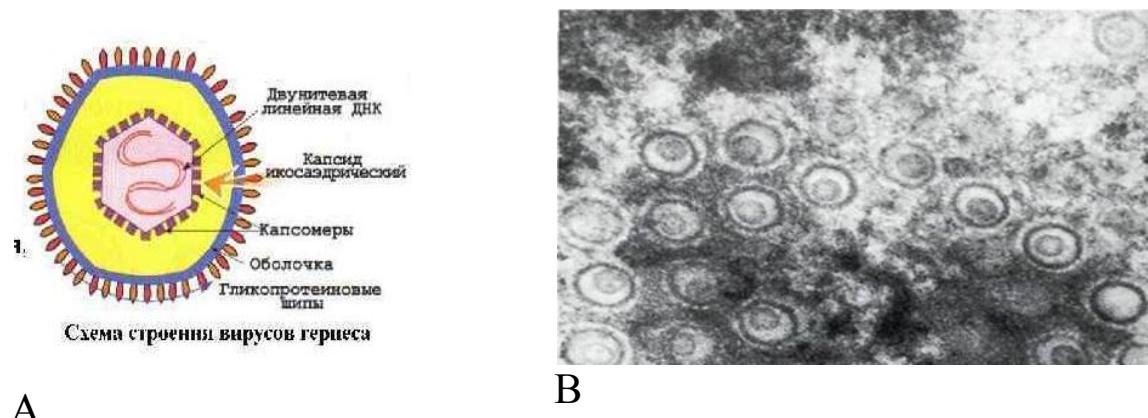
Средств специфической профилактики не разработано.

**Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота** – остро протекающая контагиозная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся поражением дыхательных путей, лихорадкой, общим угнетением и конъюнктивитом. В некоторых случаях появляется пустулезный вульвовагинит и баланопостит при попадании вируса в половые пути животных. У беременных животных неизбежны abortionы.

Возбудителем ИРТ является ДНК-геномный вирус сложного строения (рисунок 16), принадлежащий к семейству Herpetoviridae, роду *Herpesvirus I*.

Вирус быстро теряет активность в кислой среде. В мясе инактивируется при +56 °C в течение 40 минут, при +65 °C – 10 минут, при 70 °C – 2 минуты. Инактивируется в процессе изготовления колбасных изделий, если температура внутри батона не ниже

70 °С. При замораживании продукта до –250 °С вирус выживает до 5 месяцев.



*Рисунок 16 – Вирус инфекционного ринотрахеита КРС:*  
*А – схема строения вирусов герпеса;*  
*В – электронная микрофотография вируса ИРТ*

Вирус в организме животных индуцирует образование нейтрализующих, комплементсвязывающих и преципитирующих антител. В хозяйствах применяют инактивированные вакцины.

**Злокачественная катаральная горячка** – острая инфекционная болезнь крупного рогатого скота, характеризующаяся лихорадкой постоянного типа, крупозным воспалением слизистых оболочек дыхательных путей и желудочно-кишечного тракта, поражением глаз и центральной нервной системы. Кроме крупного рогатого скота восприимчивы буйволы, козы, реже овцы. Заболевание проявляется чаще осенью, протекает спорадически. Животные переболеваюят весьма тяжело и, если не проведен вынужденный убой, обычно погибают.

Возбудитель – ДНК-содержащий вирус из семейства герпесвирусов, нестабилен, обнаруживается в крови, мозге, паренхиматозных органах и лимфатических узлах.

Устойчивость его невысокая, при комнатной температуре погибает через 1 сутки, в коровниках сохраняется до 30 суток.

Лабораторная диагностика включает постановку биопробы и выявление у зараженных животных специфических антител. В последнее время применяют ПЦР-диагностику. Иммунитет у переболевших животных сохраняется до четырех лет. Попытки создания вакцины оказались безуспешными.

**Болезнь Марека** (нейролимфоматоз, паралич птиц, энзоотический энцефаломиелит) – высококонтагиозная вирусная болезнь отряда куриных, характеризующаяся параличами и парезами конечностей, пролиферацией лимфоретикулярной ткани в периферической и центральной нервной системе, оболочках глаз, во внутренних органах, скелетной мускулатуре и коже.

ДНК-содержащий вирус герпеса группы В. На сегодня обнаружено 6 разных антигенов. Вследствие присутствия общего антигена А, все известные штаммы считаются в антигеном отношении родственными. Вирус имеет интерфероногенную и высокую иммунодепрессивную активность, снижая общую иммунную сопротивляемость, иммунобиологическую толерантность птицы и увеличивает ее чувствительность к возбудителям прочих заболеваний.

Вирус сохраняется недолго при температуре 18–20°, но при замораживании до –180° остается вирулентным длительное время. Между выделенными штаммами вирусов в антигеном отношении различий нет. Возбудитель обнаружен в крови, пораженных нервах, новообразованиях, экскрементах больных кур.

Для лабораторной диагностики берут кровь и перья больных птиц. При вскрытии – кусочки паренхиматозных органов, кожи и мышц. Для обнаружения вируса применяют РДП и ИФА. Для специфической профилактики используют живые и инактивированные вакцины.

**Инфекционный ларинготрахеит птиц (ИЛП)** – острое инфекционное респираторное заболевание птиц отряда куриных характеризующиеся катарально-геморрагическим воспалением слизистых оболочек трахеи, носовой полости, конъюнктивы и сопровождающееся затрудненным дыханием, хрипами и кашлем.

Возбудитель принадлежит к семейству Herpesviridae. Вирус в большом количестве содержится в экссудате и эпителиальных тканях верхних дыхательных путей, в меньшем количестве его можно обнаружить в печени и селезенке. О размере вируса данные разноречивы: одни исследователи считают их от 30 до 100 нм, другие – от 150 до 240 нм. Вирионы имеют сферическую форму. У вирионов различают три структурных компонента: стержень (нуклеоид), капсид с капсомерами и оболочку. Возбудитель обнаруживается в трахеальной слизи, экссудате гортани, конъюнктивы, реже в крови, селезенке и печени больных кур.

Вирус устойчив во внешней среде, особенно при минусовой

температуре. В замороженных тушках вирус сохраняется более 19мес, в трупах, зарытых летом в землю на глубину 120см, – до 47дней, в трупах на поверхности земли (апрель-май) – свыше 30 дней, высушенный-359дн. При температуре 37 °C на скорлупе яиц погибает через 12ч, при нагревании до 55 °C – через 2ч, при кипячении – немедленно. В помещении птичника вирус сохраняется не более 6–9 дней. Солнечный свет убивает вирус через 7часов. Вирус малоустойчив к действию дезинфицирующих средств, 3%-ный раствор едкого натра и 3%-ный раствор крезола инактивируют его через 30 секунд.

Вакцины применяют путем закапывания на конъюктиву и аэроназально. Иммунитет развивается в течение 4–5 дней и сохраняется до одного года.

**Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота** – остро протекающее заболевание молодняка сельскохозяйственных животных, характеризующееся поражением органов дыхания, пищеварения, лимфоидной ткани, конъюнктивитами. К болезни восприимчивы также свиньи, лошади и птица. Зарегистрирована во многих странах мира, в т.ч. и в России.

Возбудителем является ДНК-содержащий вирус (рисунок 17), принадлежащий к семейству Adenoviridae, роду Mastadenovirus.

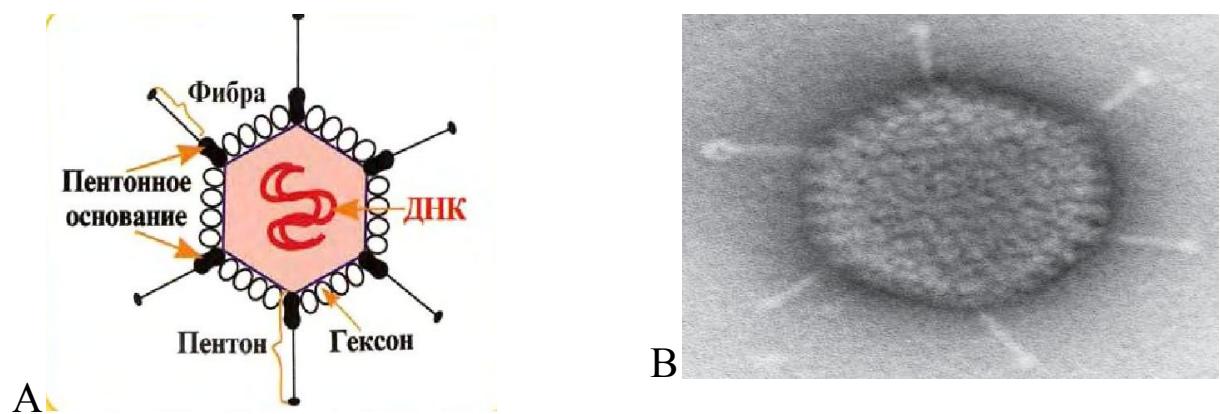


Рисунок 17 – Вирус адено-вирусной инфекции КРС:

А – схема строения адено-вируса;

Б – электронная микрофотография вируса

Аденовирусы серотипов первой подгруппы близки по биологическим свойствам к адено-вирусам человека. Возбудитель весьма устойчив к воздействию внешних факторов. Прогревание до 60 °C

не инактивирует аденоовирус. При температуре 22 °С устойчив 1–4 месяца, при 36 °С – до 2 месяцев. Вирус устойчив к повторному замораживанию и оттаиванию.

Для специфической профилактики используются инактивированная вакцина и бивалентная вакцина, содержащая аденоовирусы двух серологических групп и возбудителя пастереллеза крупного рогатого скота.

**Аденоовирусная инфекция кур** (синдром снижения яйценоскости) – вирусная болезнь кур несушек, характеризующаяся размягчением скорлупы яиц и снижением яйценоскости. Болеют также гуси, утки и некоторые виды диких птиц.

Обычно больная птица выглядит здоровой. Может отмечаться взъерошенность перьев, диарея, синюшность гребня и сережек.

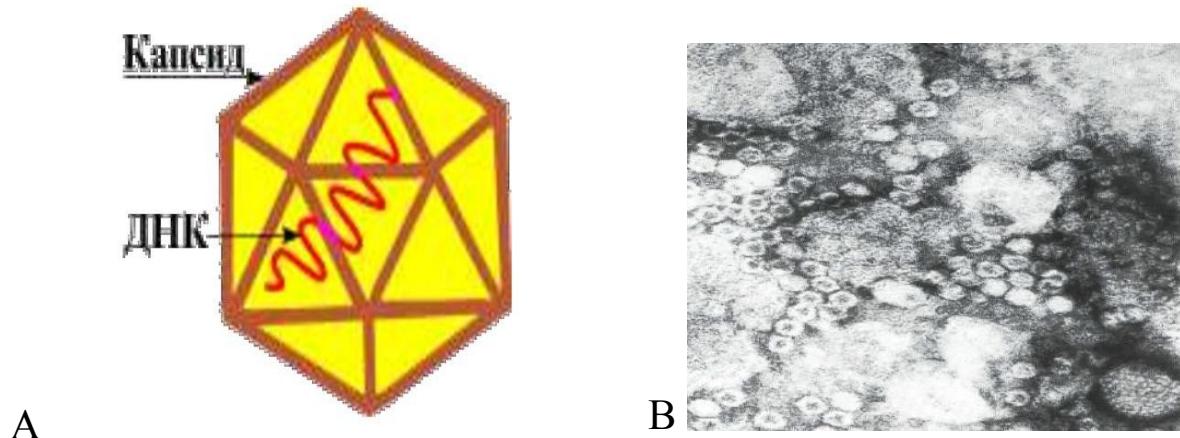
Вирус обладает высокой термостабильностью: при +80 °С сохраняется в течение 30 минут. Устойчив к эфиру, хлороформу, фенолу и 50 %-ному спирту. Для дезинфекции используется формалин.

От клинически больной птицы в лабораторию направляют носоглоточные смывы, фекалии. От трупов – легкие, трахею, лимфатические узлы, печень, кишечник, клоаку. В сыворотке крови вирус идентифицируют с использованием методов: ИФА, РТГА, РН.

**Парвовирусная инфекция свиней** (болезнь репродуктивных органов) свиней (Parvovirus disease) ПВСИ – контагиозная вирусная болезнь клинически проявляющаяся только у супоросных свиноматок нарушением функции органов воспроизведения (прохолостами, малоплодием, гибелью эмбрионов, рождением малоплодных пометов, мумифицированных плодов, мертвых и слабых поросят и режеabortами). У хряков-производителей заболевание протекает субклинически.

Возбудитель болезни – *Parvovirus suis* – это ДНК содержащий вирус (рисунок 18). Имеет небольшие размеры, порядка 20–25 нм и молекулярную массу 5,3 Д. Размножается в культурах клеток почек плода свиньи и др. для успешного накопления вируса необходимо большое количество активно делящихся клеток.

Вирус устойчив к физико-химическим факторам. Нагревание при 70 °С в течение двух часов не снижает его инфекционности, но он разрушается при 37 °С в среде с pH 2,0 за 2 ч. В нативном состоянии не изменяется активность при –20...70 °С 12 мес. Устойчив к обычно употребляемым детергентам.



В лабораторию для диагностики направляются мумифицированные плоды. Исследуется сыворотка крови свиноматок с помощью реакций: РТГА, РН, РГА.

В РФ для профилактики парвовирусной инфекции свиней используют инактивированные и ассоциированные вакцины, содержащие также возбудителей лептоспироза и болезни Ауески.

**Парвовирусный (геморрагический) энтерит собак,** Parvovirus enteritis canine – остро протекающая высоконтагиозная вирусная болезнь собак, вызываемая возбудителем рода парвовирус, сопровождается рвотой, геморрагическим воспалением желудочно-кишечного тракта, миокардитом, лейкопенией, дегидратацией и гибелью щенков моложе 5-месячного возраста.

ДНК-вирус семейства Parvoviridae, антигенно родственен с вирусами панлейкопении кошек и энтерита норок. Восприимчивы к вирусу животные семейства собачьих, причем наиболее чувствителен молодняк в возрасте 2–12 месяцев. Отмечено заболевание грибастого волка, енота-полоскуна, енотовидной собаки, койота.

Вирус обладает высокой устойчивостью к нагреванию (стабилен при нагревании при 60 °С в течение часа), pH среды 3, дезинфектантам, воздействию факторов внешней среды. Вирус устойчив к действию эфира, хлороформа, спирта и чувствителен к гипохлориту натрия, соде.

Во внешнюю среду вирус выделяется с фекалиями, пробы которых направляются для лабораторной диагностики. В сыворотке

крови больных животных вирус идентифицируется с помощью РН, РГА, РТГА.

### *Задания*

1. Зарисуйте схемы строения представителей ДНК-содержащих вирусов.
2. Заполните таблицу 10.

*Таблица 10 – Особенности ДНК-содержащих вирусов и инфекций ими вызываемых*

Заболевание	Систематика, размер и особенности возбудителя	Круг хозяев	Клинические признаки	Методы лабораторной диагностики	Устойчивость и возможность профилактики

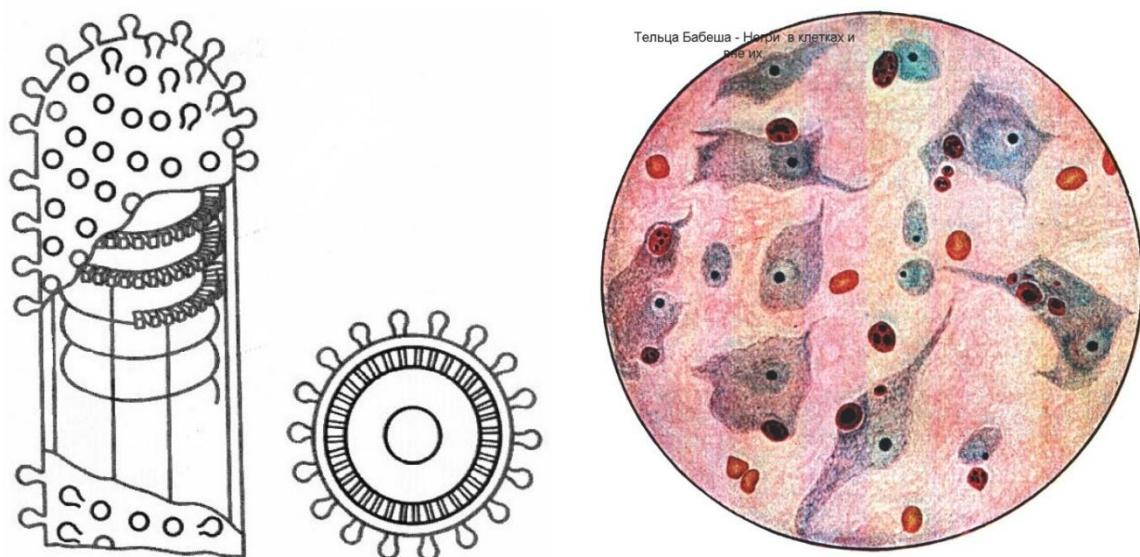
3. Подготовьте сообщения и доклады с презентациями по семействам ДНК вирусов.

## **Инфекции, вызываемые РНК-содержащими вирусами**

### *Общие положения*

**Бешенство** – это остропротекающая инфекционная болезнь теплокровных животных всех видов, характеризующаяся поражением центральной нервной системы, необычным поведением, не-приводящим к агрессивностью, парезами, параличами и летальным исходом. Вирус передается здоровым животным от больных через контаминированную им слюну в результате укусов, иногда заражение происходит при попадании слюны, содержащей вирус, на поврежденную кожу. Плотоядные животные могут заразиться при поедании трупов животных, погибших от бешенства. Имеются данные о возможности заражения уличным вирусом аэрогенным путем. К бешенству восприимчивы все виды животных. Восприимчив к бешенству и человек. Молодые животные более чувствительны к вирусу, чем взрослые.

Возбудитель – нейротропный РНК-содержащий вирус из семейства рабдовирусов (рисунок 19).



*Рисунок 19 – Схема строения вириона вируса бешенства и тельца Бабеша-Негри*

При высушивании выдерживает температуру +100 °С в течение 2–3 мин. В жидкой среде при +70 °С погибает за 15 минут, при 100 °С – немедленно. Низкие температуры консервируют вирус – в мозге зарытых в землю трупов вирус не разрушается в течение всей зимы.

Важное диагностическое значение при бешенстве имеет образование в цитоплазме ганглиозных клеток специфических телец-включений Бабеша-Негри окружной или овальной формы, содержащих базофильные зернистые образования вирусных нуклеокапсидов различной структуры. Диагноз на бешенство ставят на основании комплекса эпизоотических, клинических, патолого-анатомических данных и результатов лабораторных исследований. Для исследования на бешенство в лабораторию направляют свежий труп или голову, от крупных животных — голову. Материал для лабораторных исследований необходимо брать и пересыпать согласно Инструкции о мероприятиях по борьбе с бешенством животных.

Для лабораторной диагностики используют методы: микроскопирования, культивирования на лабораторных животных, серологические реакции РСК, РП, РН, РТГА, ИФА.

**Везикулярный стоматит** – остро протекающая болезнь животных, характеризующаяся лихорадкой и образованием везикул на

слизистых оболочках ротовой полости, поражением сосков вымени, реже кожи межкопытной щели, венчика и мякишей. К заболеванию восприимчивы домашние и дикие животные (лошади, мулы, крупный рогатый скот, свиньи, косули, кабаны, еноты, олени и др.). Описаны случаи заболевания людей.

Возбудитель болезни вирус, который относится к семейству Rhabdoviridae, род Vesiculovirus, основные серотипы – Нью-Джерси и Индиана.

При низких температурах вирус сохраняет жизнеспособность в течение длительного времени (при минус 18–20 °С – 3,5 месяца). При температуре +100 °С – погибает моментально, при 60 °С – через 30 минут, при 4–6 °С – остается живым в течение 31 суток. К дезсредствам относительно неустойчив.

Диагноз ставится на основании эпизоотологических и клинических данных, результатов лабораторных исследований (Е. А. Краснобаев, 1972) и с учетом дифференциации в первую очередь от клинически неразличимых трех вирусных везикулярных болезней (ВВБ) сельскохозяйственных животных – ящура (Я), везикулярной экзантемы (ВЭС) и везикулярной болезни свиней (BBC), возбудители которых относятся к семейству пикорнавирусов, родам – афтовирусов, калицивирусов, энтеровирусов. При дифференциальной диагностике используют соответствующие каждой инфекции диагностические наборы и наставления по их применению. Для лабораторных исследований, от больных животных берут, предварительно промыв места поражения раствором (содержащим 1000 ЕД пенициллина и стрептомицина), стенки (не менее 3 г) вскрывшихся везикул, везикулярную жидкость (пригодную и для обнаружения везикулярного стоматита методом электронной микроскопии). При отсутствии везикул можно в качестве патологического материала использовать смывы-соскобы с поверхности свежеобразовавшихся эрозий.

При дифференциальной диагностике болезни следует также исключать неинфекционные и травматические стоматиты, протекающие, как правило, без лихорадки, и такие вирусные болезни, как оспу животных, диарею, ринотрахеит, инфекционную ката-

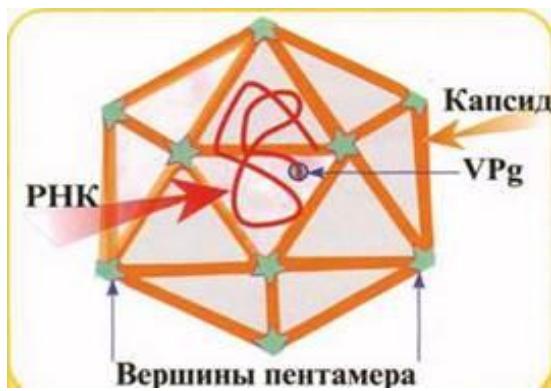
ральную лихорадку овец, болезнь Ибараки, чуму, кожную бугорчатку крупного рогатого скота.

Ошибки при постановке диагноза опасны, прежде всего, тем, что могут привести к распространению ящурных эпизоотии. При оценке эпизоотической ситуации следует учитывать, что везикулярным стоматитом могут болеть лошади, крупный рогатый скот и свиньи; ящуром – крупный рогатый скот и свиньи, а ВВС и ВЭС – только свиньи.

Лабораторная диагностика заключается: в обнаружении антигена возбудителя в патологическом материале (10–33 % суспензия стенок везикул и везикулярная жидкость) одним из серологических методов (РСК, реакция иммунодиффузии – РИД и др.); в выделении возбудителя из патологического материала (1–10 % суспензия) в культуре клеток или методом заражения лабораторных животных, с последующей идентификацией его в одной из серологических реакций (РН, РСК, РИД и др.) или методом электронной микроскопии.

**Ящур** – высококонтагиозная остропротекающая инфекционная болезнь, поражающая домашних и диких парнокопытных животных, характеризующаяся лихорадкой и развитием афтозных поражений на слизистой рта, вымени, коже межкопытной щели и бесшерстных участках кожи головы. Человек заражается ящуром при употреблении в пищу необезвреженного молока от больных ящуром коров, овец или коз, а также при доении больных животных и переработке на мясо больных животных. Собаки и кошки также могут заражаться ящуром, бессимптомно переболевать, становясь переносчиками возбудителя инфекции. Болезнь регистрируется во многих странах мира.

Возбудитель ящура относится к вирусам сем. Picornaviridae, роду *Aphthovirus*, имеющих большое эпизоотическое и эпидемическое значение. Вирусная частица состоит из рибонуклеиновой кислоты (РНК), окруженной периферической белковой капсидой, включающей 32 капсомера (рисунок 20).



*Рисунок 20 – Схема строения вируса ящура*

В организме больного животного вирус в наибольшей концентрации находится в эпителии стенок афт и в лимфе в первые 24-48 часов болезни. Его можно, но в значительно меньших концентрациях, обнаружить в слюне, в крови, моче и фекалиях.

Различают серотипы: А, О, С, САТ-1, САТ-2, САТ-3 и Азия-1. Каждый серотип имеет подтипы: тип А имеет 46 вариантов; тип О – 14; С – 5; САТ-1 – 9; САТ-2 – 3; САТ3 – 4; Азия-1 – 3 варианта. Устойчивость возбудителя к различным неблагоприятным факторам неодинакова. Высокая температура на вирус действует губительно. Так, например, при 85–100 °C вирус погибает моментально, при температуре 66–78°C – через 40 секунд, при 64 °C 90 % вирусов теряют активность в течение 30 сек., при 49 °C – за 1 час; при 37 °C – за 21 час. При низких температурах вирус консервируется. Так, при –70 °C он сохраняет биологические свойства в течение нескольких лет. Более месяца выживает в холодной морской воде. В мышечной ткани при охлаждении туш животных, больных ящуром, возбудитель погибает в течение 36–48 часов, в лимфатических узлах и костном мозге сохраняется до 76 дней. В быстро замороженном мясе вирус сохраняется до 145–149 дней. В изделиях, приготовленных из мяса больных свиней, вирус сохраняется от 112–183 дней (окорока, жир) до 183–190 суток (бекон). В колбасных изделиях вирус остается жизнеспособным до 56 дней.

Для лабораторной диагностики в настоящее время широко применяют ПЦР диагностику содержимого афт и серологическую реакцию ИФА.

При постановке окончательного диагноза хозяйство или насе-

лённый пункт подлежит карантинированию. Больных животных изолируют и подвергают лечебным мероприятиям, остальное поголовье вакцинируют.

**Чума крупного рогатого скота** – септическое заболевание, характеризующееся воспалительно-некротическими поражениями слизистых оболочек, высокой лихорадкой, чрезвычайной контагиозностью и большой (до 100 %) летальностью. В естественных условиях к чуме восприимчивы крупный рогатый скот всех возрастов, буйволы, яки, меньше овцы, козы, олени. Человек не подвержен этому заболеванию.

Возбудитель – вирус, относящийся к роду *Morbillivirus* из семейства парамиксовирусов (рисунок 21).

У больных животных он находится в крови, внутренних органах, мозговой ткани, выделяется с мочой, молоком. К воздействию факторов внешней среды не обладает большой стойкостью, легко разрушается под влиянием химических веществ. В свежем мясе сохраняет жизнеспособность 4 суток, в солонине крепкого посола – более 28 суток.



*Рисунок 21 – Вирус чумы крупного рогатого скота под электронным микроскопом*

Нагревание до 60 °С разрушает вирус за несколько секунд, прямые солнечные лучи – за 5 ч., в засоленных и высушенных в тепли шкурах сохраняется 24–48 ч., а в замороженных органах и крови – до 3–6 месяцев.

Вирус выделяют на культуре клеток почки крупного рогатого скота. В крови определяют антитела с помощью РСК, РН, РТГА, ИФА. Идентификацию культурального вируса и возбудителя в

биологическом материале проводят с использованием РСК, РТНГА, РИФ, ИФА, ПЦР.

Для специфической профилактики чумы крупного рогатого скота используют живые и инактивированные вакцины. В США и Японии используются генноинженерные рекомбинантные вакцины. Для ликвидации заболевания используют общие противоэпизоотические мероприятия – карантин, вакцинация животных в местах возникновения болезни, убой больных и подозрительных в заболевании животных, ограничение движения скота, дезинфекция.

**Чума мелких жвачных животных** – заболевание овец и коз, характеризующееся лихорадкой, диареей, пневмонией, язвенным поражением слизистой оболочки ротовой полости, носа и глаз. К заболеванию восприимчивы овцы и козы. Болезнь была диагностирована среди диких парнокопытных (газели, нубийский горный козел, овцы ларистен). Экспериментально подтверждена повышенная чувствительность к чуме американского белохвостого оленя. У крупного рогатого скота и свиней ЧМЖЖ протекает бессимптомно. Случаи заболевания отмечены в ряде африканских и азиатских стран, в том числе в Нигерии, Иране, Турции и др. странах.

Возбудитель болезни – вирус семейства Paramyxoviridae, род Morbillivirus, внешне похожий и антигенно близкий к вирусу чумы крупного рогатого скота.

Однако в последние годы установлено, что ВЧ крупных и ВЧ мелких жвачных в значительной степени различаются. Вирус сохраняет жизнеспособность в течение длительного времени в охлажденных и замороженных тканях; некоторые штаммы сохраняются при температуре 60 °С в течение 60 минут. Вирус устойчив в диапазоне 4,0–10,0 единиц рН.

Лабораторные исследования предусматривают выделение вируса в культуре клеток почки эмбриона овцы, идентификацию его иммунофлюoresцентным и электронномикроскопическим методами. Могут использоваться также РСК и РИД, которые, однако, не позволяют отличить чуму мелкого рогатого скота от чумы крупного рогатого скота. В затруднительных случаях проводят гистологические исследования и постановку биопробы на 2–4-месячных козлятах. Характерным является обнаружение в эпителии слизистой

оболочки ротовой полости, кишечника и в ретикулярных клетках лимфоидных органов эозинофильных цитоплазматических и внутриядерных телец-включений в гистологических препаратах.

Чуму мелких жвачных необходимо дифференцировать от ящура, катаральной лихорадки овец и болезни Найроби.

Для активной иммунизации применяют культуральную вакцину против чумы крупного рогатого скота.

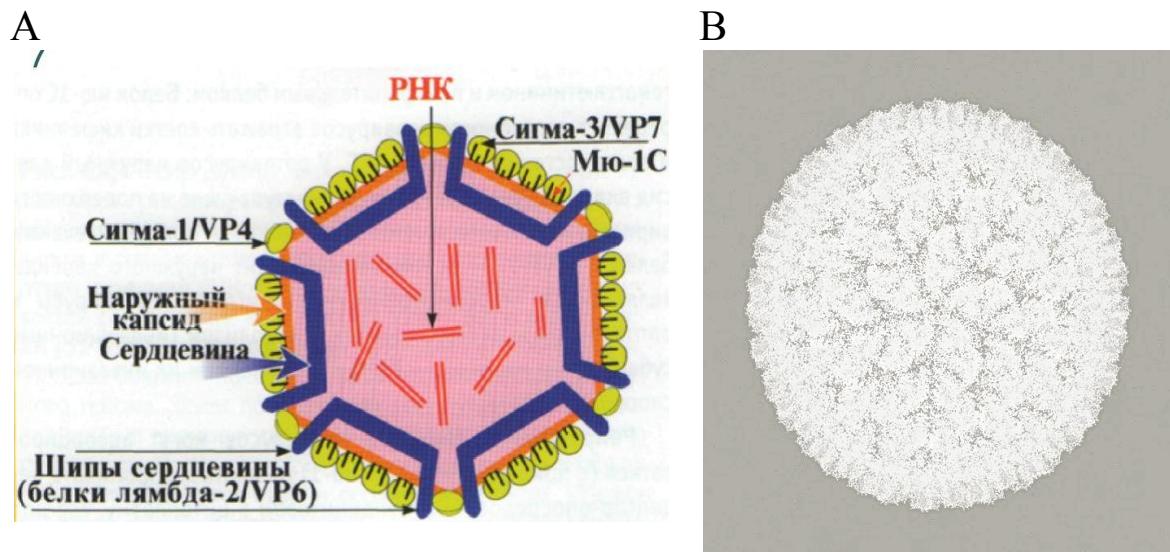
**Блютанг** – (инфекционная катаральная лихорадка овец, синий язык) – вирусная трансмиссивная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, воспалительно-некротическими поражениями ротовой полости, языка, внутренних органов, эпителия венчика и основы кожи копыт, а также дистрофическими изменениями скелетных мышц. Передается кровососущими насекомыми рода Culicoides. Болезнь поражает овец, крупный рогатый скот. Козы, дикие жвачные животные и грызуны длительное время могут быть вирусоносителями, не проявляя признаков болезни.

Возбудитель болезни – вирус семейства Reoviridae, род Orbivirus. Вирионы имеют диаметр 60–70 нм и состоят из двунитчатой РНК, покрытой двумя капсидными белковыми оболочками – внутренней и наружной (рисунок 22). Капсид имеет икосаэдральную симметрию. Наружный капсид состоит из 32 капсомеров с диаметром 18 нм. Внутренний капсид называется сердцевиной. Она имеет 12 пятиугольных фасеток, в центре которых находятся отростки диаметром 10 нм с внутренним каналом, через него выходят наружу вновь синтезированные молекулы иРНК (см. рис. 17).

Геном реовирусов состоит из 10 фрагментов двунитчатой РНК. Каждый фрагмент РНК представляет собой отдельный ген. Для возникновения инфекционного процесса необходимо наличие всех фрагментов РНК.

Различают 24 различных по антигенным свойствам серотипа. Вирус устойчив во внешней среде. В консервированной крови при комнатной температуре он сохраняется 25 лет. При замораживании до минус 10–20 °С он разрушается. Нагревание до 60 °С инактивирует его за 15 минут, при 50 °С – за 3 часа, при 100 °С – моментально. В мясе при созревании, когда pH снижается до 6,0–5,6, вирус инактивируется, но сохраняется в костном мозге. В тушах овец

при 4 °C, если pH мяса не снижается ниже 6,4, вирус сохраняется до 30 суток.



*Рисунок 22 – Строения реовирусов: A – схема; B - вирус блютанг*

Во всех случаях выделение вируса подтверждают серологическими методами (РДП, ИФА, МФА, РСК, РН, РНГА). Используют биопробу на лабораторных животных и куриных эмбрионах.

Переболевшие овцы приобретают пожизненный иммунитет к тому типу вируса, который вызвал болезнь. Возможна реинфекция другим типом вируса в течение того же сезона или на следующий год. Для профилактики применяют культуральную вакцину, в результате введения которой иммунитет сохраняется в течение года.

**Болезнь Ньюкасла** – острое контагиозное заболевание птицы, сопровождающееся повышением температуры тела, синюшностью гребня и сережек с темно-фиолетовым оттенком, опуханием век, помутнением роговицы, отечностью подкожной клетчатки в области головы, шеи и зоба, множественными кровоизлияниями различной величины и формы при осмотре внутренних органов, наличием кровоизлияний на слизистой железистого желудка на границе с мускульным, что считается характерным признаком заболевания. Болезнь регистрируется во многих странах мира. Восприимчивы многие виды домашней и дикой птицы. Из домашней птицы наименее чувствительны утки и гуси. Кроме кур и цыплят, к экспери-

ментальному заражению восприимчивы перепела, воробы, тетерева, описаны случаи болезни Ньюкасла среди голубей и норок. В литературе приведен случай заражения вирусом людей.

Возбудителем болезни является вирус семейства Paramyxoviridae (рисунок 23).

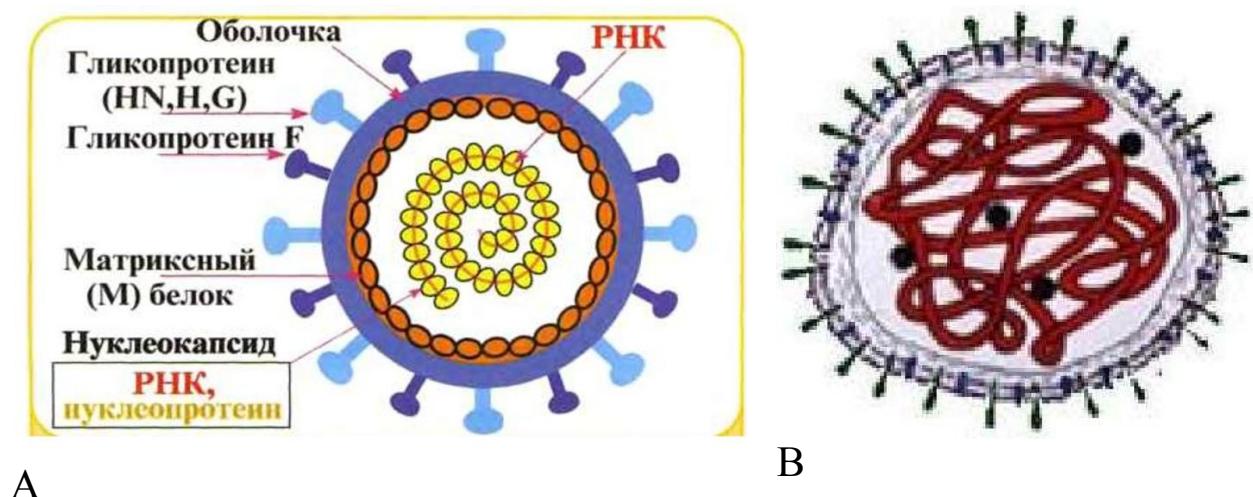


Рисунок 23 – Схема строения вириона парамиксовирусов (А) и вируса болезни Ньюкасла (В)

Вирус обладает определенной устойчивостью: погибает при температуре 56 °С за 3 часа, при 60 °С за 30 минут. Он устойчив к низкой температуре, в замороженном состоянии его активность сохраняется более 2-х лет. В окружающей среде сохраняет жизнеспособность в течение длительного времени, особенно в помете и воде (до 165 дней), в замороженных тушках сохраняется более 6 месяцев. Ветеринарно-санитарная оценка. Убой птицы на мясо запрещается. Она подлежит уничтожению. Если болезнь диагностируют после убоя, то все продукты переработки птицы сжигают.

Подавляющее большинство полевых и вакцинных штаммов этого вируса в антигенном и иммунобиологическом отношениях сходно. Некоторые природно-ослабленные штаммы широко используют в качестве живых вакцин.

Для лабораторной диагностики вирус культивируют на куриных эмбрионах с визуализацией характерных симптомов при заболевании куриных эмбрионов при инкубации, проведением реакции гемагглютинации. Также вирус культивируется на культуре фибробластов, некоторых первичных и перевиваемых клетках. Совре-

менная ветеринарная промышленность предлагает для диагностики иммунохроматографические тесты, материалом для которых служит сыворотка или плазма птицы, секреты глаз, или трахеальные и клоакальные смывы. Одним из точных тестов является и ПЦР диагностика.

**Парагрипп-3 крупного рогатого скота** – острое контагиозное заболевание крупного рогатого скота (преимущественно молодняка до шестимесячного возраста), характеризующееся катарально-гнойным поражением органов дыхания, лихорадкой, общим угнетением, приступами сухого, болезненного кашля, катаральным конъюнктивитом.

Возбудитель – РНК-геномный вирус, относится к семейству Paramixovidae и обозначен как парагриппозный вирус Тип 3 (ПГ-3).

Под воздействием температуры 50–56 °С вирус быстро инактивируется, а при минус 60 °С сохраняется в течение нескольких месяцев. При 75 °С полная инактивация вируса в мясе происходит в течение 30 минут. В мясе и субпродуктах, замороженных от минус 10 °С до минус 20 °С, инфекционная активность вируса сохраняется до 3–5 месяцев.

Лабораторная диагностика на парагрипп-3 включает в себя проведение следующих исследований: выявление специфического антигена из биологического материала с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) или иммунофлуоресценции (МФА), выделение вируса на культуре клеток и его идентификация в реакциях нейтрализации (РН) и торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА). Сюда же входит реакция связывания комплемента (РСК), иммуноферментный анализ (ИФА), а также ретроспективная диагностика с помощью реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), иммуноферментного анализа (ИФА), нейтрализации (РН), связывания комплемента (РСК).

Для специфической профилактики используют живые и инактивированные моно- и ассоциированные вакцины, гипериммунные сыворотки. Для ликвидации заболевания используют общие противоэпизоотические мероприятия – ограничение движения скота, дезинфекция, карантинирование больных животных.

**Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота** – контагиозная остро претекущая болезнь, преимуществ-

венно телят, характеризующаяся лихорадкой и катаральным воспалением слизистых оболочек органов дыхания, сильным кашлем, потерей аппетита, поражением легких.

Возбудитель болезни – РНК-геномный вирус, относящийся к семейству Paramixoviridae, роду Pneumovirus.

Частицы полиморфны – от округлых шаровидных до вытянутых в разной степени. Вирус чувствителен к воздействию физико-химических факторов. Инактивируется при температуре выше 70 °C.

Все выделенные штаммы респираторно-синцитиального вируса хорошо размножаются на первичных культурах клеток крупного рогатого скота – почек эмбриона коровы, testikuлах бычка, а также органных культурах легких и трахеи первых пассажей. Начальная стадия ЦПД, характеризующаяся округлением клеток и образованием небольших синцитиев, содержащих эозинофильные включения, обнаруживают от 2–3 до 6 суток после заражения.

Комплекс лабораторных исследований такой же, как и при инфекционном ринотрахеите – выявление специфического антигена из биологического материала с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) или иммунофлуоресценции (МФА), выделение вируса на культуре клеток и его идентификация в реакциях нейтрализации (РН) и торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА), связывания комплемента (РСК), иммуноферментном анализе (ИФА), а также ретроспективная диагностика с помощью реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), иммуноферментного анализа (ИФА), нейтрализации (РН), связывания комплемента (РСК).

Вакцин от этой инфекции в нашей стране нет. Поэтому профилактика сводится к общим санитарным и карантинным мероприятиям.

**Высокопатогенный грипп птиц** – вирусная высококонтагиозная болезнь птицы. Характеризуется депрессией, коматозным состоянием, отеками подкожной клетчатки, лап и голеностопного сустава, появлением фиолетовых пятен, опуханием гребешка и сережек и их цианичностью (черно-синий цвет), наличием кровоизлияний на всех серозных и слизистых покровах желудочно-кишечного тракта, высокой летальностью (до 100 %). Восприимчи-

вы: сельскохозяйственная (куры, индейки, утки, фазаны, цесарки, перепела), синантропная (голуби, вороны, галки) и дикая птица (в том числе страусы).

Возбудителем болезни является вирус семейства Orthomyxoviridae, род Influenzavirus типов A и B (рисунок 24).

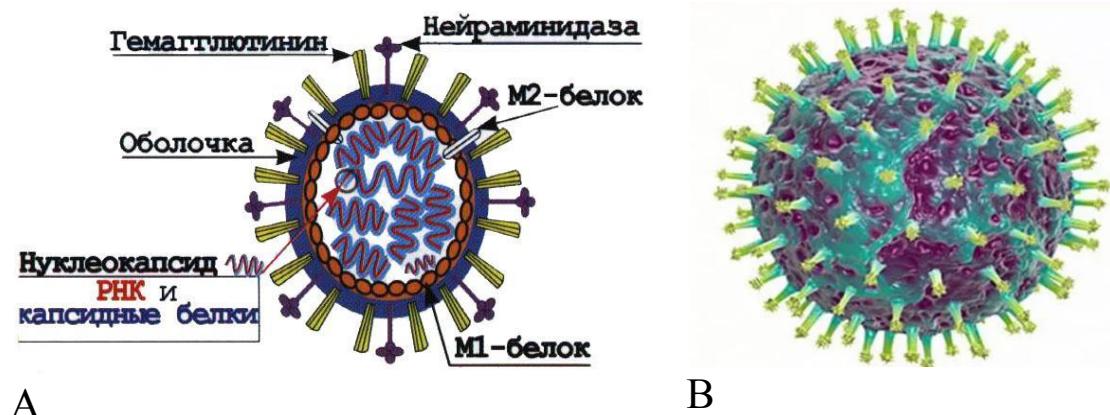


Рисунок 24 – Схема строения вириона ортомиксовирусов (A); вирус высокопатогенного гриппа птиц (B)

Установлено, что все высокопатогенные штаммы относятся к типу А, субтипам H5 и H7, а также H5N. Вирус достаточно устойчив в природе, погибает при температуре 56 °С за 3 часа, при 60 °С – за 30 минут, при 85 °С – за 15 минут. В течение длительного времени он сохраняет жизнеспособность в тканях, помете, воде. По данным ряда исследователей, в мясе вирус сохраняется при 0 °С порядка 287 дней, в замороженных тушках при минус 20 °С – 447 дней, в воде при 4 °С – 77 дней, в яйцах куриных при комнатной температуре – 300 дней, в костном мозге при 0 °С – 303 дня, в помете при комнатной температуре – 300 дней, в гниющих трупах при комнатной температуре – 30 дней.

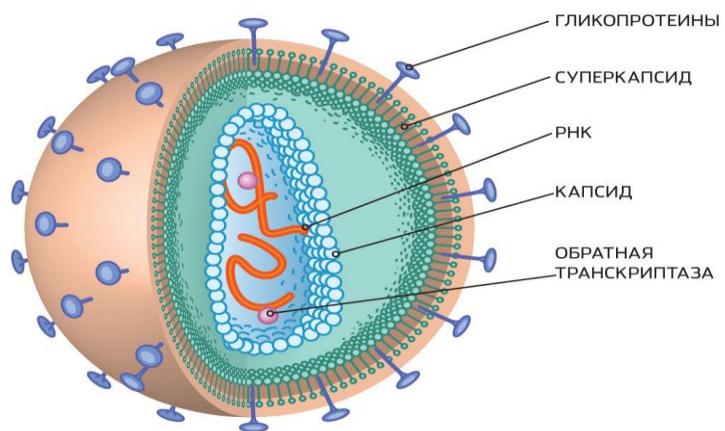
В лаборатории для выделения вируса применяют методы заражения куриных эмбрионов, для идентификации выделенного вируса – РГА, РТГА и РСК. Биологическая проба ставится на цыплятах 60–120-дневного возраста. Для ретроспективной диагностики используют РТГА, РДП, ИФА и ПЦР.

Переболевшая птица приобретает нестерильный иммунитет, который продолжается до полугода. Для профилактики гриппа птиц в России применяются инактивированные вакцины как самые

эпизоотологически безопасные. Для специфической профилактики также применяют инактивированную гидроокисьалюминиевую эмбрионвакцину типа А, жидкую и сухую инактивированные вакцины. В случае возникновения заболевания проводят мероприятия по дезинфекции, санитарному убою и карантинированию.

**Энзоотический лейкоз крупного рогатого скота** – хроническая инфекционная болезнь опухолевой природы, характеризующаяся злокачественным разрастанием кроветворной ткани, развитием патологических очагов кроветворения и нарушением процесса созревания кровяных клеток. Это заболевание имеет особую значимость у крупного рогатого скота и птицы. Существует потенциальная опасность лейкоза животных и для человека, так как выделяемые онкогенные вирусы от больных животных могут преодолевать межвидовые барьеры, а патогенетические механизмы развития заболевания и формы клинического и патоморфологического проявления являются общими для животных и человека.

Возбудитель – вирус лейкоза крупного рогатого скота (ВЛКРС) – РНК-содержащий онкогенный вирус типа С, семейства Retroviridae (рисунок 25).



*Рисунок 25 – Схема строения вириона ретровируса*

Устойчивость вируса лейкоза во внешней среде небольшая, в клеточных культурах он погибает при нагревании до 60 °С через минуту.

При проведении серологических исследований в сыворотках крови больных животных определяют наличие антител в РИД, ИФА. Для проведения вирусологических исследований использу-

ют пораженные ткани и лимфоциты, в которых выявляют наличие провирусной ДНК с помощью ПЦР, и элементарных частиц вируса с помощью электронной микроскопии. Гематологическими исследованиями выявляют повышенное содержание лейкоцитов, в основном лимфоидного ряда, слабодифференцированных лимфоидных клеток, однако в этом случае необходимо исключить другие заболевания, в том числе туберкулез, паратуберкулез и бруцеллез.

Для профилактики лейкоза предложен ряд рекомбинантных вакцин, а также вакцин, основанных на использовании поверхностные антигены вируса. В условиях лабораторий предложенные вакцины оказались эффективными, но пока широкого применения не получили.

**Висна-маеди** – хроническое вирусное заболевание овец, которое характеризуется поражением легких и головного мозга. Вирус висна-маеди чаще поражает овец 3–4 летнего возраста и старше. Болеют овцы всех пород, но число серопозитивных животных может быть различным по породам и возрастным группам, достигая у 5–7 летних овец 80–90 %. Есть сообщение о заболеваемости коз. Термин висна-маеди состоит из названия двух симптомокомплексов: висна – изнурение, маеди – одышка. Висна характеризуется развитием менингита и энцефаломиелита и расстройством ЦНС, маеди – медленно прогрессирующей пневмонией овец.

Возбудитель – РНК-содержащий вирус семейства *Retroviridae*, рода *Lentivirus*, обладающий ДНК-полимеразной активностью.

Он инактивируется при температуре 56 °С в течение 20 минут, при 70 °С гибнет через 10 минут, а при кипячении – мгновенно. Этот вирус примерно в 10 раз устойчивее к действию ультрафиолетовых лучей, чем вирусы герпеса, полиомиелита, болезни Ньюкасла. Поражения в органах при висна-маеди развиваются постепенно в течение нескольких месяцев, даже лет, проявляясь преимущественно в легких. Как правило, степень утолщения межальвеолярных перегородок связана с длительностью процесса.

В первичных культурах клеток овечьего происхождения (тестикул, хорионного сплетения, почек и легких эмбриона овцы) вирус хорошо репродуцируется, вызывая синцитиальный ЦПЭ с последующей дегенерацией монослоя клеток. Хорошо диагностируется с помощью ПЦР метода.

Специфических вакцин не разработано, поэтому меры профилактики сводятся к недопущению заноса вируса в благополучные отары. В неблагополучных хозяйствах рекомендован убой больных и серологически положительно реагирующих животных. Наиболее эффективной мерой борьбы являются поголовный убой стада, где обнаружена висна-маеди, и проведение тщательной дезинфекции.

*Вирусная диарея крупного рогатого скота* – контагиозная болезнь преимущественно молодых животных, характеризующаяся эрозивно-язвенным воспалением слизистых оболочек пищеварительного тракта. Зачастую возникает синдром респираторного заболевания, эрозивноязвенный стоматит с хромотой, а также латентное течение болезни, приводящая к инфицированию плодов, вызывая их мумификацию, abortionы, врожденные дефекты и диарею новорожденных телят. Наряду с крупным рогатым скотом в естественных условиях к вирусной диарее восприимчивы олени, косули, козы, овцы. У свиней болезнь протекает бессимптомно. Вирус диареи выделен от человека при наличии у него специфических антител.

Возбудитель – РНК-геномный вирус, относящийся к семейству Flaviviridae (Togaviridae), роду Pestivirus, имеет тропизм к клеткам органов дыхания, размножения, иммунной системы, почек, желудочно-кишечного тракта. Вирионы вируса представляют собой сферические частицы диаметром 40–60 нм, состоящие из нуклеокапсида кубической симметрии и наружной оболочки. Геном вируса содержит единую односпиральную линейную молекулу плюс-РНК (рисунок 26).



Рисунок 26 – Схема строения флавивирусов

При температуре 37 °С погибает через 5 суток, а в замороженном мясе держится до 3–5 месяцев. Инактивируется при 75 °С за 15 минут в 15–20%-ном растворе соли.

Лабораторная диагностика на вирусную диарею включает в себя проведение следующих исследований: выявление специфического антигена из биологического материала с использованием иммуноферментного анализа (ИФА) или иммунофлуоресценции (МФА), выделение вируса на культуре клеток и его идентификация в реакциях нейтрализации (РН) и торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА). Сюда же входит реакция связывания комплемента (РСК), иммуноферментный анализ (ИФА), а также ретроспективная диагностика с помощью реакции непрямой гемагглютинации (РНГА), иммуноферментного анализа (ИФА), нейтрализации (РН), связывания комплемента (РСК).

Для специфической профилактики используют живые и инактивированные моно- и ассоциированные вакцины, гипериммунные сыворотки. Для ликвидации заболевания используют общие противоэпизоотические мероприятия – ограничение движения скота, дезинфекция, карантинирование больных животных.

**Вирусная геморрагическая болезнь кроликов** (ВГБК «геморрагическая пневмония» кроликов, «некротический гепатит») – инфекционная, остропротекающая высококонтагиозная болезнь, которая характеризуется очень быстрым распространением среди взрослого поголовья кроликов с явлениями геморрагического дистеза во всех органах и сопровождающаяся высокой летальностью (80-100%). В естественных условиях к вирусу больше восприимчивы взрослые кролики и молодняк старше 3 месяцев, вне зависимости от породы и пола. В то же время молодые кролики более устойчивы к данной болезни. Для человека и других животных болезнь не представляет опасности.

Возбудитель болезни – РНК-содержащий вирус, относящийся к семейству Caliciviridae (рисунок 27).

Вирус устойчив к обработке эфиrom, хлороформом и к прогреванию при 50 °С в течение 60 мин. Сохраняется в суспензии инфицированной печени при температуре 4 °С течение 1 года, инактивируется 0,1%-ным раствором формалина в течение 1 сут. Вирус сохраняется без снижения вирулентности при –40 °С более 5 лет.



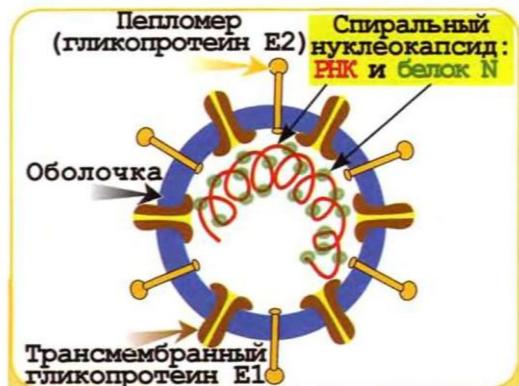
Рисунок 27 – Схема строения калицивирусов  
(капсид с чашевидными углублениями)

Для лабораторной диагностики используют реакцию задержки гемагглютинации (РЗГА). Антисыворотка задерживает специфическую агглютинацию, что позволяет обнаруживать антитела к вирусу. Также используются реакций РГА, РДСК, ИФА.

У переболевших кроликов вырабатывается стойкий постинфекционный иммунитет. Для специфической профилактики используют инактивированную тканевую гидроокисьалюминиевую формолвакцину и ассоциированную вакцину против миксоматоза и вирусной геморрагической болезни кроликов.

**Трансмиссивный гастроэнтерит свиней** (ТГЭ) – инфекционный гастроэнтерит, торансмиссивный гастроэнтерит, болезнь Дойла и Хатчингса – высококонтагиозная инфекционная болезнь свиней, вызываемая вирусом, характеризующаяся тяжелым септическим процессом с картиной геморрагического диатеза, а также поражением легких и желудочно-кишечного тракта, возникающими чаще в результате осложнения секундарной микрофлорой (сальмонеллами, пастереллами и другими бактериями).

Возбудитель –*Transmissible gastroenteritis virus*, плеоморфный вирус с тенденцией к образованию сферических форм, размером от 60 до 160 нм, окруженный оболочкой с выступами, напоминающих солнечную корону и относящихся к семейству Coronaviridae (рисунок 28). Гликопротеид «короны» индуцирует в организме синтез вируснейтрализующих антител. Штаммы вируса, выделенные в разных странах, серологически идентичны, но существует иммунологическое различие между кишечными полевыми и культуральными штаммами.



*Рисунок 28 – Схема строения коронавирусов*

Вирус трансмиссивного гастроэнтерита имеет антигенное родство с гемаглютинирующим коронавирусом собак и коронавирусом – возбудителем инфекционного перитонита кошек. В период виремии в организме животных вирус обнаруживается в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, а также в паренхиматозных органах.

Попав во внешнею среду, вирус быстро утрачивает свою вирулентность. При температуре 50–60 °C вирус теряет свою патогенность в течение 1 часа. При 80–100 °C инактивируется в течении 5 минут. При температуре 28 °C вирус остается вирулентным до 3 лет. В высушенному патологическом материале вирус сохраняется в течении 3 суток. Вирус устойчив к действию антибиотиков, фенолу, желчным кислотам, изменению pH от 3,0 до 11,0. В замороженном состоянии вирус сохраняется до 18 месяцев. Вирус инактивируется 2 %-ным раствором едкого натра в течении 20–30 минут, 4 %-ным раствором формальдегида за 10 минут, растворами фенола (0,5%-ный), гидроксида натрия (2 %-ный) в течение 30 минут. В жидких фекалиях больных свиней вирус инактивируется на солнце за 6 часов, в тени за 3 дня. Губительно на вирус действует хлорная известь.

Для лабораторных исследований, включающих изоляцию вируса на первичных и перевиваемых линиях клеток поросят с последующей идентификацией вируса в РНФ, РН и др. Также используется ПУР диагностика.

Для специфической профилактики применяют свиноматкам аттенуированные, авирулентные и субъединичные вакцины орально, инTRANАЗАЛЬНО и внутримышечно. Поросят-сосунов целесооб-

разно вакцинировать орально, чтобы индуцировать быструю защиту посредством интерференции или стимулирование локального иммунитета, обеспечивающего синтез секреторных Ig A. Общие профилактические мероприятия должны быть направлены на недопущение заноса возбудителя болезни, обеспечение свинопоголовья полноценными доброкачественными кормами.

**Инфекционный бронхит птиц** – высококонтагиозная болезнь, характеризующаяся поражением органов дыхания у молодняка, поражением репродуктивных органов и потерей продуктивности у взрослых кур-несушек, а также нефрозонефритным синдромом.

Возбудитель болезни – РНК-содержащий вирус из рода корона вирусов, семейства Coronaviridae. Под электронным микроскопом частицы вируса имеют форму круглых яиц, размер их 80–100 нм. Известно более 20 серотипов возбудителя.

Возбудитель болезни хорошо культивируется в развивающемся куриным эмбрионе; заражение одинаково удается как при инфицировании на хориоаллантоисную оболочку, и в аллантоисную полость. Вирус не агглютинирует эритроциты кур и млекопитающих, чем отличается от вируса чумы птиц.

В настоящее время учеными описано уже около 30 разновидностей серотипов этого вируса.

Вирус инактивируется при 56 °С в течении 10–15 минут. В лиофилизированном состоянии вирус выживал свыше 500 дней (температура 4°), при минус 20–30° – 458 дней. Ультрафиолетовые лучи разрушают вирус. Вирус ИБК погибает под действием 3 %-ного горячего раствора едкого натрия через 3 часа, раствора хлорной извести с содержанием 6,5 % активного хлора- через 6 часов, 0,5 %-ного раствора формальдегида – через 3 часа, 5 %-ного горячего раствора Демпа-12 – через 6 часов, 0,5%-ного раствора формальдегида- через 3 часа, 5%-ного горячего раствора Демпа-12- через 6 часов, 1%-ные растворы фенола, формалина – через 3 минуты.

Лабораторный диагноз на инфекционный бронхит птиц устанавливают на основании: РИФ, РН, ИФА, РСК и ПЦР. Патологическим материалом для лабораторных исследований служат смывы с гортани, трахеи от больных птиц и соскобы от трупов, кусочки легких, почек, а от взрослой птицы – почки и яйцеводы.

Специфическая профилактика основывается на применении инактивированной и живой вакцин. Существуют моно и поливалентные, ассоциированные вакцины. Важной мерой профилактики инфекционного бронхита является обеспечение птицы полноценными рационами, соблюдения в птичниках надлежащего ветеринарно-санитарного состояния, своевременное проведение профилактической дезинфекции.

**Губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота** – инфекционная медленно развивающаяся прионная трансмиссивная болезнь взрослого крупного рогатого скота, характеризующимся длительным (до 2,5–8 лет) инкубационным периодом, нервным синдромом, развитием диффузной дистрофической энцефалопатии головного и спинного мозга без признаков воспаления (нейроны и серое вещество мозга пронизаны вакуолями и напоминает губку) и 100 %-ной летальностью. Болезнь относится к группе трансмиссивных губкообразных энцефалопатий млекопитающих, медленно протекающих инфекций, при которых макроорганизм не отвечает иммунологической реакцией. К ним относятся скрепи овец, энцефалопатии норок и кошек, экзотических копытных животных, а также болезнь Крейтцфельд-Якоба у человека. Каждая из энцефалопатий имеет сходное прогрессирующее клиническое течение с неизбежным летальным исходом и сходные гистопатологические изменения.

Возбудитель – прион очень малых размеров, высокоустойчив к химическим и физическим факторам (рисунок 29).

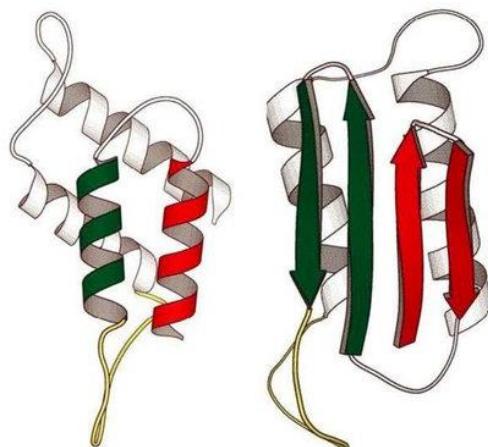


Рисунок 29 – Варианты пространственной конфигурации прионных белков: слева – нормальная конфигурация, справа – патологическая конфигурация

Возбудитель представлен только белком без нуклеиновой кислоты и поэтому выдерживает кипячение, многократное замораживание и оттаивание, не гибнет в течение 30 минут при 115 °С, не полностью инактивируется при 100 °С. В замороженном состоянии агенты сохраняются годами, при комнатной температуре – несколько месяцев. Предполагается, что возбудитель губкообразной энцефалопатии стал причиной появления нового варианта болезни Крейтцфельдт-Якоба у человека вследствие попадания его в пищевую цепь. Считается признанным, что губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота появилась в результате скармливания ему мясокостной муки, полученной при переработке туш овец, пораженных скрепи. Предполагается, что прион губкообразной энцефалопатии произошел от возбудителя скрепи овец при поедании кормов, содержащих патологическую форму приона. Последний вступает во взаимодействие с нормальным прионным белком, изменяет его в патологическую форму, образуя две молекулы, при следующем взаимодействии образуется 4 молекулы и т.д. в виде цепной реакции. Накапливаясь, патологические прионные молекулы агрегируются в волокна и образуют амилоидные бляшки. Нейроны при этом разрушаются, и на их месте образуется вакуоль.

Лабораторная диагностика связана с проведением патогистологических исследований, иммунохимических исследований (имmunоблотинг, иммуноферментный анализ, иммунофлюоресцентный анализ), биопробы на лабораторных животных.

Средств специфической профилактики губкообразной энцефалопатии нет. Основные меры борьбы направлены на изоляцию подозрительных животных, недопущение завоза в хозяйство или на ферму животных из неблагополучных хозяйств и стран, недопущение скармливания мясной или мясокостной муки от жвачных животных. Меры борьбы проводят в соответствии с «Инструкцией по мерам профилактики и борьбы с губкообразной энцефалопатией крупного рогатого скота».

### *Задания*

1. Зарисуйте схемы строения представителей РНК-содержащих вирусов.

3. Заполните таблицу 11.

*Таблица 11 – Особенности РНК-содержащих вирусов и инфекций ими вызываемых*

Заболевание	Систематика, размер и особенности возбудителя	Круг хозяев	Клинические признаки	Методы лабораторной диагностики	Устойчивость и возможность профилактики

3. Подготовьте сообщения и доклады с презентациями по семействам РНК вирусов.

4. Охарактеризуйте прионы. Какие заболевания животных они могут вызывать? В чем особенности лабораторной диагностики таких инфекций?

## **Профилактика вирусных инфекций**

### *Общие положения*

В настоящее время более 80 % всех инфекционных заболеваний животных, в том числе пушных зверей и птиц, вызываются вирусами. Мероприятия по борьбе с вирусными болезнями обычно носят комплексный характер, однако их успех во многом зависит от наличия и эффективности средств специфической профилактики. Благодаря использованию научных достижений в области вирусологии, генетики, биохимии, молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии постоянно совершенствуются и создаются новые биологические препараты для профилактики вирусных болезней.

При изготовлении вакцин для получения вирусодержащего материала используют живые биологические системы, чувствительные к вирусам: животных, куриные эмбрионы, культуры клеток.

В зависимости от биологической системы, используемой для культивирования вакцинного штамма вируса, различают тканевые, авинизированные, культуральные вакцины.

*Тканевые вакцины* в своей основе содержат какую-либо ткань животных, в которой размножался и накапливался вакцинный ви-

рус. Например, вакцину против бешенства готовят из мозговой ткани овец, зараженных пастеровским вирусом-фикс бешенства, вакцину против ящура – из тканей крольчат, зараженных адаптированным к ним вакцинным штаммом. Количество используемых на практике тканевых вакцин постепенно сокращается.

*Авионизированные вакцины* готовят из эмбриональных жидкостей и тканей развивающихся эмбрионов птиц, зараженных вакцинным штаммом. Наиболее часто для этих целей используют эмбрионы кур, реже уток и японских перепелов, например, для получения вакцин против гриппа птиц, болезни Ньюкасла, гепатита утят и др.

*Культуральные вакцины* готовят из зараженных культур клеток, при этом применяют роллерный (используют вращающиеся бутыли) или суспензионный (глубинный – используют реакторы) методы культивирования клеток и тканей. Это наиболее перспективный и прогрессивный метод получения вакцин. Таким методом готовят, например, вакцины против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3 крупного рогатого скота, ящура, чумы крупного рогатого скота и др.

В зависимости от видовой принадлежности вакцинного штамма различают гомологические и гетерологические противовирусные вакцины.

*Гомологические вакцины* готовят из того вида вируса, против которого предполагается создать иммунитет, например, вакцины против вирусной диареи, чумы крупного рогатого скота, бешенства и др. Большинство вирусных вакцин – гомологические.

*Гетерологические вакцины* готовят из вирусов другого вида, но имеющих в своем составе сходные антигены и обладающих перекрестной иммуногенностью. Например, вакцину против оспы кур готовят из вируса оспы голубей, вирус герпеса индеек используют для защиты кур от болезни Марека, вирус кори – для защиты собак от чумы плотоядных и т.д.

В зависимости от количества типов или видов возбудителей, включенных в состав вакцины, различают моновалентные, поливалентные, ассоциированные и смешанные вакцины.

*Моновалентные вакцины* содержат антигены одного типа (вида) вируса.

*Поливалентные вакцины* (бивалентные, трехвалентные и т. д.) готовят из нескольких типов одного вируса. Например, трехвалент-

ную противоящурную вакцину получают из трех типов вируса ящура – А, О и С.

*Ассоциированные вакцины* содержат антигены возбудителей разных видов, например, вакцина «Бивак» – против инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота, «Тетрапак» – против чумы, аденовироза, инфекционного гепатита и парвовирусного энтерита собак.

*Смешанные вакцины* представляют собой смесь вирусных и бактерийных антигенов, например, вакцина против чумы плотоядных, ботулизма и вирусного энтерита собак.

В зависимости от жизнеспособности (способности к репродукции) вируса, входящего в состав вакцины, все противовирусные вакцины подразделяют на живые и инактивированные.

*Живые вакцины* содержат живые селекционированные ослабленные (аттенуированные) штаммы вирусов.

*Инактивированные вакцины* содержат инактивированные (неживые) штаммы вирусов. Неживые вакцины подразделяют на молекулярные (химические) и корпускулярные. *Молекулярные* вакцины конструируют на основе специфических протективных антигенов, находящихся в молекулярном виде и полученных путем биосинтеза или химического синтеза. *Корпускулярные* – получают из цельного вируса. Чаще всего для получения неживых вакцин используют эпизоотические штаммы, которые обезвреживают физическими (температура, радиация, ультрафиолетовый свет) или химическими (спирт, формальдегид) методами. Этим обусловлены названия: термовакцина, радиовакцина и др.

Такие вакцины являются достаточно стабильными и безопасными, так как не могут вызвать реверсию вирулентности. Они часто не требуют хранения на холоде, что удобно в практическом использовании. Однако у инактивированных вакцин имеется и ряд недостатков, в частности, они стимулируют более слабый иммунный ответ и требуют многократного введения.

Все вакцинные препараты можно разделить на две большие группы: *цельновирионные* и *компонентные*. К цельновирионным относятся как живые, так и инактивированные вакцины. К компонентным можно отнести все вакцины, которые не входят в рубрику цельновирионных, т. е. сплит-вакцины, субъединичные и синтетические вакцины, а также вакцины, полученные генноинженерными

методами. К сожалению, пока отсутствует общепринятая научно обоснованная классификация таких вакцин.

### *Генноинженерные вакцины*

В связи с успехами генетики и генетической инженерии появились возможности целенаправленного конструирования вакциновых штаммов. Получены рекомбинантные штаммы вируса гриппа, а также штаммы вируса вакцины со встроенными генами протективных антигенов вируса гепатита В.

Препараты, в которых антиген находится в сорбированном состоянии, называют *сорбированными* или адсорбированными (дифтерийный, столбнячный, ботулинический сорбированные анатоксины). Сорбент играет роль носителя и адьюванта. В качестве носителя в синтетических вакцинах предложены всевозможные полимеры.

Интенсивно разрабатывается генно-инженерный способ получения протективных белковых антигенов бактерий и вирусов. В качестве продуцентов используют обычно эшерихии, дрожжи, псевдомонады со встроенными в них генами протективных антигенов. Получены рекомбинантные штаммы бактерий, производящие антигены возбудителей гриппа, коклюша, кори, герпеса, гепатита В, бешенства, ящура, ВИЧ-инфекции и др.

### *Технологии получения вакциновых препаратов*

В технологическом процессе вакцинного производства важны все звенья: от подбора производственных штаммов и питательной среды до конечных этапов – стандартизации и расфасовки биопрепаратов.

*Технология получения инактивированных (убитых) вакцин* включает в себя следующие этапы:

- Подбор или создание вакциновых штаммов.
- Размножение вакцинового штамма от культуры в пробирках до ферментера.
- Сепарирование клеток от культуральной жидкости (например, центрифугированием).
- Инактивирование клеток.
- Ресуспендиование клеток в подходящем растворителе (сахароза + желатин, вода).
- Розлив супензии по ампулам и флаконам.
- Лиофильное высушивание, запаивание ампул, закупоривание флаконов.

Инактивированные вакцины выпускают как в сухом (лиофилизированном), так и в жидком виде.

*Технология получения живых вакцин* сводится к выращиванию аттенуированного вакцинного штамма с соблюдением условий, обеспечивающих получение чистых культур штамма, исключение возможностей загрязнения другими микроорганизмами с последующей стабилизацией и стандартизацией конечного препарата. Вакцинные штаммы бактерий выращивают на жидких питательных средах (гидролизаты казеина или другие белково-углеводные субстраты) в аппаратах ферментерах емкостью от 0,1 м<sup>3</sup> до 1-2 м<sup>3</sup>. Полученная чистая культура вакцинного штамма подвергается лиофильному высушиванию с добавлением протекторов, которые обеспечивают устойчивость препарата.

Вирусные и риккетсиозные живые вакцины получают выращиванием вакцинного штамма в эмбрионах кур или перепелов, свободных от вирусов лейкоза, либо в культурах клеток, лишенных микоплазм. Используют или первично-трипсинизированные клетки животных или перевиваемые диплоидные клетки человека.

Технология изготовления живых вакцин включает в себя следующие этапы:

- Подбор или создание вакцинных штаммов.
- Размножение вакцинного штамма от культуры в пробирках до ферmentera.
- Сепарирование клеток от культуральной жидкости (например, центрифугированием).
- Ресуспендривание клеток в подходящем растворителе (сахароза + желатин, вода).
- Розлив суспензии по ампулам и флаконам.
- Лиофильное высушивание, запаивание ампул, закупоривание флаконов.

Производство живых ослабленных микроорганизмов в промышленных масштабах не требует больших финансовых затрат, так как они, как правило, накапливаются в больших концентрациях в бактериальной культивационной среде либо в среде, содержащей клетки, производящие вирусные частицы.

Отрицательные стороны: живые вакцины содержат вирусы-загрязнители (контаминаты), особенно это опасно в отношении обезьяньего СПИДа и онковирусов. К сожалению, живые вакцины трудно дозируются и поддаются биоконтролю, легко чувствитель-

ны к действию высоких температур и требуют неукоснительного соблюдения холодовой цепи.

*Требования к качеству производимых вакцинных препаратов*

Разработка и изготовление современных вакцин производится в соответствии с требованиями к их качеству, в первую очередь, безвредности для привитых. Обычно такие требования основываются на рекомендациях Всемирной Организации Здравоохранения, которая привлекает для их составления самых авторитетных специалистов из разных стран мира. "Идеальным" мог бы считаться препарат, обладающий такими качествами, как:

- Полной безвредностью для привитых, а в случае живых вакцин - и для лиц, к которым вакцинальный микроорганизм попадает в результате контактов с привитыми;
- Способностью вызывать стойкий иммунитет после минимального количества введений (не более трех);
- Возможностью введения в организм способом, исключающим парентеральные манипуляции, например, нанесением на слизистые оболочки;
- Достаточной стабильностью, чтобы не допустить ухудшения свойств вакцины при транспортировке и хранении в условиях прививочного пункта;
- Умеренной ценой, которая не препятствовала бы массовому применению вакцины.

Вакцины проверяют на безвредность, реактогенность и иммуногенность.

*Безвредность* включает проверку на лабораторных животных и других биологических системах токсичности, стерильности, аллергенности, тератогенности, мутагенности препарата.

*Реактогенность*, т.е. побочные местные и общие реакции на введение вакцины, оценивают на животных и при прививках людей.

*Иммуногенность* проверяют на лабораторных животных и выражают в иммунизирующих единицах, т.е. в дозах антигена, защищающих 50 % иммунизированных животных, зараженных определенным числом инфицирующих доз патогенного микробы или токсина. В противоэпидемической практике эффект вакцинации оценивают по соотношению инфекционной заболеваемости в привитых и непривитых коллективах.

*Принцип и технология получения вакцин на основе генно-инженерного способа* сводятся к выращиванию рекомбинантного штамма, выделению и очистке протективного антигена, конструированию конечного препарата.

Принцип создания генноинженерных вакцин заключается в том, что в геном живых аттенуированных вирусов, бактерий, дрожжей или клеток эукариотов встраивается ген, кодирующий образование протективного антигена того возбудителя, против которого направлена вакцина. В качестве вакцин используются сами модифицированные микроорганизмы или протективный антиген, образующийся при их культивировании в условиях *in vitro*. В первом случае иммунный ответ направлен не только против продуктов встроенного гена, но и на носитель вектора. Примером рекомбинантной вакцины, состоящей из готового антигена, является вакцина против гепатита В, а примером векторных вакцин, антигены которых образуются *in vivo*, является антирабическая вакцина. Она получена на основе осповакцины и нашла широкое применение в профилактике бешенства среди диких животных с помощью приманки, содержащей эту вакцину.

*Иммунные сыворотки* в отличии от вакцин содержат готовые антитела. Они разнообразны по своей структуре и функциям. В зависимости от природы и свойств антигенов, для борьбы с которыми предназначены антитела, содержащиеся в сыворотке, выделяют антибактериальные, противовирусные, антитоксические, противоопухолевые и др. сыворотки. Иммунные сыворотки применяют с лечебной и профилактической целью. С лечебной целью сывороточные препараты вводят как можно раньше внутримышечно (иногда внутривенно) в больших дозах. При использовании с профилактической целью формируется кратковременный искусственный пассивный иммунитет.

Различают два источника получения специфических сывороточных препаратов. Это гипериммунизация животных (гетерологичные сывороточные препараты) и вакцинация доноров (гомологичные препараты).

#### *Технологии получения сывороток*

Главным источником антител к различным патогенным вирусам, микроорганизмам и их ядам служит кровь животных-доноров. Как правило, это лошади, ослы, и кролики. Реже овцы или свиньи. Животные иммунизируются, а затем у них берется кровь, из ко-

торой после свертывания белков извлекается сыворотка. Путем длительного вымораживания из нее удаляется большая часть посторонних примесей. Затем осветленный препарат разливается в товарную тару. Хранится иммунная сыворотка в холодильнике для сохранения активности антител.

Однако сыворотки, полученные путем иммунизации лошадей и др. животных, гетерогенны, то есть, чужеродны для человека, поэтому они имеют, как минимум, два недостатка. Это кратковременность обусловливаемого ими пассивного иммунитета. Его продолжительность около двух недель. Разрушение антител происходит за счет естественного процесса распада белков введенной сыворотки и за счет образования антител к белкам сыворотки животного, которая для организма является антигеном. Второй, и главный недостаток, заключается в том, что при введении сывороточных препаратов возможны осложнения аллергического характера от крапивницы до анафилактического шока.

Биотехнологические основы производства и получения иммунных сывороток позволяют использовать в качестве продуцента культивируемую культуру животных клеток в питательном растворе. Такой способ позволяет получать более активную и чистую сыворотку в промышленных масштабах без затрат на содержание животных доноров. Но есть и одна проблема, связанная с нестабильностью роста животных клеток их постепенным старением и подверженностью генетическим изменениям. Эту проблему удается решить с помощью моноклональных антител.

### *Моноклональные антитела*

При введении в организм животных и человека чужеродных макромолекулярных веществ (*антигенов*) в крови появляются защитные белки – *антитела*, для которых характерна необыкновенная, уникальная специфичность. Каждое антитело узнает только свой антиген, точнее, одну его *детерминантную группу*. Детерминантная группа состоит из нескольких остатков аминокислот или сахаров (обычно из 6–8), образующих пространственную структуру, характерную для данного белка. В одном белке, состоящем из нескольких сот аминокислот, имеется несколько (5–15) разных детерминант, поэтому к одному белку образуется целое семейство различных по своей специфичности антител. Даже к одной детерминанте образуется целый спектр антител, отличающихся по структуре, степени специфичности и прочности связывания

с ней. Таким образом, в крови иммунизированных животных появляется многокомпонентный спектр *поликлональных антител*, который и обеспечивает распознавание данного антигена.

Однако иногда требуются не многокомпонентные смеси антител, возникающие в крови в ответ на введение антигена, а отдельные, элементарные составляющие этой смеси, направленные лишь к одной детерминанте антигена и имеющие одни и те же характеристики. Такие антитела бывают нужны, как для изучения их собственной природы, так и для практического использования, например для доставки в опухоли токсических веществ или получения специфических лабораторных диагностических сывороток. Они получили название *моноклональные антитела*. Это белок (иммуноглобулин) с заданной специфичностью к определенному антигену, продуцируемый стабильной клеточной линией. Клетки клона полностью идентичны, а вырабатываемые ими антитела обладают одинаковой структурой и свойствами. Получение таких антител стало возможным после разработки в 1975 Жоржем Кёлером и Сезаром Мильштейном *гибридом* – гибридных клеток опухоли (плазмоцитом, обладающих способностью к непрерывному делению) и В-лимфоцитов (плазматических клеток), производящих антитела.

Методы гибридизации соматических (то есть не половых) клеток к тому времени были хорошо известны и широко применялись для разных целей. Для этого использовали вирус, способствующий слиянию клеток. Разнородные клетки, у которых слились оболочки, образовывали двуядерные гибриды, которые сохраняли способность к клеточным делениям. В процессе клеточного деления хромосомы обоих ядер перемешивались и образовывали общее ядро. Таким образом, возникал истинный гибрид, потомок двух соматических клеток, или гибридома.

Гибридомы создают уникальные возможности в аналитических целях: их можно применять как «имmunологический микроскоп» с чрезвычайно высоким разрешением. Так, например, если нужно сравнить две клеточные линии, отличающиеся одним или немногими антигенами, и надо выявить такие антигены, то метод гибридом предоставляет для этого исключительные возможности. Проиммунизировав мышей одной из линий и получив сотни гибридом, производящих антитела к антигенам этой линии, можно найти одну или две с антителами только к данной линии.

Размножив такую гибридому в пробирке или вырастив ее на мышах, можно получить огромное количество антител к уникальному антигену (или детерминантной группе), затерянному среди других компонентов клетки подобно иголке в стоге сена. Это будет продукт одного клона. В крови иммунизированного животного среди множества других антител он никак не проявится из-за чисто количественных отношений. Благодаря же гибридомам его можно не только обнаружить, но и вывести в линию и получить любое количество соответствующих антител. С помощью гибридом можно обнаружить антигены, характерные для опухолей определенных тканей, получить к ним антитела и использовать их для диагностики и типирования опухолей. Такие моноклональные антитела нашли широкое применение в онкологической клинике.

Моноклональные антитела из-за высочайшей специфичности, стандартности и технологичности получения успешно вытесняют и заменяют иммунные сыворотки.

### *Задания*

1. Заполните таблицу 12.

*Таблица 12 – Характеристика вакцин*

Вид вакцины	Характеристика	Преимущества	Недостатки
Инактивированные			
Живые			
Молекулярные			
Синтетические			
Анотоксины			
Рекомбантные			
Химические			

2. Заполните таблицу 13.

*Таблица 13 – Характеристика сывороток*

Вид сыворотки	Характеристика	Использование	Недостатки
Сыворотки с использованием крови животных			
Биотехнологические сыворотки			
Моноклональные антитела			

3. Схематично нарисуйте или перечислите стадии производства разных видов вакцин.

4. Схематично нарисуйте или перечислите стадии получения иммунных сывороток.

5. Схематично нарисуйте или перечислите стадии получения моноклональных антител.

## **Карантинные и ограничительные мероприятия**

### *Общие положения*

В каждом конкретном случае оздоровительные мероприятия должны строиться с учетом категории эпизоотического очага (неблагополучного пункта) на принципиальной основе их комплексности и выделения ведущего звена эпизоотического процесса. Все-стороннее эпизоотологическое обследование очага и постановка достоверного диагноза дают основание для объявления хозяйства (фермы, отделения, пункта) неблагополучным по конкретной инфекционной болезни, составления плана оздоровления эпизоотического очага и ликвидации возникшей болезни. Эпизоотические очаги в неблагополучных хозяйствах и населенных пунктах могут быть различными по размерам, числу больных и восприимчивых животных. Это зависит от характера болезни и конкретных условий. По сложившейся эпизоотической обстановке они делятся на несколько категорий: свежие, затухающие, стационарные, природные и др.

Независимо от вида инфекционной болезни, оздоровление неблагополучного пункта осуществляют по плану, в котором должны найти конкретное отражение следующие мероприятия:

а) полное выявление, обезвреживание и ликвидация источников возбудителя инфекции;

б) повышение общей резистентности, а также создание специфического иммунитета у животных, находящихся под угрозой заражения;

в) пресечение механизма передачи и путей распространения возбудителя инфекций внутри эпизоотического очага (хозяйства, пункта) и за его пределы путем плановой и целенаправленной санации внешней среды, включая обеззараживание животноводче-

ской продукции, сырья и кормов, утилизацию трупов, навоза, производственных отходов, проведения дезинфекции, дезинсекции и дератизации, охранно-ограничительных и карантинных мер.

Конкретный перечень оздоровительных мероприятий, которые необходимо проводить в неблагополучном хозяйстве, определяется инструктивными положениями, разработанными по каждой инфекционной болезни, и сложившейся эпизоотической обстановкой. Объем и тщательность оздоровительных мероприятий зависят от особенностей инфекционной болезни и ее опасности, а также от тех условий, в которых находятся восприимчивые животные.

Однако принципиальное различие оздоровительных мер при вспышке в хозяйстве любой инфекционной болезни заключается не в характере их проведения, а в степени разобщения неблагополучных групп животных и территорий их размещения с благополучными хозяйствами (фермами, отделениями). По этому признаку в неблагополучных хозяйствах, где установлена вспышка инфекционной болезни, обязательно вводят ограничения или накладывают карантин.

*Карантин* – это система противоэпизоотических мероприятий, направленная на полное разобщение неблагополучных по инфекционной болезни групп животных и территории их размещения с благополучными хозяйствами и территориями с целью ликвидации болезни и исключения ее распространения за пределы возникшего эпизоотического очага.

По условиям карантина запрещаются ввод в неблагополучное хозяйство и вывод из него восприимчивых животных, выпас скота, вывоз продуктов и сырья животного происхождения, фуража и другой продукции растениеводства, проезд через эпизоотический очаг (неблагополучный пункт), проведение выставок, ярмарок, базаров в карантинной и близлежащей зонах и т.д. При некоторых эпизоотиях прекращают все связи с другими хозяйствами, приостанавливают движение частного автотранспорта, отменяют маршрутное движение автобусов, накладывают конвекционные запрещения на вывоз животноводческих грузов с железнодорожных станций, аэропортов, морских портов; прекращают на неблагополучной территории прием посылок с животноводческой продукцией, интернируют лиц, работающих в эпизоотическом очаге, и т.д.

Карантин проводят в отношении наиболее опасных инфекционных болезней, имеющих тенденцию к эпизоотическому распро-

странению (ящур, сибирская язва, чума свиней, оспа овец и некоторые др.). Каратинированию подлежат отдельные дворы, гурты, отары, фермы, хозяйства, а при особо опасных болезнях - район, область, край, республика. При некоторых особенно опасных инфекционных болезнях, указанных в Ветеринарном законодательстве, вокруг неблагополучных территорий устанавливают угрожаемую зону, границы которой определяют в зависимости от степени и широты распространения инфекционной болезни.

На дорогах, ведущих в неблагополучный пункт, вывешивают специальные указатели, устанавливают шлагбаумы, указывают объездные пути, организуют охранно-каратинные посты, оборудуют дезинфекционные барьеры, а также перевалочные площадки для ввоза кормов, оборудования, инвентаря. При некоторых болезнях проводят, полную санитарную обработку обслуживающего персонала фермы, используя санпропускники и пароформалиновые камеры для обеззараживания одежды.

*Ограничительные мероприятия* – это менее высокая степень разобщения, чем карантин. Их проводят в эпизоотическом очаге, неблагополучном хозяйстве, населенном пункте при инфекционных болезнях, не имеющих тенденции к широкому эпизоотическому распространению (некробактериоз, оспа коров, мыт лошадей и др.). При многих особенно опасных болезнях после снятия карантина в хозяйстве на длительный срок вводят ограничения в части использования животноводческой продукции, кормов, навоза, пастбищ, водоисточников и т.д.

Как при введении ограничений, так и наложении карантина применяют изоляцию животных, под которой понимают отделение больных и подозрительных по заболеванию животных от здоровых с созданием условий, исключающих дальнейшее распространение болезни. На фермах для изолированного содержания животных строят отдельное, специально оборудованное помещение (изолятор) с системой боксов, полубоксов и денников, комнат для лечебных процедур, хранения инвентаря и фуражка. Изолятор располагают на расстоянии не менее 100 м от животноводческих помещений, огораживают глухим забором, устраивают дезбарьер при входе на его территорию. В животноводческих помещениях оборудуют санитарные глухие станки для содержания слабых и больных животных. Изоляция животных может быть индивидуальной и групповой, но во всех случаях она должна быть достаточно надежной.

Следовательно, карантинные и ограничительные мероприятия проводятся по отношению к группам животных и территориям (эпизотический очаг, хозяйство, населенный пункт и т.д.), а изоляция – только к животным.

Порядок наложения карантина и ограничений, а также последующее проведение оздоровительных мероприятий в неблагополучных хозяйствах и населенных пунктах определяется соответствующими инструкциями Министерства сельского хозяйства.

Карантинные и ограничительные мероприятия осуществляются на основании решений районного (городского) органа исполнительной по представлению главного ветеринарного врача района. Ответственность за соблюдение карантинных правил и проведение общих оздоровительных мероприятий возлагается на руководителей хозяйств, предприятий и органы местной власти. За организацию и проведение специальных противоэпизоотических мер полностью отвечает ветеринарная служба. Поэтому при составлении плана оздоровительных мероприятий надо подходить очень строго к определению конкретных ответственных исполнителей и лиц, контролирующих исполнение каждого мероприятия.

Сроки карантинирования или ограничительные меры обусловливаются длительностью инкубационного периода болезни и носительства у переболевших животных. Карантин и ограничения снимаются с неблагополучного пункта после полного выздоровления животных, проведения необходимых заключительных ветеринарно-санитарных мероприятий и по истечении срока, установленного соответствующими инструкциями. Снятие карантина, как и введение ограничений, проводят решениями районных (городских) органов исполнительной власти по представлению главного ветеринарного врача района.

### *Задания*

1. Составьте пошаговую схему действий ветеринара при введении карантина и ограничительных мероприятий.
2. Разделитесь на группы по 3-4 человека и разработайте план карантина под выбранную вами вирусную инфекцию, включая механизм введения, объявления, назначения ответственных лиц, лабораторной диагностики и экспертизы, механизма и условий снятия и т.п. Сделайте доклад с презентацией.

3. Приведите примеры и охарактеризуйте информационные технологии, использующиеся для предупреждения распространения опасных инфекций и ветеринарно-санитарного контроля качества продукции животноводства.

4. Заполните таблицу 14.

*Таблица 14 – Оценка видов профилактических мероприятий*

Характеристика	Карантин	Ограничительное мероприятие
Заболевание		
Объект, на который на-кладывается ограничение		
Сроки введения и снятия		
Запретные мероприятия		
Действия с животными		
Дезинфекция		
Значение		

## **Диагностика вирусных инфекций**

### *Общие положения*

Для постановки диагноза требуется анализ и сопоставление целого комплекса данных. На первом этапе диагностики используют эпизоотологические данные, включая сведения о распространении болезни, клинические признаки заболевания, патологоанатомические изменения, обнаруженные при вскрытии павших, или вынуждено убитых животных. На основании анализа этих данных можно поставить предварительный диагноз, так как многие вирусные и бактериальные инфекционные заболевания могут иметь сходные проявления. Окончательный диагноз может быть поставлен только с учетом результатов лабораторных исследований, для проведения которых отбирается материал (пробы) от больных и павших животных.

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

Материал для исследований от заболевших, павших или вынужденно убитых животных следует брать как можно быстрее после появления четких признаков болезни или не позднее 2–3 ч по-

сле клинической смерти или убоя. Это связано с тем, что сразу после заболевания или впервые 1–2 дня значительно ослабевает барьерная роль кишечника, что наряду с повышенной проницаемостью кровеносных сосудов способствует диссеминации кишечной флоры. Кроме того, по мере продолжения и даже углубления инфекционного процесса количество вируса может уменьшаться в результате воздействия защитных механизмов организма.

При взятии материала для выделения вируса следует исходить из патогенеза изучаемой инфекции (входные ворота, пути распространения вируса в организме, места его размножения и пути выделения). Так, при респираторных инфекциях для выделения вирусов берут носоглоточные смывы, мазки из носа и глотки, соскобы трахеи и кусочки легкого трупов; при энтеровирусных – кал; при нейротропных – кусочки головного или спинного мозга; при дермоторпных инфекциях – свежие поражения кожи, то есть отбирают тот материал, в котором предполагается наибольшая концентрация вируса. Материалом для выделения вируса могут служить различные экскреты и секреты, кусочки органов, кровь, лимфа и др.

Кровь берут из яремной вены, у свиней – из кончика хвоста или уха. Лучше кровь у свиней брать из венозного сплетения глаз. При этом пользуются шприцем «Рекорд» (на 20 мл) и иглой № 12–30, которую вводят по внутреннему углу костной орбиты (скосом иглы к костной орбите) к противоположному уху до упора, затем оттягивают на 1–1,5 см и набирают кровь.

Для выделения вируса может быть использована либо цельная дефибринированная, либо «лайковая» кровь (смесь крови с дистиллированной водой в соотношении 1:1), либо отдельные элементы крови (эритроциты, лейкоциты, плазма, сыворотка). Для обнаружения противовирусных антител кровь берут у одного и того же животного дважды с интервалом 2–3 недели (для получения парных сывороток в объеме не менее 5,0 мл каждой).

Смывы с конъюнктивы, со слизистой оболочки носа, с задней стенки глотки, прямой кишки и клоаки у птиц берут стерильными ватными тампонами и погружают их в пенициллиновые флаконы или пробирки, содержащие 3–5 мл соответствующей жидкости. Наиболее часто для этого используют раствор Хенкса или среды для культур клеток (ИГЛА, 199) с антибиотиками (пенициллин и стрептомицин по 500 ЕД. и нистатин по 20 ЕД. на 1 мл среды) и белковым стабилизатором, например 0,5 %-ным раствором желати-

на или 0,5–1%-ым раствором альбумина бычьей сыворотки. Присутствие стабилизаторов необходимо для предотвращения быстрой инактивации некоторых вирусов (например, парагриппа).

При взятии материала из носоглотки можно пользоваться прибором, сконструированным Томасом и Стоком. Он состоит из трубы диаметром 9мм и длиной 30см, внутри которой помещается вторая тонкая трубка с нержавеющим стержнем, оканчивающимся нейлоновой щеткой (диаметр 9мм). Прибор вводят глубоко в носовые КОДЫ (хоаны) или в горло через носовой ход, выдвигая щеточку, затем вновь задвигая ее в трубку, перед тем как вынуть прибор из органа. Щеточку тщательно отмывают от слизи и клеток в 2 мл жидкости.

Слюну имеет смысл брать при наличии признаков поражения ротной полости или слюнных желез. Вытекающую изо рта слюну можно собрать прямо в пробирку. Если ее выделяется мало или она не вытекает, необходимо пропитать слюной стерильный тампон из ваты на палочке, а затем поместить в пробирку с небольшим количеством физиологического раствора и закрыть резиновой пробкой. Для усиления слюноотделения животному можно ввести пилокарпин из расчета 0,02–0,05г на 1кг массы.

Мочу собирают при помощи катетера в стерильную посуду.

Фекалии берут из прямой кишки шпателем или палочкой и помещают в стерильную пробирку или пенициллиновый флакон.

Везикулярную жидкость можно собрать шприцем или пастеровской пипеткой в стерильную пробирку. Стенки афт, корочки с поверхности кожи снимают пинцетом.

Спинномозговую жидкость используют редко. Ее берут асептично путем обычной пункции.

После смерти животного важно как можно быстрее взять кусочки органов, так как при многих вирусных инфекциях наблюдается феномен посмертной аутостерилизации, в результате чего вирус может быть вообще не обнаружен или его количество окажется столь незначительным, что обычными рутинными методами исследования выделить его не удается. Вторая причина необходимости экстренного взятия материала заключается в том, что в трупе быстро развивается бактериальное обсеменение, взять пробу стерильно становится невозможno.

В экспериментальных условиях инфекционный материал берут главным образом у животных, убитых в агональный период болезни.

Применение антибиотиков эффективно лишь при условии незначительного бактериального загрязнения проб. Однако при различных посмертных изменениях тканей, если даже при помощи антибиотиков удается затормозить рост бактерий, нельзя нейтрализовать продукты их метаболизма и токсические субстанции поврежденной ткани. Такой материал непригоден для проведения исследований ни на животных, ни тем более на куриных эмбрионах и культурах клеток. По тем же причинам пробы должны быть взяты по возможности в стерильных условиях. Особенно тщательно следует избегать загрязнения проб содержимым пищеварительного тракта, так как в нем могут находиться непатогенные вирусы, которые вызывают деструкцию клеточных культур, осложняя тем самым диагностические исследования.

В качестве патматериала берут кусочки органов размером в несколько кубических сантиметров и массой 10–20г, которые имеют видимые отклонения от нормы (по форме, размеру, цвету, консистенции, наличию необычных образований); могут быть поражены и содержать вирус на основании клинической картины болезни перед смертью.

Наиболее часто содержат вирус печень, селезенка, легкие, головной мозг, лимфатические узлы, почки.

Пробы рекомендуется как можно быстрее поместить в условия, обеспечивающие замедление процессов инактивации вируса. Такие условия обеспечивают низкие температуры. Для этого пробирки (флакончики) с патматериалом, закрытые резиновыми пробками, надо поместить в термос с охлаждающей смесью . В качестве охлаждающей смеси можно взять смесь равных частей сухого льда (твердой углекислоты) и этилового спирта (температура минус 71 °С держится несколько дней). Можно использовать смесь, состоящую из трех массовых частей льда или снега и одной массовой части поваренной соли. В последнем случае удается получить температуру минус 15 °С – минус 20 °С. Вместо замораживания можно использовать для консервирования химические средства (менее эффективно). Лучшим из последних считается смесь равных объемов стерильных глицерина и 0,85 %-ного раствора поваренной соли (изотонический раствор), в которую и помещается патматериал.

Обычно эту смесь используют для консервирования кусочков паренхиматозных органов и тканей. Растворы глицерина менее пригодны для вирусодержащих жидкостей, особенно в тех случаях, когда этот материал нужно вводить животным, эмбрионам и в культуру клеток в неразведенном виде. Употребление глицерина делает невозможным исследование патологического материала методом иммунофлюоресценции. Поэтому одновременно с пробой патматериала необходимо направлять мазки-отпечатки, приготовленные и фиксированные на предметном стекле, для исследования в люминесцентном микроскопе.

Для гистологических исследований кусочки органов чаще консервируют в 10 %-ном растворе формалина.

Патматериал должен быть снабжен надежной и четкой этикеткой, недопустимо делать надписи карандашом по стеклу. На пробирке или флакончике достаточно надежна этикетка из лейкопластиря, на которой написано простым (графитным) карандашом, какой материал и от какого животного получен. На термос с пробами патматериала навешивают бирку из картона или фанеры, на которой указывают хозяйство, вид животного, вид материала и дату. Термос должен быть опечатан. Взятый материал с сопроводительным документом, содержащим полную информацию о животном, от которого взяты пробы, эпизоотологические данные хозяйства, предположительный диагноз и меры, принятые для ликвидации болезни (лечение, вакцинации и т. д.), а также дату и фамилию врача, направляют с нарочным. Этими данными руководствуются при выборе направления лабораторных исследований. Доставленные в лабораторию пробы рекомендуется немедленно использовать для выделения вируса. Если по каким-то причинам (отсутствие экспериментальных животных, куриных эмбрионов, культур клеток) исследование откладывается, материал необходимо хранить при температуре минус 40 °С – минус 70 °С. Большинство вирусов быстро разрушается в крови, спинномозговой жидкости, моче, соках и смывах носоглотки, а вирус парагриппа крупного рогатого скота и респираторно-синцитиальный вирус быстро погибают при замораживании, поэтому успех выделения их зависит от быстроты исследований. Если не известно, что исследуемое инфекционное заболевание было вызвано вирусом, часть материала отдают для бактериологического и микологического исследований.

## *Задания*

1. Нарисуйте схему постановки диагноза при вирусном инфекционном заболевании. Какую информацию нужно собрать для постановки предварительного диагноза? Как правильно собрать материал для лабораторных исследований?

2. Заполните таблицу 15.

*Таблица 15 – Отбор проб для лабораторных исследований*

Вирусное заболевание	Отбираемый биоматериал	Способ консервирования и сохранения	Методы индикации и идентификации

3. Опишите, как проводится диагностика вирусных инфекций с использованием технологий Big data и искусственного интеллекта. Какие сквозные технологии применяются в практике ветеринарного врача и в диагностике вирусных инфекций?

4. Разделиться на малые группы и выполнить один из вариантов кейс-задания с оформлением отчета в рабочей тетради или электронном виде.

5. Разработайте свой кейс-задание по диагностике вирусных инфекций.

## *Кейс 1*

### *Материал для анализа*

1. В лесном массиве обнаружен труп дикого кабана. Был проведен внешний осмотр, представленный на фотографиях:



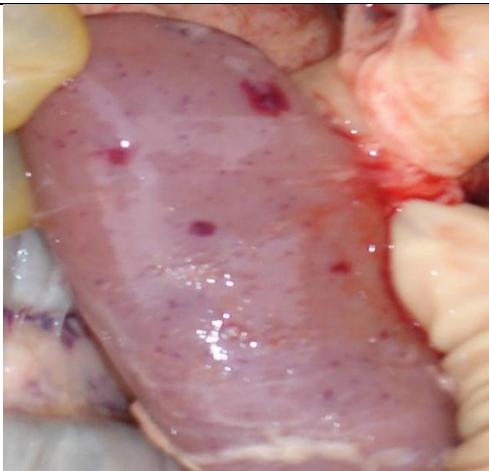
Цианоз кожных покровов и слизистых полости рта, покраснение конъюктивы глаз.

2. Было проведено вскрытие, результаты которого представлены на фотографиях:



Гиперемия и отек легких, скопление жидкости в плевральной полости.

Селезенка



Почки



Лимфатические узлы брыжейки увеличены, темно-красного цвета

**Задания:** Дайте ответы на поставленные вопросы, оформив их в виде презентации в электронном виде.

1. Определить вид инфекционного вирусного заболевания. Обоснуйте свой ответ. Возможно обоснование нескольких предварительных диагнозов со сходными признаками. К какому семейству вирусов относится возбудитель? В чем его особенности?

2. Можно ли считать дикого кабана источником инфекции для домашних свиней? Какова, по вашему мнению, степень опасности и почему вы так считаете?

3. С помощью каких математических моделей можно провести прогнозирование распространения вируса в природной популяции кабана? Выполните пробный расчет с помощью Excel, если численность оценивается в 500 голов, всего обнаружено 5 трупов.

4. Как происходит передача инфекции? Существуют ли ее природные резервуары?

5. Какой биоматериал и как нужно отобрать для лабораторных исследований? Какие виды лабораторных исследований, по вашему мнению, необходимо провести и какие сопроводительные документы при этом должны быть оформлены?

6. Каким образом должны быть утилизированы останки павших животных и биоматериал, поступивший в лабораторию?

7. Какие карантинные мероприятия должны быть проведены в случае подтверждения диагноза?

## Кейс 2

### *Материал для анализа*

1. На ферме выявлено животное с лихорадкой и клиническими проявлениями, представленными на фотографиях.



2. Возможности заноса данного вида инфекции представлены в таблице.

№№	Вероятные пути заноса возбудителей	Системы выращивания крупного рогатого скота	
		экстенсивная	интенсивная
1	Крупный рогатый скот	+	+
2	Другие животные	+	- К
3	Персонал	+	+
4	Оборудование	-	+
5	Транспорт	+	+
6	Воздух	+	±
7	Вода (водопой)	+	- К
8	Корм	+	- К

Примечание: – К очень низкий риск заноса возбудителей в стада, ситуация контролируется;  
+ высокий уровень заноса возбудителей; ± возможен занос

**Задания:** Дайте ответы на поставленные вопросы, оформив их в виде презентации в электронном виде.

- Предложите возможные вирусные инфекции, при которых будут наблюдаться такие признаки. К каким семействам вирусов относятся возбудители и в чем их особенности?
- Какой биоматериал нужно отобрать для лабораторного анализа и постановки окончательного диагноза? Приведите пример оформления сопроводительных документов.
- Какие карантинные мероприятия следует провести на ферме и почему?
- Сделайте прогноз о контагеозности и летальности заболевания, возможных экономических потерях, если поголовье крупного рогатого скота составляет 1000 голов, а клинические проявления имеются у двух животных?
- Проанализируйте наиболее вероятные пути заражения и предложите мероприятия по недопущению заражения животных и распространения инфекционного заболевания на ферме.
- Какие данные, собираемые автоматическими системами управления стадом, могут служить для раннего выявления вирусных заболеваний?
- Существует ли опасность заражения для персонала и для населения, проживающего рядом с фермой?
- Разработайте памятку поведения для людей, контактирующих с больными животными.
- В какой форме, и каким организациям необходимо направить информацию в случае подтверждения диагноза?

## Кейс 3

### *Материал для анализа*

Редкое кожное заболевание эпидермодисплазия делает своих обладателей очень чувствительными к широко распространенному вирусу папилломы человека (ВПЧ). У таких людей инфекция вызывает рост многочисленных кожных наростов, напоминающих по плотности древесину.

О заболевании стало широко известно в 2007 году после того как в интернете появился видеоролик с индонезийским рыбаком, который из-за обилия бородавковидных образований на теле практически потерял дееспособность. В 2008 году мужчина перенес сложную операцию по удалению 6 кг наростов с головы, рук, ног и туловища. На прооперированные части тела была пересажена новая кожа. К сожалению, через некоторое время наросты появились вновь.

#### *Задания:*

1. К какому семейству относится этот вирус?
2. Почему на прооперированных участках кожи через время вновь появились новые наросты?
3. Почему в XX веке вирусы стали главным объектом экспериментальных генетических исследований?
4. Почему вирусные заболевания имеют характер эпидемий?
5. Какие сложности возникают при попытках создать вакцину против вирусных инфекций?
6. Каким образом можно идентифицировать этот вирус? Какой биоматериал нужно отобрать для анализа и какие методы исследования можно использовать для идентификации вируса?
7. Существуют ли способы профилактики этой инфекции?

### **Контрольные вопросы**

1. Охарактеризуйте виды ДНК вирусов.
2. Охарактеризуйте виды РНК вирусов.
3. Что такое прионы, какие заболевания животных они вызывают?
4. В чем главное отличие вакцины от сыворотки?
5. Какие виды иммунитета формируются при введении вакцины и иммунной сыворотки?

6. Когда проводятся профилактические и лечебные прививки?
7. Какие виды вакцин, на ваш взгляд, являются наиболее перспективными?
8. Чем отличаются моноклональные антитела от поликлональных?
9. Почему производство моноклональных антител считается перспективным?
10. Чем отличается карантин от ограничительных мероприятий?
11. Когда и как организуются карантин и ограничительные мероприятия?
12. Как правильно поставить диагноз? В чем отличие предварительного диагноза?
13. На основании чего ставится окончательный диагноз?
14. Как правильно отобрать материал для вирусологических исследований?
15. Чем отличаются вирусологические исследования от гистологических и бактериологических?

## **Тестовые задания**

*Выберите единственную комбинацию, в которой учтены все правильные ответы:*

1. К молекулярно-генетическим методам диагностики относятся: а) полимеразная цепная реакция (ПЦР); б) ДНК-ДНК-гибридизация; в) латекс-агглютинация; г) реакция связывания комплемента (РСК); д) реакция непрямой гемагглютинации (РНГА).

1) а, б; 2) в, г; 3) б, в; 4) г, д. 5) а, г

2. К методам экспресс-диагностики относятся: а) бактериологический; б) иммунофлюоресценция; в) биологический; г) ПЦР; д) вирусологический.

1) а, б; 2) б, в; 3) в, г; 4) б, г; 5) а, д

3. В каких серологических реакциях участвует комплемент: а) преципитации; б) агглютинации; в) РСК; г) иммунного гемолиза; д) иммунофлюоресценции.

1) а, г; 2) в, г; 3) а, б; 4) в, д; 5) а, в, г

4. Противовирусными препаратами являются: а) антибиотики; б) интерфероны; в) аномальные нуклеозиды; г) иммуноглобулины; д) бактериофаги.

1) в, г, д; 2) а, б, в; 3) а, г, д; 4) б, г, д; 5) б, в, г

5. Какое утверждение относительно ретровирусов верно?  
а) имеют диплоидный геном, б) геном образован двумя нитями ДНК, в) содержат обратную транскриптазу, г) геном образован двумя нитями РНК, д) не передаются через кровь.

1) а,б; 2) а,б,в; 3) а,г,в,; 4) а,д,г; 5) б,в,д

6. Плюс-геномную РНК содержат следующие группы вирусов:  
а) пикорнавирусы, б) ортомиксовирусы, в) калицивирусы, г) герпесвирусы, д) оспавирусы.

1) а,в; 2) а,б,в; 3) а,б,в,г,д; 4) б,г,д; 5) а,д

7. ДНК-геномными вирусами являются следующие группы: а) герпесвирусы, б) оспавирусы, в) ортомиксовирусы, г) парамиксовирусы, д) ретровирусы

1) а,б,д; 2) а,б; 3) а,б,в,г,д; 4) а,б,в,г; 5) в,г,д

8. Структура вириона вируса гриппа: а) суперкапсидная оболочка, б) белковый капсид, в) однонитевая +РНК, фрагментированная, г) однонитевая –РНК, фрагментированная, д) однонитевая РНК, кольцевая.

1) а,б,в; 2) а,б,г; 3) а,б,д; 4) б,д; 5) б,в

9. Какие типы симметрии встречаются в организации нуклеокапсидов вирусных частиц? а) кубическая, б) спиральная, в) смешанная, г) асимметричная, д) двусторонняя.

- 1) а, б, в; 2) а, б, в, г; 3) а, б, в, г, д; 4) в, г, д; 5) а, б

10. Каким образом можно выявить наличие вируса в зараженной культуре клеток? а) по цитопатическим изменениям клеток, б) по способности эритроцитов адсорбироваться на ЦПМ инфицированных клеток, в) обнаружением вирусных белков в монослое инфицированных клеток, г) по реакции вирусной гемагглютинации, д) при электронной микроскопии.

- 1) а, б, в, г, д; 2) а, г, д; 3) а, б, в, д; 4) а, в, д; 5) а, в, г

11. К серологическим реакциям относятся: а) РСК (реакция связывания комплемента); б) РНГА (реакция непрямой гемагглютинации); в) реакция вирусной гемагглютинации; г) реакция преципитации; д) ПЦР (полимеразная цепная реакция).

- 1) б, г, д; 2) а, в, г; 3) б, в, д; 4) а, б, г; 5) в, г, д

12. В диагностике вирусных инфекций применяют методы: а) вирусологический; б) микроскопический; в) серологический; г) аллергический; д) бактериологический.

- 1) в, г, д; 2) а, б, в; 3) а, г, д; 4) б, в, г; 5) б, г, д

13. Характерными свойствами вирусов являются: а) наличие одного типа нукleinовой кислоты; б) способность синтезировать экзотоксины; в) абсолютный паразитизм; г) отсутствие собственного белоксинтезирующего аппарата; д) дизъюнктивный способ reproduction.

- 1) а, б, д; 2) а, в, г, д; 3) б, в, г, д; 4) б, в, д; 5) б, г, д

14. В состав сложных вирусов входят: а) капсид; б) суперкапсид; в) нукleinовая кислота; г) матриксный белок; д) рибосомы.

- 1) а, б, в, г; 2) б, в, г, д; 3) а, в, г, д; 4) б, г, д; 5) в, г, д

15. Пассивный искусственный иммунитет формируется при использовании следующих препаратов: а) химических вакцин; б) генноинженерных вакцин; в) антитоксических сывороток; г) противовирусных иммуноглобулинов; д) бифидумбактерина.

- 1) а, б; 2) а, д; 3) а, б, д; 4) б, в, г; 5) в, г

16. Какое утверждение относительно вирусов верно? а) вирусы, инфицирующие бактерии, называются бактериофагами, б) вирусные частицы обычно не видны в световом микроскопе, в) вирусы способны к делению, г) вирусы обладают генетической информацией, кодирующей синтез метаболической энергии, д) вирусы

являются субмикроскопическими облигатными внутриклеточными паразитами.

- 1) а,б,д; 2) а,в,д; 3) а,б,г; 4) б,г; 5) в,д

17. Все следующие группы вирусов имеют суперкапсидную оболочку: а) пикорнавирусы, б) ортомиксовирусы, в) парамиксовирусы, г) ретровирусы, д) бактериофаги.

- 1) а,б,в,г; 2) а,б,в,г; 3) а,г,д; 4) б,в,г; 5) б,в,г,д

18. Минус-геномную РНК содержат следующие группы вирусов: а) пикорнавирусы, б) ортомиксовирусы, в) рабдовирусы, г) герпесвирусы, д) паповавирусы.

- 1) а,б,в; 2) б,в; 3) б,в,г,д; 4) а,д; 5) а,б,г,д

19. Структура вириона вируса бешенства: а) диплоидный РНК-геном, б) -РНК геном, в) +РНК геном, г) суперкапсидная оболочка, д) капсид.

- 1) а,г,д; 2) б,г,д; 3) в,г,д; 4) а,д; 5) а,г,д

20. Какие варианты нуклеиновых кислот могут присутствовать в вирусном геноме?

а) несегментированная двунитевая ДНК, б) двунитевой гибрид ДНК-РНК, в) сегментированная двунитевая РНК, г) сегментированная двунитевая ДНК, д) однонитевая РНК.

- 1) а,б,в,г,д; 2) а,в, г, д; 3) а,б,в,д; 4) а,г,д; 5) а,в,д

*Выберите один правильный ответ:*

1. Сущность научного открытия Д.И.Ивановского:

1) создание первого микроскопа; 2) открытие вирусов; 3) открытие явления фагоцитоза; 4) получение антирабической вакцины; 5) открытие явления трансформации.

2. Темнопольная микроскопия применяется для изучения:

1) кишечной палочки; 2) риккетсий; 3) стафилококка; 4) хламидий; 5) бледной трепонемы.

3. В качестве исследуемого материала для серологической диагностики (определение титра антител) используют:

- 1) гной; 2) сыворотку крови; 3) мочу; 4) мокроту; 5) желчь.

4. Какой метод используют для стерилизации сыворотки крови:

1) стерилизация воздействием ионизирующей радиации; 2) стерилизация паром под давлением; 3) стерилизация сухим жаром; 4) фильтрование с помощью мембранных фильтров; 5) стери-

лизация УФ-облучением.

5. Применение какого вакцинного препарата связано с формированием стойкого местного иммунитета:

1) рекомбинантная вакцина против гепатита В; 2) полисахаридная менингококковая вакцина; 3) противогриппозная сплит-вакцина; 4) вакцина холерная химическая; 5) пероральная трехвалентная полиомиелитная вакцина.

6. Выберите из перечисленных вакцинных препаратов, препарат относящийся к группе лечебных вакцин:

1) АКДС; 2) БЦЖ; 3) гонококковая вакцина; 4) гриппозная вакцина; 5) сибирякская вакцина.

7. Какие вирусы содержат в составе вириона обратную транскриптазу:

1) парамиксовирусы; 2) ретровирусы; 3) реовирусы; 4) адено-вирусы; 5) энтеровирусы.

8. Простой вирус имеет:

1) один нуклеокапсид; 2) два нуклеокапсида; 3) три нуклеокапсида; 4) четыре нуклеокапсида.

9. Вирусы характеризуются:

1) клеточной формой строения; 2) органной формой строения; 3) организменная форма строения; 4) неклеточной формой строения.

10. Генетический аппарат бактериофага чаще представлен:

1) двунитчатой дезоксирибонуклеиновой кислотой; 2) однодуплексной дезоксирибонуклеиновой кислотой; 3) рибонуклеиновой кислотой; 4) рибонуклеиновой и дезоксирибонуклеиновой кислотой.

11. Порядок расположения капсомеров у вирусов называется:

1) симметрией; 2) презентацией; 3) капсидом; 4) суперкапсидом.

12. Явление бактериофагии впервые изучил:

1) Р.Кох; 2) Д.И.Ивановский; 3) Ф. Эррель; 4) А.Флеминг.

13. Величину вирусов выражают в:

1) микрометрах; 2) ангстремах; 3) сантиметрах; 4) нанометрах.

14. Для изучения строения вирусов используется:

1) темнопольная микроскопия; 2) фазово-контрастная микроскопия; 3) электронная микроскопия; 4) микроскопия в затемненном поле.

15. Суперкапсид вируса представлен:

1) фосфолипидной мембраной со встроенными гликопротеинами; 2) фосфолипидной мембраной, лишенной белковых компонентов; 3) белками отличными от мембранных клетки; 4) гликопротеинами.

16. Геном вируса, встроенный в клеточный называется:

- 1) линейным; 2) кольцевым; 3) провирусным; 4) фрагментарным

17. Бактериофаг это:

- 1) клетка; 2) бактерия; 3) вирус; 4) простейшее

18. В зависимости от формы бактериофаги бывают:

1) нитевидные; 2) кубические; 3) с отростком; 4) все перечисленное.

19. Капсидные белки характеризуются:

1) устойчивостью к протеолитическим ферментам; 2) способностью к самосборке; 3) специфичностью; 4) всем перечисленным.

20. Фермент, обеспечивающий проникновение бактериофага в клетку:

- 1) лизоцим; 2) пепсин; 3) нуклеаза; 4) рестриктаза.

21. Клетку бактерии, в которой ее геном соединен с геном бактериофага называют:

- 1) вирионом; 2) профагом; 3) бактериофагом; 4) полифагом.

22. Изменение свойств бактерий под действием профага:

1) фаговая индукция; 2) фаговая конверсия; 3) биоконверсия; 4) адаптация.

23. Наибольшее разведение фага, вызывающего лизис чувствительных бактерий:

1) индексом фага; 2) максимальным разведением; 3) титром фага; 4) оптимальным разведением.

24. При производстве бактериофага контролируют показатели:

1) безвредности; 2) литической активности; 3) стерильности; 4) все перечисленное.

25. Вирулентность бактериофага определяется методом:

1) Аппельмана; 2) Грамма; 3) микроскопирования; 4) многократного пассивирования.

26. Метод ПЦР разработал:

- 1) Ф. Эррель; 2) А. Флеминг; 3) К. Муллис; 4) Л. Пастер.

27. При ПЦР диагностике отсутствует этап:

- 1) элонгации; 2) репликации; 3) отжига; 4) денатурации.

28. Для заражения куриных эмбрионов используют:

- 1) 1-2 дневные эмбрионы; 2) 5-10 дневные эмбрионы; 3) 6-7

дневные эмбрионы; 4) 14 дневные эмбрионы.

29. Для обнаружения вирусных антигенов используют:

- 1) РСК; 2) РИФ; 3) РНГА; 4) ПЦР

30. Метод прямой иммунофлюоресценции подразумевает определение:

1) размеров и жизнеспособности вирусов; 2) приготовление мазка-отпечатка из материала больного; 3) исследование сыворотки больного; 4) нанесение антител к вирусу.

31. Перевиваемые культуры отличаются:

1) большим диапазоном чувствительности ко многим вирусам; 2) эмбриональным происхождением; 3) ограниченным числом пассажей; 4) диплоидностью кариотипа.

32. Для видовой идентификации вирусов применяют критерии:

1) сходство в составе генома и АГ свойства; 2) круг естественных хозяев и способ передачи; 3) тропность к тканям и цитопатология; 4) все перечисленное.

33. При цитолитической вирусной инфекции клетка гибнет:

1) после первого цикла репродукции; 2) после двух циклов репродукции; 3) после нескольких циклов репродукции; 4) при слабой выраженности ЦПД.

34. Сохранению вирусов в патматериале способствует:

1) температура 4°C; 2) температура 8°C; 3) температура 0°C; 4) температура -45°C.

35. К молекулярно-генетическим методам диагностики относятся: а) полимеразная цепная реакция (ПЦР); б) ДНК-ДНК-гибридизация; в) латекс-агглютинация; г) реакция связывания комплемента (РСК); д) реакция непрямой гемагглютинации (РНГА).

## **Темы докладов с презентациями**

1. Диагностические иммунологические реакции, применяемые в вирусологических исследованиях.
2. Разнообразие бактериофагов. Бактериофаги бактерий *E. coli*.
3. Вирусы – объекты молекулярной генетики.
4. Основные систематические группы вирусов, патогенных для беспозвоночных животных.
5. Основные систематические группы вирусов, патогенных для позвоночных животных.
6. Приспособление вирусов к внутриклеточному паразитизму.
7. Связь структуры вирусов с особенностями организации клетки
8. Прионы: белки или живые организмы?
9. Вирусы цианобактерий и водорослей: видовое разнообразие, особенности строения и жизненного цикла и адаптация к хозяину.
10. Вирусы простейших: видовое разнообразие, особенности строения и жизненного цикла, адаптация к хозяину.
11. Вирусы грибов: видовое разнообразие, особенности строения и жизненного цикла, адаптация к хозяину.
12. Характеристика семейства Retroviridae (вирус иммунодефицита человека).
13. Характеристика семейства Herpesviridae.
14. Арбовирусные инфекции.
15. Энтеровирусы и ротавирусы (возбудители острых кишечных инфекций)
16. Характеристика семейства Picornaviridae (вирус ящура).
17. Характеристика семейства Rhabdoviridae (вирус бешенства).
18. Характеристика семейства Bunyaviridae.
19. Характеристика семейства Filoviridae (вирус Эбола, вирус Марбург)
20. Характеристика семейства Poxviridae (вирусы оспы).
21. Прогнозирование и моделирование вирусных инфекций.

## СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ (ГЛОССАРИЙ)

**Автоселекция** – процесс постепенного вытеснения менее приспособленных форм микроорганизмов более приспособленными.

**Аденовирусные инфекции** – инфекции, вызываемые адено-вирусами: острые респираторные инфекции, инфекции нижних дыхательных путей (пневмония, бронхит), фарингиты, фарингоконъюнктивиты, конъюнктивиты, эпидемические кератоконъюнктивиты, гастроэнтериты, геморрагические циститы, менингоэнцефалиты, цервициты и уретриты. Перенесённое заболевание оставляет непродолжительный типоспецифический иммунитет.

**Аденовирусы (Adenoviridae)** – семейство ДНК-геномных вирусов. Нуклеокапсид представляет собой сферические частицы диаметром 70–90 нм. Внешняя оболочка отсутствует. Геном состоит из линейной двунитевой ДНК.

**Анатоксин** – это бактериальный экзотоксин, потерявший токсичность в результате длительного воздействия формалина, но сохранивший антигенные свойства.

**Аэротенк** – смеситель-резервуар для очистки сточных вод.

**Бактериофаги (фаги)** – вирусы бактерий, специфически проникающие в бактерии, паразитирующие в них вплоть до гибели (лизиса) бактериальной клетки. На основании формы и строения вириона различают пять морфологических типов бактериофагов: нитевидные, сферические, с коротким отростком, с длинным несокращающимся отростком, с длинным отростком, футляр которого сокращается. Первый тип содержит однонитчатую РНК, второй – однонитчатую ДНК или РНК, у остальных геном представлен двунитчатой ДНК. Размеры головки крупных фагов – 50–90 нм, мелких – 20–30 нм, длина отростка от 100 до 200 нм. В зависимости от типа вызываемой у бактерии инфекции бактериофаги делят на вирулентные и умеренные. Вирулентные бактериофаги взаимодействуют с бактериями по продуктивному типу, в результате чего образуется новая генерация фагов. Умеренные бактериофаги вызывают лизогенную инфекцию, которая состоит в интеграции геномов бактерий и лизогенного фага.

**Барда** – отход производства спирта.

**Бешенство** – вирусная инфекционная болезнь, вызываемая рабдовирусом бешенства. Развивается после укуса или ослонения

раны инфицированным животным. Поражаются нейроны ЦНС с развитием симптомов возбуждения, параличом дыхательной и глотательной мускулатуры. Развиваются гидрофобия, аэрофобия, фотофобия, акустофобия, галлюцинации. Болезнь заканчивается летально.

**Библиотека генома** – набор клонированных фрагментов ДНК, содержащий весь геном.

**Биобезопасность** – состояние защищенности человека, общества, цивилизации и окружающей среды от вредного, опасного для жизни и здоровья человека воздействия токсических и аллергенных биологических веществ и соединений, содержащихся в природных или генно-инженерно-модифицированных биологических объектах и полученных из них продуктах.

**Биогенез** – образование органических соединений живыми организмами.

**Биомасса** – общая масса особей одного вида, группы видов или сообщества в целом на единицу поверхности или объема местообитания.

**Биологический агент** (штамм – продуцент целевого продукта) – активное начало и основа любого биотехнологического производства, физиолого-биохимические характеристики и свойства которого определяют в конечном итоге эффективность всего биотехнологического процесса.

**Биореактор** – закрытая или открытая емкость, в которой при определенных условиях протекает на клеточном уровне контролируемая реакция, осуществляемая с помощью микроорганизмов.

**Бляшки** – зоны монослоя культуры клеток («стерильные пятна»), повреждённые вирусом или свободные от бактерий зоны среди сплошного роста бактерий на поверхности питательной среды, вызванные литическим действием бактериофага.

Бляшкообразование в культуре клеток

**Вакцины** – это препараты, приготовленные из убитых или ослабленных болезнетворных микроорганизмов или их токсинов.

**Вектор** – самореплицирующаяся (автономная) молекула ДНК, используемая в генной инженерии для переноса генов и других последовательностей от организма-донора в организм-реципиент, а также для клонирования нуклеотидных последовательностей.

**Вектор** – молекула ДНК, способная переносить в клетку чужеродную ДНК любого происхождения и обеспечить там ее раз-

множение.

**Виреmia** – фаза патогенеза вирусных инфекций, состоящая в циркуляции вирусов в крови.

**Вирионы** – внеклеточная покоящаяся форма вирусов, которая выполняет функцию переноса генома вирусов из одной клетки в другую или из одного организма в другой.

**Вирогения** – длительное сосуществование вирусов и их хозяев, которое характеризуется встраиванием (интеграцией) вирусной ДНК в виде провируса в хромосому клетки.

**Вироиды** – молекулы РНК, возбудители инфекционных болезней растений. Не имеют генетического кода. Им присущи наследственная изменчивость и адаптация к условиям обитания.

**Виропексис** – процесс проникновения вируса в клетку хозяина.

**Вирус гепатита С (HCV)** – относится к семейству Flaviviridae роду Нерасивирус. HCV сложный вирус сферической формы (диаметр 30–60 нм). Геном представлен однонитчатой позитивной РНК. Вызывает одну из форм парентерального (трансфузационного) гепатита.

**Вирус гепатита D (HDV)** – дельта-вирус – дефектный гепатит В-ассоциированный вирус. Вирионы размером 32 нм содержат однонитчатую РНК, белковый капсид и суперкапсид.

**Вирус гепатита Е (HEV) и Вирус гепатита G (HGV)** – относятся к семейству Caliciviridae роду Нерасивирус. Это простые РНК-геномные вирусы сферической формы (диаметр 35–40 нм).

**Вирус гепатита А (HAV)** – энтеровирус, вызывает у человека инфекционный гепатит, относится к семейству Picornaviridae роду Нератовирус. Это РНК-содержащий вирус, просто организованный, имеет диаметр 27–28 нм. Вирус гепатита А обладает гепатотропизмом. Относительно устойчив во внешней среде.

**Вирус гепатита В (HBV)** – относится к семейству гепаднавирусы (Hepadnaviridae) роду Orthohepadnavirus. HBV сложноорганизованный ДНК-содержащий вирус сферической формы (диаметр 42–47 нм). Отличается высокой устойчивостью к факторам окружающей среды. Развитие инфекционного процесса наступает при попадании вируса в кровь. Заражение происходит при парентеральных манипуляциях.

**Вирус кори** – РНК-содержащий вирус семейства Paramyxoviridae рода Morbillivirus (латинское название болезни –

*morbilli*). Имеет сферическую форму, диаметр 150–250 нм. Геном представлен однонитевой нефрагментированной минус РНК. В отличие от других парамиксовирусов не имеет нейраминидазы. Поражает эндотелий кровеносных капилляров, обуславливая появление сыпи.

**Вирус краснухи** – относится к семейству Togaviridae роду Rubivirus. Название происходит от латинского *rubrum* – красный, что связано с покраснением кожи у больных. Сложный вирус, имеет сферическую форму, диаметр 60–70 нм. Геном представлен однонитчатой плюс-нитевой РНК. Неустойчив в окружающей среде.

**Вирус табачной мозаики (ВТМ)** – простой нитевидный вирус, содержащий инфекционную РНК. Вызывает мозаичную болезнь табака.

**Вирусные инфекции** – инфекции животных, включая человека, растений, и бактерий, вызываемые вирусами. Главные особенности вирусных инфекций – строгий внутриклеточный паразитизм вирусов, их метаболическая, энергетическая и экологическая зависимость от клетки-хозяина, строгий цитотропизм. При вирусных инфекциях в результате нарушения целости и снижения напряжённости естественного иммунитета обычно в период вторичного очагового размножения вирусов происходит присоединение вторичной инфекции, вызванной условно-патогенными бактериями или грибами. Может наступить активация латентно протекающих инфекционных процессов. Возбудители вирусных инфекций могут оказать тератогенное, мутагенное, онкогенное действие, привести к развитию иммунодефицита, аутоиммунных болезней.

**Вирусология** – наука о морфологии, физиологии, генетике, экологии и эволюции вирусов. Медицинская вирусология исследует вирусы-паразиты человека, их роль в этиологии и патогенезе инфекционных и опухолевых болезней, разрабатывает специальные методы диагностики, способы этиотропной терапии и специфической профилактики.

**Вирусы** – неклеточные формы жизни, обладающие собственным геномом, способностью к воспроизведению в клетках живых организмов или клеточных культурах, адаптационными свойствами и изменчивостью. Отличаются от остальных микробов отсутствием самостоятельных белоксинтезирующих и энергию генерирующих систем, выраженным цитотропизмом и облигатным внутриклеточным паразитизмом.

**Вирусы Коксаки** – РНК-содержащие вирусы семейства Picornaviridae рода Enterovirus. Вирусы названы по населённому пункту в США, где они были впервые выделены. Выделяют группы А и В. Вирусы Коксаки А вызывают у человека герпангину, пузырчатку в полости рта, полиомиелитические заболевания, диарею у детей; вирусы Коксаки В – параполиомилит, энцефалит, миокардит, плеврдинию (болезненные приступы в области груди, лихорадка, иногда плеврит) и другие болезни.

**Вирусы-помощники** – вирусы, геном которых содержит информацию, необходимую для размножения вирусов-сателлитов.

**Вирусы-сателлиты** – дефектные вирусы, размножающиеся в присутствии вирусов-помощников.

**Включения вирусные** – полиморфные, размерами в 0,5-10 мкм новообразования, которые появляются в ядре или цитоплазме клеток-хозяев в процессе продуктивной вирусной инфекции. Представляют собой скопления простых и сложных вирионов или продуктов их распада, агрегаты капсидного белка. Выявляют в световом микроскопе. Имеют диагностическое значение.

**Генетика вирусов** – генетический аппарат вирусов представлен одной из 4 молекул нуклеиновой кислоты: одно- и двунитчатой РНК, одно- и двунитчатой ДНК. Большинство вирусов имеют один цельный или фрагментированный геном линейной или замкнутой формы. Ретровирусы имеют 2 идентичных по составу генома. Геном содержит от 3 до 150 генов. Гены разделяются на структурные, кодирующие синтез белков, которые входят в состав вириона, и функциональные, меняющие метаболизм клетки-хозяина и регулирующие скорость репродукции вируса. Однонитчатые геномы имеют две полярности: позитивную, когда нуклеиновая кислота одновременно служит и матрицей для синтеза новых геномов и иРНК, и негативную, выполняющую только функцию матрицы. Геном вируса подвержен изменениям путём мутаций, рекомбинаций, негенетических взаимодействий.

**Генетический код (ГК)** – система записи наследственной информации в виде последовательности нуклеотидов в молекулах нуклеиновых кислот. Единицей ГК служит кодон, или триплет (тринуклеотид). ГК определяет порядок включения аминокислот в синтезирующуюся полипептидную цепь.

**Генетический риск** – возможность проявления непредсказуемых, опасных для здоровья и жизни человека и для окружающей

среды наследственных изменений генома и качества организма.

**Генная инженерия** – совокупность приемов, методов и технологий, в том числе технологий получения рекомбинантных рибонуклеиновых и дезокси-рибонуклеиновых кислот, по выделению генов из организма, осуществлению манипуляций с ними и введению их в другие организмы.

**Генно-инженерная деятельность** – деятельность ученых, специалистов, научных организаций и государственных органов, направленная на получение, испытание, транспортировку и использование генетически модифицированных организмов (ГМО) и полученных из них продуктов.

**Геном** – совокупность генов, содержащихся в гаплоидном (одинарном) наборе хромосом и в нехромосомных генах, расположенных в органеллах протоплазмы данного организма. Диплоидные организмы содержат два генома – отцовский и материнский.

**Геномы вирусные** – совокупность генетической информации, закодированная либо в РНК, либо в ДНК вирусов. Организация вирусных геномов вариабельна.

**Генотерапия** – лечение наследственных болезней с помощью введенных в геном реципиента чужеродных генов или вживление полноценных генетических соматических клеток в ткани биологического объекта.

**Гепатит А (болезнь Боткина)** – острая инфекционная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, преимущественным поражением печени, интоксикацией, иногда желтухой и отличающаяся склонностью к эпидемическому распространению. Вызывается вирусами гепатита А. Антропоноз. Приобретённый иммунитет длительный.

**Гепатит В** – антропонозная инфекция, вызываемая гепаднавирусом, преимущественно с парентеральным механизмом заражения, которая может протекать в форме вирусного носительства, острой и хронической форм и характеризуется поражением печени с возможным развитием острой печёночной недостаточности, хронического гепатита, цирроза печени и первичного рака печени (гепатоцеллюлярной карциномы).

**Гепатит С** – антропонозное заболевание, вызываемое вирусами гепатита С, передающееся парентерально и протекающее в виде посттрансфузионного гепатита преимущественно в безжелтушной и лёгкой форме, склонное к хронизации процесса.

**Гепатиты вирусные** – группа болезней с преимущественным поражением печени и развитием синдрома интоксикации, сопровождающегося нарушением её функции и желтухой, которые вызывают антропонозные вирусы.

**Герпесвирусы (Herpesviridae)** – семейство крупных сложных ДНК-вирусов – паразитов млекопитающих, пресмыкающихся, рыб, вызывающие разнообразные инфекции. Название происходит от греческого слова *herpes* – ползучий. Вирионы имеют сферическую форму, диаметр 120–150 нм. Чувствительны к факторам окружающей среды. Семейство включает 3 подсемейства, отличающихся по структуре генома, тканевому тропизму, цитопатологии и локализации латентной инфекции.

**Герпетическая инфекция** – хроническое рецидивирующее антропонозное заболевание, вызываемое вирусами простого герпеса 1-го и 2-го типов, протекающее как в локализованных формах с везикулярными высыпаниями на коже и слизистых оболочках, так и в генерализованных – с полиорганными поражениями. Герпетическая инфекция характеризуется поражением кожи и слизистых, ЦНС, глаз, внутренних органов и протекает, как правило, латентно с рецидивами.

**Гибридные вирусы** – вирусы со смешанным геномом, образовавшимся в результате межмолекулярной гибридизации.

**Грипп** – острая вирусная инфекция, характеризующаяся выраженной интоксикацией и поражением верхних дыхательных путей, способная распространяться в виде эпидемий и даже пандемий. Вызывается ортомиксовирусами А, В и С. Часты бактериальные осложнения.

**Дезинтеграция вирусов** – распад вириона на составные части, наступающий в процессе вирусной инфекции клетки или под действием физических факторов, противомикробных веществ.

**Депротеинизация** – стадия вирусной инфекции клетки, состоящая в освобождении вируса от капсида и суперкапсида с помощью протеаз хозяина.

**Дефектные вирионы** – вирусы, лишенные части генетического материала. Накапливаются в популяции многих вирусов при множественном заражении клеток.

**Дефектные вирусы** – виды вирусов, не имеющие полной генетической информации для самовоспроизведения. Размножение их происходит в присутствии вирусов-помощников (например, ви-

рус гепатита D репродуцируется только в присутствии вируса гепатита B).

**ДНК-вирусы** – вирусы, геном которых построен из одно- или двунитчатой ДНК.

**ДНК-лигаза** – фермент «сшивающий» участки молекулы ДНК.

**Жёлтая лихорадка** – острое вирусное природно-очаговое заболевание, которое передаётся с укусами комаров, характеризуется острым, внезапным началом, высокой лихорадкой, геморрагическим синдромом, желтухой и острой печёночно-почечной недостаточностью. Вирус жёлтой лихорадки относится к семейству flaviviruses.

**Зарождение смешанное** – проникновение в клетку и размножение в ней двух или более вирусов, относящихся к разным видам или разным серотипам одного вида. Может привести к возникновению рекомбинантов или гибридов.

**Зоовирусы** – вирусы-паразиты животных.

**Идентификация вирусов** – лабораторный процесс определения систематического положения неизвестного штамма вирусов вплоть до вида или варианта.

**Изменчивость вирусов** – изменение фенотипа или генотипа вирусов. Фенотипическая изменчивость связана с включением в состав суперкапсида липо- и гликопротеинов хозяина. Мутационный процесс носит спонтанный и индуцированный характер, он протекает с высокой частотой (особенно у вирусов с РНК-геномом), захватывает многие признаки. Генетические рекомбинации происходят в процессе смешанной инфекции клетки-хозяина. Они возникают в результате физической интеграции частей разных вирусных геномов или временного использования одним вирусом белка, кодируемого другим вирусом.

**Изометрические вирусы** – вирусы, капсид которых построен по кубоидальному типу симметрии. Имеют форму многогранников, чаще икосаэдра.

**Иммобилизация** – перевод ферментов в нерастворимое состояние.

**Иммунитет противовирусный** – совокупность защитно-адаптационных реакций, направленных на защиту организма от повреждающего действия вирусов. Внутриклеточные формы вируса вызывают цитотоксический вариант клеточного иммунного ответа,

который направлен против инфицированных вирусом клеток. Внеклеточная форма вируса индуцирует гуморальный иммунный ответ. Образовавшиеся в результате его антитела блокируют прикрепление вирионов к мембранам восприимчивых клеток и снижают их токсическое действие.

**Иммуногенность** – свойство антигена вызывать иммунный ответ.

**Иммуноферментный метод** – выявление антигенов или антител с помощью соответствующих им антител, конъюгированных с ферментом-меткой. Образовавшийся иммунный комплекс выявляют с помощью фотометрического измерения оптической плотности окрашенных продуктов, которые образуются в результате ферментативного расщепления субстрата ферментом. Иммуноферментный анализ применяют для серологической диагностики инфекционных болезней, в частности СПИДа, вирусных гепатитов и других.

**Индикация вирусов** – лабораторный процесс установления присутствия вирусов в исследуемом материале или в системе культивирования вирусов. Осуществляется путём электронной микроскопии, выявления ЦПД, образования включений, реакциями гемагглютинации, гемадсорбции, присутствия бляшек в культуре клеток под агаровым покрытием.

**Интегральные инфекции** – инфекции, при которых геном возбудителя встраивается в геном восприимчивых клеток хозяина (например, СПИД, гепатит В и другие).

**Интеграция** – включение вирусной нуклеиновой кислоты в хромосомную ДНК клетки-хозяина. Характерна для ретровирусов, умеренных фагов, вируса гепатита В.

**Интерфероногены** – факторы, индуцирующие синтез интерферонов клетками позвоночных животных. Такими свойствами обладают вирусы, некоторые виды бактерий, актиномицетов.

**Интерфероны** – группа белковых веществ, вырабатываемых зараженными вирусами.

**Интерфероны** – низкомолекулярные белки позвоночных, обладающие противовирусной активностью. Различают три класса интерферонов: 1) альфа-интерферон – лейкоцитарный; 2) бета-интерферон – фибробластный; 3) гамма-интерферон – иммунный. Препараты интерферона применяют для профилактики и лечения вирусных и опухолевых заболеваний.

**Инфекционность вирусных нуклеиновых кислот** – пози-

тивные вирионные однонитчатые РНК и ДНК одновременно выполняют функцию матрицы синтеза новых геномов и функцию иРНК. Введение таких нуклеиновых кислот приводит к развитию инфекции и образованию новой генерации вирусов.

**Инфекционный мононуклеоз** – лимфопролиферативная болезнь, характеризующаяся интоксикацией, поражением нёбных и глоточных миндалин, увеличением лимфатических узлов, печени, селезёнки, изменениями в крови. Возбудителем является вирус Эпштейна-Барр.

**Инфекция (инфекционный процесс)** – совокупность физиологических и патологических восстановительно-приспособительных реакций, возникающих в восприимчивом макроорганизме при определённых условиях окружающей среды в результате его взаимодействия с проникшими и размножающимися в нём патогенными или условно-патогенными бактериями, вирусами и грибами.

**Инфицирование (заражение)** – внедрение и адаптация возбудителя в месте входных ворот инфекции.

**Источник инфекции** – микроносители или больные инфекционной болезнью люди, животные, неживые объекты, от которых возбудители заболеваний передаются здоровым людям и животным.

**Канцерогенность вирусов** – свойство вирусов превращать нормальную клетку в опухолевую. Характерно для онкогенных и некоторых инфекционных вирусов.

**Капсид вирусов** – белковая структура, в полости которой находится вирусный геном. Состоит из капсомеров, расположенных по спиральному или кубическому типу симметрии. Капсиды сложных вирусов выполняют функции стабилизации генома и его защиты от внешних повреждений, у простых вирусов, кроме того, рецепторную и ферментативную функции.

**Карантин** – комплекс административных и медико-санитарных мероприятий по предупреждению распространения карантинных болезней (особо опасных инфекций).

**Кератит герпетический** – воспаление роговой оболочки глаза, вызываемое а-герпесвирусами.

**Кератоконъюнктивит эпидемический** – воспаление конъюнктивы и склеры глаз, вызываемое адено-вирусами человека.

**Классификация вирусов** – вирусы выделены в самостоя-

тельное царство Vira вместе с вирусоподобными организмами – ви-роидами и прионами. Выделяют два подцарства: 1 – рибовирусы – РНК-геномные вирусы и 2 – дезоксирибовирусы – ДНК-геномные вирусы. РНК-вирусы объединены в семейства ортомиксо-, парамиксо-, пикорна-, тога-, рабдо-, flavи-, ретровирусов. Среди ДНК-вирусов представители семейства папова-, адено-, гепадна-, герпес-, поксивирусов. Семейства делятся на роды, роды – на виды, виды – на типы.

**Клонирование** – размножение в бактериальной клетке рекомбинантной молекулы ДНК.

**Кодон** – триплет нуклеотидов, кодирующий определенную аминокислоту или комплементарный терминирующую сигнал.

**Компетенция** – способность клетки, ткани, органа, организма воспринимать индуцирующее воздействие и специфически реагировать на него изменением развития.

**Контагиозность** – лёгкость, с которой возбудитель болезни передаётся от заражённого организма незаражённым.

**Контамианты вирусных суспензий** – рибосомы, мембранные, фитоферрины и другие частицы клеток, на которых культивируется вирус. Могут быть приняты за вирион.

**Корь** – острое высококонтагиозное заболевание детей, вызываемое морбиливирусом кори. Заражение происходит воздушно-капельным путём. Инкубационный период 9–11 дней. В катаральном периоде развивается конъюнктивит, ринит, фарингит, иногда диарея, на слизистой оболочке щеки появляются пятна. Для периода разгара характерны высокая температура, интоксикация, пятнисто-папулёзная сыпь. В периоде выздоровления возможны бактериальные осложнения. Перенесение болезни приводит к развитию напряжённого пожизненного иммунитета. Иммунитет также создаёт введением живой вакцины и коревого гамма-глобулина.

**Космиды** – плазмидные вектора, в которые встроен участок генома фага  $\lambda$ , обеспечивающий возможность упаковки этой молекулы ДНК в фаговую частицу. Фаговые частицы обеспечивают хорошее проникновение гибридной ДНК в клетку (путем инъекции), после чего происходит замыкание ДНК в кольцо по липким концам и репликация ее по плазмидному типу.

**Краснуха** – заболевание, вызываемое рубивирусом краснухи из семейства тогавирусов. Передаётся воздушно-капельным путём. Развиваются катар дыхательных путей, умеренная лихорадка, гене-

рализованное поражение лимфоидной ткани, полиморфная сыпь. Иммунитет стоек. При краснухе беременных поражается плод, что ведёт к его гибели или развитию уродств.

**Криоконсервация** – глубокое замораживание клеток.

**Культивирование вирусов** – проводят в культурах клеток, органных культурах, развивающихся куриных эмбриона, восприимчивых лабораторных животных.

**Культура клеток** – клетки какой-либо ткани животных, способные расти в виде монослоя в искусственных условиях на стеклянной или пластмассовой поверхности, залитой специальной питательной средой. Источником культуры клеток являются свежеполученные животные ткани – первичные культуры клеток; лабораторные штаммы клеток – перевиваемые культуры клеток. Культуры клеток применяют для выделения вируса из исследуемого материала, для накопления вирусной супензии, изучения свойств.

**Культуральная жидкость** – сложная смесь, состоящая из клеток штамма-продуцента, раствора непотребленных питательных компонентов и накопившихся в среде продуктов биосинтеза.

**Лаг-фаза** – медленный рост культуры в период адаптации.

**Лентивирусы (Lentivirinae)** – подсемейство ретровирусов.

**Лигаза** – фермент, «сшивающий» связи между геном и плазмидой с образованием ковалентных фосфо-эфирных связей.

**Лигирование** — образование фосфодиэфирной связи между двумя основаниями одной цепи ДНК, разделенными разрывом. Этот термин употребляют также в случае соединения тупых концов и при образовании связи в РНК.

**Лизогения** – явление интеграции генома умеренного фага с бактериальной хромосомой. Такие лизогенные бактерии обладают способностью передавать геном фага по наследству, производить в определённых условиях зрелый фаг, иммунны к суперинфекции гомологичным фагом.

**Лиофильное высушивание** – обезвоживание после замораживания.

**Липкий конец** – свободный одноцепочечный конец двухцепочечной ДНК, комплементарной одноцепочечному концу, принадлежащему этой же или другой молекуле ДНК.

**Лузга** – отход при производстве масла из семян подсолнечника.

**Маркер (ДНК)** – фрагмент ДНК известного размера, используемый для определения генетического материала.

зумный для калибровки фрагментов в электрофоретическом геле.

**Маркерный ген** – ген, идентифицированный по месту расположения и имеющий четкое фенотипическое проявление.

**Медленные инфекции** – группа персистирующих инфекций, характеризующаяся длительным инкубационным периодом, медленным прогредиентным течением, тяжёлыми дегенеративными поражениями преимущественно нервной системы, высокой летальностью. К вирусным медленным инфекциям относят подострый пансклерозирующий энцефалит, вызываемый вирусом кори; прогрессирующую врождённую краснуху; подострый герпетический энцефалит; хронический инфекционный мононуклеоз; медленную форму гепатита В. К медленным инфекциям человека, вызываемым прионами, относят куру, болезнь Крейтцфельдта-Якоба, амиотропический лейкоспонгиоз.

**Мезга** – отход производства крахмала, соков и т.д.

**Меласса** – отход производства сахара.

**Менингит** – воспаление мягкой мозговой оболочки спинного или (и) головного мозга. Вызывается вирусами (серозный) или бактериями и грибами (гнойный).

**Модификация продукта** – перестройка полученных соединений животного, растительного или микробного происхождения с целью придания им специфических свойств.

**Негативные бляшки** – островки из выживших клеток среди поражённого вирусом монослоя культуры клеток.

**Нейраминидаза** – фермент, который разрывает связь между нейраминовой кислотой и другими моносахаридами, входящими в состав гликопротеидов, ганглиозидов, олигосахаридов. Нейраминидаза входит в состав суперкапсидов вирусов гриппа, где выполняет функцию разрушения рецепторов восприимчивых клеток и выхода вирусного потомства из клетки хозяина. Антигенные специфичности нейраминидазы неодинаковы. У вируса гриппа А обнаружено 10 вариантов. Нейраминидаза используется для идентификации вирусов и создания противовирусных вакцин.

**Нейротропность** – свойство преимущественного размножения вирусов в клетках нервной системы, обусловленное постоянным присутствием на их поверхности рецепторов, комплементарных рецепторам вирусов.

**Нейтрализация вирусов** – утрата вирусами инфекционной активности в результате действия каких-либо факторов, например,

Ат.

**HTLV-I и HTLV-II-вирусы** – Т-лимфотропные вирусы из подсемейства онкорнавирусов – возбудители Т-клеточных лейкозов человека.

**Нуклеокапсид** – структура вириона, состоящая из нуклеоида и окружающего его капсида.

**Обратная транскриптаза (ревертаза)** – фермент, осуществляющий образование ДНК-копии у РНК-геномных вирусов.

**Онкогенность вирусов** – РНК- и ДНК-геномные вирусы, вызывающие развитие злокачественных опухолей.

**Онкогены** – гены или совокупность генов, включённых в вирусный или клеточный геном, продукты которых могут вызывать опухолевую трансформацию клеток.

**Оппортунистические инфекции** – инфекции, вызываемые оппортунистическими микроорганизмами у людей с иммунодефицитами.

**ОРВИ** – группа острых респираторных вирусных заболеваний человека, вызываемых представителями семейств и родов ортомиксо-, парамиксо-, руби-, рино- корона-, адено- и герпесвирусов. Характеризуется вирусной этиологией, острым течением, поражением органов дыхания, воздушно-капельным путём передачи, массовым распространением.

**Органные культуры** – небольшие фрагменты органов животных, культивируемые на поверхности плотной или жидкой питательной среды. Используют для культивирования и изучения вирусов.

**Ортомиксовирусы (Orthomyxoviridae)** – семейство сложных РНК-геномных вирусов, обладающих тропизмом к дыхательным путям млекопитающих и птиц. Дифференцируют на инфлюензивирусы А и В и вирус гриппа С. Вирионы имеют сферическую форму, размеры 80–120 нм. Геном представлен негативной однонитчатой нуклеиновой кислотой, состоящий у А вирусов из 8 фрагментов. Капсид построен по спиральному типу. На поверхности вириона располагаются 2 типа белковых выступов: гемагглютинин и нейраминидаза. Гены, контролирующие синтез этих белков, высоко мутабельны, а в случаях смешанной инфекции подвержены перераспределению фрагментов генома, что ведёт к частой и выраженной изменчивости вирусов гриппа А.

**Оспа натуральная** – острое особо опасное заболевание чело-

века. В результате международных усилий под эгидой ВОЗ вирус натуральной оспы как вид и натуральная оспа как болезнь ликвидированы в конце 70-х годов XX века.

**Папаин** – фермент, получаемый из продуктов папайи.

**Папилломавирусы (Papillomavirus)** – род семейства паповавирусов. Размеры вириона около 55 нм. Размножается в ядре клеток-хозяев. Большинство представителей обладает онкогенными свойствами и вызывает доброкачественные или злокачественные опухоли (папилломы). Доказана этиологическая роль папилломавирусов в развитии широко распространённого, передающегося половым путём рака шейки матки.

**Паповавирусы (Papovaviridae)** – семейство мелких, размером 45–55 нм, простых ДНК-геномных вирусов, обладающих онкогенными свойствами. Геном представлен двунитчатой ДНК, капсид построен по кубическому типу. Суперкапсид отсутствует.

**Парагрипп** – острое, широко распространённое заболевание человека, вызываемое вирусами парагриппа из семейства парамиксовирусов. Протекает по типу гриппа или локальных поражений отдельных отделов респираторного тракта.

**Парамиксовирусы (Paramyxoviridae)** – семейство сложных РНК-геномных вирусов, обладающих тропизмом к респираторному эпителию. Геном парамиксовирусов представлен линейной цельной однонитчатой минус-молекулой РНК, связанной с вирусной полимеразой. Капсид построен по спиральному типу и окружён мембраной, 2 слоями липидов. На поверхности вириона располагаются гликопротеидные пепломеры, выполняющие функцию гемагглютинина и нейраминидазы, а также гемолиза и слияния клеток (F-фактор). Вирионы имеют сферическую форму, размеры варьируют от 120 до 300 нм. В семейство входят роды парамиксовирусов, пневмовирусов, морбиливирусов.

**Парвовирусы (Parvoviridae)** – семейство мелких простых ДНК-геномных вирусов. Геном представлен небольшой однонитчатой молекулой ДНК. Вирионы имеют форму икосаэдра, размеры 18–26 нм. Суперкапсида нет.

**Паротит вирусный** – вирусное заболевание детей, характеризующееся симметричным поражением околоушных слюнных желёз и эпидемическим распространением. Вызывается парамиксовирусом.

**Патогенность вирусов** – видовая способность вирусов вызы-

вать инфекционный процесс у своих хозяев.

**Пепломеры** – липопротеидные или гликопротеидные выступы суперкапсида вирусов.

**Пептос** – внешняя сторона суперкапсида, состоящая из пепломеров; иногда применяют как синоним суперкапсида.

**Персистенция вирусов** – длительное вегетирование вируса в организме естественного хозяина или в искусственной системе для культивирования вирусов.

**Пикорнавирусы (Picornaviridae)** – семейство мелких РНК-геномных вирусов – паразитов человека. Геном представлен цельной однонитчатой позитивной замкнутой РНК, ковалентно соединённой с полипептидом. Вирион имеет форму икосаэдра, размеры 24–30 нм. В семейство включены роды энтеровирусов, риновирусов, афтовирусов, кардиовирусов.

**Плазмида** – добавочные кольца молекулы ДНК бактерий.

**Плазмида** – основа плазмидного вектора – кольцевая двухцепочечная ДНК, обладающая способностью к автономной репликации, а также к встраиванию в нее и передачи в геном реципиента чужеродных генов и других последовательностей ДНК.

**Плеоморфизм** – вариабельность вирионов. Например, ортомиксовирусы могут образовывать вирионы сферической и нитевидной формы.

**Пневмовирусы (Pneumovirus)** – род из семейства парамиксовирусов. Один из видов – респираторно-синцитиальный (РС-вирус) – патогенен для человека.

**Поксвирусы (Poxviridae)** – семейство сложных ДНК-геномных вирусов. Вирионы поксвирусов имеют овоидную форму. Размер 150×350 нм. Геном, представленный двунитчатой линейной гантелеобразной формы ДНК, покрыт двухслойным капсидом, между слоями которого находятся боковые тела. Поверх нуклеокапсида расположена двухслойная липопротеидная оболочка. К данному семейству относится возбудитель натуральной оспы человека.

**Полимеразы вирусные** – ферменты, катализирующие процесс синтеза нуклеиновых кислот. Различают ДНК-зависимую ДНК-полимеразу, РНК-зависимую РНК-полимеразу, ДНК- зависимую РНК-полимеразу и РНК-зависимую ДНК-полимеразу, которые ответственно синтезируют молекулы ДНК, РНК, иРНК, ДНК-копию РНК-геномных вирусов. Последний тип носит название обратная транскриптаза.

**Полиовакцина** – вакцина, изготавляемая из живых аттенуированных штаммов полiovирусов. Используется для иммунопрофилактики.

**Полиовирусы (Poliovirus)** – группа энтеровирусов, вызывающих у человека полиомиелит. Относятся к семейству пикорнавирусов.

**Полиомиелит** – острое лихорадочное заболевание, сопровождающееся поражением нейронов серого вещества спинного мозга и ствола головного мозга, в результате чего развиваются вялые параличи и парезы мышц ног, туловища, рук.

**Природные пустые капсиды (ППК)** – капсиды, не содержащие генома и вследствие этого не обладающие свойством инфекционности.

**Провирусы** – геномы ДНК-вирусов или ДНК-копии РНК-вирусов, интегрированные в ДНК-хромосомы хозяев. Образование провирусов характерно для умеренных фагов, онкогенных и некоторых инфекционных вирусов.

**Прокапсид** – структуры из капсомеров вирусов, предшествующие образованию нуклеокапсида.

**Пролиферация** – новообразование клеток и тканей путем размножения.

**Промотор** – участок гена, ответственный за начало его транскрипции.

**Профаг** – форма существования умеренного фага, при которой нукleinовая кислота фага интегрирована с хромосомой бактерий.

**Псевдовирусы** – вирусоподобные частицы, состоящие из оболочек вируса и нукleinовой кислоты хозяина.

**Рабдовирусы (Rhabdoviridae)** – семейство сложных РНК-геномных вирусов. Вирионы имеют форму пули, размеры 50–95×130–380 нм. Геном представлен однонитчатой негативной молекулой РНК. Капсид построен по спиральному типу. Рабдовирусы разделены на 2 рода: вирусы везикулярного стоматита и вирусы бешенства.

**Размножение вирусов (репродукция)** – процесс образования новой генерации вирусов. Протекает в живых клетках и состоит из нескольких этапов: 1) прикрепление вириона к рецепторам мембран хозяина; 2) проникновение вириона или вирусного генома в клетку-хозяина; 3) освобождение генома от оболочек; 4) торможе-

ние активности генома хозяина; 5) множественная репликация вирусного генома; 6) синтез вирусных белков; 7) сборка вирионов; 8) выход дочерних вирионов из клетки-хозяина.

**Рекомбинантная ДНК** – ДНК, состоящая из участков различных исходных молекул ДНК.

**Рекомбинантные биообъекты** – биообъекты, в которые путем генно-инженерных манипуляций введена чужеродная ДНК, ответственная за синтез чужеродного или гетерологичного продукта.

**Рекомбинантный ген** – ген, состоящий из компонентов различных генов.

**Рекомбинация** – перераспределение генетического материала родителей, приводящее к наследственной комбинативной изменчивости.

**Рестриктаза** – фермент, разрезающий молекулу ДНК.

**Реовирусы (Reoviridae)** – семейство простых РНК-геномных вирусов. Вирионы имеют сферическую форму, размеры 75 нм. Геном представлен двунитчатой «+»РНК. Поражают респираторные и кишечные пути человека и животных.

**Респираторные вирусы** – вирусы, поражающие респираторные пути человека. К ним относят ортомиксовирусы, парамиксовирусы, риновирусы, аденоизирусы, герпесвирусы и другие. Инфекции, вызываемые респираторными вирусами, имеют тенденцию к эпидемическому распространению, протекают бессимптомно или с клиникой, остро или хронически.

**Рестриктаза** – это эндонуклеаза, узнающая какую-то последовательность внутри цепи ДНК (сайт рестрикции, см. выше) и проводящая гидролиз (разрыв) этой цепи.

**Ретровирусы (Retroviridae)** – семейство сложных РНК-геномных вирусов, образующих с помощью обратной транскрипта-зы ДНК-копию генома, которая интегрируя с геномом хозяина, вызывает интегральную инфекцию. Вирион имеет сферическую форму, размером 100 нм. Являются возбудителями СПИДа и злокачественных опухолей.

**Рецipient** – клетка, в которую переносят чужеродный ген.

**Риновирусы** – род из семейства пикорнавирусов, отличающийся выраженным тропизмом к дыхательным путям. Вызывает острый заразный насморк.

**Ротавирусы (Rotavirus)** – род из семейства реовирусов. Частый возбудитель гастроэнтеритов детей в возрасте 6–24 месяцев.

**Рубивирусы (Rubivirus)** – рубивирусы человека вызывают краснуху.

**Сайт рестрикции** – небольшой участок ДНК для узнавания ферментом – рестриктазой.

**Свинка** – паротит вирусный.

**Серопрофилактика** – профилактика инфекционных заболеваний с помощью иммунных сывороток и сывороточных препаратов. Эффективна при некоторых вирусных заболеваниях, например, при кори, гриппе, бешенстве и других.

**Синдром приобретённого иммунодефицита (СПИД)** – характеризуется преимущественным поражением иммунной системы, длительным течением, полиморфностью клинических проявлений, высокой летальностью, передачей в естественных условиях от больного человека здоровому (главным образом, при половых контактах или парентерально с инфицированными ВИЧ-материалами, от больной матери плоду, при грудном вскармливании) и склонностью к быстрому эпидемическому распространению. Типичный антропоноз.

**Скрининг** – проверка полученных клонов.

**Соматическая гибридизация** – процесс вовлечения в генетическую рекомбинацию хромосомы и гены ядра и органелл вне сексуального цикла, например, путем слияния изолированных протопластов. Приводит к появлению гибридных клеточных линий и соматических гибридов растений.

**Суперкапсид** – внешняя оболочка сложных вирусов, которая располагается поверх капсида.

**Сывороточный гепатит** – гепатит В.

**Таксономия вирусов** – условно выбраны три иерархических уровня: семейство, род, вид. Главными таксономическими критериями являются тип нуклеиновой кислоты (РНК, ДНК); наличие внешней оболочки (суперкапсида); форма вирионов; структура генома.

**Тип симметрии** – способ укладки капсомеров в капside вириона. При спиральном типе капсомеры укладываются вдоль линейно вытянутой молекулы нуклеиновой кислоты, при кубическом типе симметрии они образуют многогранную структуру типа икосаэдра, октаэдра.

**Титр вируса** – количество вирусов в единице объёма (обычно в 1 мл) суспензии. Подсчитывают в электронном микроскопе или

методом бляшек на культуре клеток.

**Тогавирусы (Togaviridae)** – семейство сложных РНК-геномных вирусов. Вирионы имеют сферическую форму, размеры 40–70 нм. Геном представлен цельной однонитчатой позитивной РНК. К данному семейству относится рубивирус – возбудитель краснухи.

**Токсичность вирусов** – нарушение метаболизма или гибель клеток в результате множественной адсорбции вирионов на их мембранах.

**Тотипотентность** – полноценность, информативность.

**Транскрипция** — образование РНК-копии на матрице ДНК с помощью фермента РНК-полимеразы.

**Трансляция** – синтез белка в рибосомах при участии информационной, транспортной РНК и других факторов.

**Трансформация** – процесс внедрения плазмида-вектора внутрь клетки с внесением чужеродной ДНК.

**Тропизм** – свойство паразитов выбирать в качестве среды обитания определённые организмы (видовой тропизм) или органы (органный, или тканевой, тропизм). Органный тропизм высоко выражен у вирусов.

**Ультрафильтрация** – отделение веществ с помощью мембранных фильтров.

**Умеренные фаги** – группа бактериофагов, геном которых интегрирует с геномом бактерии-хозяина, вызывая состояние лизогении.

**Фагмиды** – векторы содержащие элементы вирусной нуклеиновой кислоты и плазмида, что дает им возможность в определенных условиях образовывать зрелые фаговые частицы или существовать в бактериальных клетках в виде плазмид.

**Фаговар** – вариант одного вида бактерий, отличающийся от других вариантов этого же вида по спектру чувствительности к типовым фагам.

**Фаговая конверсия** – изменение свойств бактерий, наступающее в результате инфекции их умеренным фагом.

**Фазмиды** – гибриды между фагом и плазмидой. После встройки чужеродной ДНК могут в одних условиях развиваться как фаги, в других – как плазмиды.

**Ферменты** – катализаторы белковой природы.

**Ферменты вирусов** – ДНК- и РНК-полимеразы, ферменты,

разрушающие оболочку клетки-хозяина, модифицирующие концы и-РНК.

**Хронические вирусные инфекции** – персистирующие инфекции, главным признаком которых является длительное проявление клинических признаков болезни. Хроническое течение часто приобретают герпетические, цитомегаловирусные, ретровирусные инфекции, гепатит В.

**Цитолитическое действие вирусов** – лизис клеток-хозяев, является результатом размножения вирусов или цитолитическим действием ферментов вириона.

**Цитомегаловирус человека (ЦМВ)** – герпес вирус человека ГВЧ-5, инфицированные им клетки увеличиваются в размерах (цитомегалия).

**Цитомегаловирусная инфекция** – инфекционное заболевание людей, вызываемое цитомегаловирусом человека. Вирус передаётся через слону или от матери плоду. Инфицирование плода приводит к его гибели или развитию уродств. Заражение новорожденных ведёт к возникновению длительной латентной инфекции или реже к развитию генерализованной инфекции. У взрослых протекает или по локальному типу с поражением слюнных желёз, почек, центральной нервной системы или в виде острого инфекционного заболевания.

**Цитопатическое действие вирусов (ЦПД)** – деструктивные изменения отдельных клеток и клеточного монослоя, возникающие в результате продуктивной вирусной инфекции клеток и цитотоксического действия вирионов.

**Экзотоксин** – это белковые вещества, выделяемые клетками бактерий во внешнюю среду.

**Экторопные вирусы** – вирусы, размножающиеся в клетках вида хозяина и близкородственных ему видов.

**Экспрессия гена** – проявление (самовыражение) функционирования генетической информации, записанной в гене, в форме рибонуклеиновой кислоты, белка и фенотипического признака.

**Электропорация** – метод переноса генов в клетки с помощью электрического разряда, вызывающего образование дополнительных пор в клеточной мембране.

**Эндогенные провирусы** – вирусы, передающиеся от материнской клетки дочерней через геном, т.е. вертикальным путём.

**Энтеровирусные инфекции** – инфекционные заболевания,

вызываемые энтеровирусами.

**Энтеровирусы** – род простых мелких РНК-геномных вирусов из семейства пикорнавирусов. В род входят полиовирусы, вирусы Коксаки А и В, вирус гепатита А.

**Ящур** – тяжёлый афтозный стоматит крупного рогатого скота, вызываемый вирусом из семейства пикорнавирусов. У детей при употреблении сырого молока развивается афтозный стоматит, у доярок – везикулярный дерматит.

## ЛИТЕРАТУРА

### Основная

1. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология [Электронный ресурс] : учебник / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев, В.И. Плещакова. – Электрон. дан. – Санкт-Петербург : Лань, 2018. – 500 с. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/105990>.
2. Вирусология : учебник / под редакцией А. В. Пиневича. – 2-е изд., доп. – Санкт-Петербург : СПбГУ, 2020. – 442 с. – ISBN 978-5-288-06012-0. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/144200>
3. Вирусология. Практикум : учебное пособие для вузов / И. В. Третьякова, М. С. Калмыкова, Е. И. Ярыгина, В. М. Калмыков. – 3-е изд., стер. – Санкт-Петербург : Лань, 2022. – 132 с. – ISBN 978-5-8114-9840-6. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/200426>
4. Цифровизация ветеринарной отрасли: главные проблемы и как их решить. – URL: <https://rb.ru/opinion/veterinary-clinic-digital>

### Дополнительная

1. Буканов, А.Л. Современные методы математического анализа и их применение в решении задач технологии точного животноводства / А. Л. Буканов // Вестник АПК Верхневолжья. – 2021. – № 4. – С. 57-62. – ISSN 1998-1635. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/journal/issue/316553>
2. Ермаков, В. В. Вирусология и биотехнология (Вирусология) : методические указания / В. В. Ермаков. – Самара : СамГАУ, 2019. – 25 с. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/123533>
3. Метод иммуноферментного анализа и его использование в ветеринарии : методические указания / составитель Е. Н. Закрепин. – Вологда : ВГМХА им. Н.В. Верещагина, 2018. – 19 с. – Текст : электронный // Лань : электронно-библиотечная система. – URL: <https://e.lanbook.com/book/130892>.
4. Общая вирусология с основами таксономии вирусов позвоночных [Электронный ресурс] : учеб. пособие / А. Н. Сизенцов, А.

О. Плотников, Е. А. Дроздова, Е. С. Алешина, И. В. Грязева . – Оренбург : ГОУ ОГУ, 2012 . – 624 с. : ил. – Режим доступа: <https://lib.rucont.ru/efd/205002>

5. Самсонова О.Е., Сушков В.С., Бабушкин В.А. Компьютерные технологии в зоотехнии: Учебное пособие. Минсельхоз России, Мичуринский ГАУ. – Тамбов: Консалтинговая компания Юком, – 2019. – 48 с. [Электронный ресурс]: <URL:ukonf.com/mon>

6. Филатова Е. Н., Уткин О.В. Современные подходы к моделированию герпесвирусной инфекции // Журнал МедиАль. 2014. №2 (12). [Электронный ресурс] URL: <https://cyberleninka.ru/article/n/sovremennoe-podkhody-k-modelirovaniyu-gerpesvirusnoy-infektsii>

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
БИОЛОГИЯ ВИРУСОВ.....	5
Устройство и работа вирусологической лаборатории.....	5
Химический состав и физическая структура вирусов.....	10
Генетика и систематика вирусов.....	14
Бактериофаги, строение и применение.....	23
Подготовка биологического материала для вирусологических исследований.....	30
Культивирование вирусов.....	36
Индикация и идентификация вирусов методами микроскопии.....	44
ПЦР диагностика в вирусологии.....	49
Реакции индикации и идентификации вирусов.....	54
ВИРУСНЫЕ ИНФЕКЦИИ .....	71
Инфекции, вызываемые ДНК-содержащими вирусами.....	71
Инфекции, вызываемые РНК-содержащими вирусами.....	79
Профилактика вирусных инфекций.....	101
Карантинные и ограничительные мероприятия.....	111
Диагностика вирусных инфекций.....	115
Тестовые задания.....	127
Темы докладов с презентациями.....	133
СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ (ГЛОССАРИЙ).....	134
ЛИТЕРАТУРА.....	156
СОДЕРЖАНИЕ.....	158

*Учебное издание*

Светлана Анатольевна Сашенкова  
Галина Викторовна Ильина  
Дмитрий Юрьевич Ильин

## **ВИРУСОЛОГИЯ**

Практикум

Компьютерная верстка С.А. Сашенковой  
Корректор Л.Н. Каменская

Дата подписания к использованию 17.11.2022  
№ 32 в реестре электронных ресурсов ПГАУ  
Объем издания 3,6 Мб.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пензенский государственный аграрный университет» 440014, Пенза, ул. Ботаническая, 30 [www.pgau.ru](http://www.pgau.ru)