

Лабораторная работа № 2
Тема: Лабораторная диагностика
вирусных инфекций

План:

- 1. Правила отбора патологического материала, методы лабораторной диагностики вирусных и прионных инфекций**
- 2. Способы укладки капсомеров, цитоплазматические тельца включения и вирионы вирусов**

Рекомендуемая основная литература

1. Белоусова, Р.В. Ветеринарная вирусология / Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская, И.В Третьякова. – М., КолосС, 2007. – 424с [30]. – Режим доступа:

http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=45315 .

2. Белоусова, Р.В. Практикум по ветеринарная вирусология / Р.В. Белоусова, Н.И. Троценко, Э.А Преображенская. – М., КолосС, 2006. – 248с [30]. – Режим доступа:

http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=45315 .

3. Слюняев, В.П. Основы биотехнологии. Научные основы биотехнологии: учебное пособие [Электронный ресурс] : учебное пособие / В.П. Слюняев, Е.А. Плошко. – Электрон. дан. – СПб. : СПбГЛТУ, 2012. – 112 с. – Режим доступа:

http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=45315 .

Рекомендуемая дополнительная литература

1. Кудачева, Н.А. Общая ветеринарная вирусология (учебное пособие) / Н.А. Кудачева – Самара: РИЦ СГСХА, 2010. – 204 с [164].

2. Госманов, Р. Г. Санитарная микробиология / Р.Г. Госманов, А.Х. Волков, А.К. Галиуллин [и др.] : Учебник. – СПб.: Лань, 2015. – 240 с. (http://e.lanbook.com/books/element.php?pl1_id=636)

3. Воробьев А.А. и др. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. – М.: МИА, 2004. – 691с.

4. Воробьев А.А. и др. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии. – М.: МИА, 2003. -236с.

5. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: Учебник. М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2005. 736с.: ил.

Вопрос 1.

**Правила отбора
патологического
материала, методы
лабораторной диагностики
вирусных и прионных
инфекций**

Задание 1. Описать правила отбора патологического материала.

Точность полученного диагноза зависит в первую очередь от правильности взятия патологического материала.

1) Материал можно отбирать от клинически больных (в период развития четких клинических признаков), павших (не позднее 2-4 часов после клинической смерти) или вынужденно убитых с диагностической целью животных. Отбор патологического материала в более поздние сроки искажает результаты лабораторных исследований, что связано с диссеминацией кишечной микрофлоры из-за ослабления барьерной функции кишечника и увеличения проницаемости кровеносных сосудов. Концентрация вируса в материале при этом значительно снижается или вирус не обнаруживается совсем (аутостерилизация).

2) Отбор проб для вирусологических исследований следует проводить исходя из патогенеза предполагаемого вируса, учитывая при этом входные ворота инфекции, пути распространения вируса в организме, репродуктивную локализацию вируса, пути выделения.

3) Отбор проб необходимо проводить с помощью стерильных инструментов в стерильную посуду. Поверхность органа или ткани, от которого берут материал, на месте разреза обжигают над пламенем или прижигают нагретой металлической пластинкой.

Задание 2. Описать методы лабораторной диагностики вирусных инфекций.

1. Вирусоскопический метод исследования:

- а) в световом микроскопе;**
- б) в люминесцентном микроскопе;**
- в) в электронном микроскопе.**

2. Выделение и культивирование вирусов путем заражения развивающихся куриных эмбрионов, лабораторных животных и культур клеток.

- 3. Серологические методы исследования.**
- 4. Биологический метод.**
- 5. Генетические методы исследования.**

Задание 3. Описать основные правила получения и обработки патологического материала (кровь, смывы со слизистых оболочек, слюна, моча, фекалии, спинномозговая жидкость, афты и везикулы).

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 дефибрированная, либо «лаковая» кровь (смесь крови с дистиллированной водой в соотношении 1:1), либо отдельные элементы крови (эритроциты, лейкоциты, плазма, сыворотка). Обнаружить вирус в крови удастся в период вирусемии, в основном в случаях заражения животного вирусом, поражающим клетки многих или всех органов (чума КРС, классическая чума свиней, катаральная лихорадка овец, аденовирусная инфекция и др.). Для обнаружения в сыворотках крови противовирусных антител и прироста их титров исследуют парные сыворотки. Для этого кровь берут у одного и того же животного дважды с интервалом 2-3 нед в объеме не менее 5,0 мл каждой.

Задание 3. Описать основные правила получения и обработки патологического материала (кровь, смывы со слизистых оболочек, слюна, моча, фекалии, спинномозговая жидкость, афты и везикулы).

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 (ГЛА, 199, Игла) 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 желатины или 0,5-1%-ным 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 трубки диаметром 9 мм и длиной 30 см, внутри которой помещается вторая тонкая трубка с нержавеющей стержнем, оканчивающимся нейлоновой щеткой (диаметр 9 мм). Прибор вводят глубоко в носовые ходы (хоаны) или в горло через носовой ход, выдвигая щеточку, а затем вновь задвигая ее в трубку, перед тем как вынуть прибор из органа. Щеточку тщательно отмывают от слизи и клеток в 2 мл жидкости.

Задание 3. Описать основные правила получения и обработки патологического материала (кровь, смывы со слизистых оболочек, слюна, моча, фекалии, спинномозговая жидкость, афты и везикулы).

Слюну имеет смысл брать при наличии признаков поражения ротовой 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 0,02-0,05 г на 1 кг 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.

Задание 3. Описать основные правила получения и обработки патологического материала (кровь, смывы со слизистых оболочек, слюна, моча, фекалии, спинномозговая жидкость, афты и везикулы).

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 удастся. Вторая причина необходимости экстренного взятия материала заключается в том, что в трупe быстро развивается бактериальное обсеменение, взять пробу стерильно становится невозможно.

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 значительных посмертных изменениях тканей, если даже при помощи антибиотиков удастся затормозить рост бактерий, нельзя нейтрализовать продукты их метаболизма и токсические субстанции поврежденной ткани. Такой материал не пригоден 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 сиротские вирусы, которые вызывают деструкцию клеточных культур, осложняя тем самым диагностические исследования.

В качестве патматериала берут кусочки органов размером в несколько кубических сантиметров и массой 10-20 г, 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.

Задание 4. Описать правила транспортировки и хранения проб патологического материала.

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 частей льда или снега и одной части поваренной соли. В последнем случае удастся получить температуру минус 15 - 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 натрия хлорида (изотонический раствор), в которую и помещается патматериал. Обычно эту смесь используют для консервирования кусочков паренхиматозных органов и тканей. Растворы глицерина менее пригодны для вируссодержащих 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 иммунофлуоресценции. 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.

Задание 4. Описать правила транспортировки и хранения проб патологического материала.

Патматериал должен быть снабжен надежной и четкой этикеткой, недопустимо делать надписи карандашом по стеклу. На пробирке или флакончике достаточно надежна этикетка из лейкопластыря, 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 - минус 70°C. Большинство вирусов быстро разрушается в крови, спинномозговой жидкости, моче, соскобах 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 нет уверенности в том, что исследуемое инфекционное заболевание было вызвано только вирусом, часть материала следует отдать для бактериологического и микологического исследований.

Задание 5. Описать правила подготовки вирусосодержащего материала для исследования (органы и ткани, выделения из носа и глаз, фекалии, моча, содержимое папул, пузырьков и пустул, чешуйки и корки, кровь, материал для серологического исследования).

В лаборатории полученный патматериал освобождают от консерванта, оттаивают, отмывают от глицерина, взвешивают или измеряют. Часть материала берут для вирусологических исследований, оставшуюся часть хранят в холодильнике на случай дополнительных исследований. Затем составляют план исследований присланного материала.

Подготовка органов и тканей. Вирус необходимо высвободить из клеток органов и тканей и перевести в фосфатный буфер или раствор Хенкса. Для этого материал тщательно измельчают ножницами и растирают в ступке со стерильным кварцевым песком. Добавлять толченое стекло менее желательно, так как оно обладает щелочными свойствами и может инактивировать часть вирусных частиц. Но и на тонко растертых песчинках или частицах стекла, обладающих большой поверхностью, часть вируса может адсорбироваться и уйти затем в удаляемый осадок. Из растертого материала обычно готовят 10%-ную суспензию на фосфатном буфере или растворе Хенкса. Полученную суспензию центрифугируют при 1500-3000 мин⁻¹, 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. Предпочтительность тех или иных доз антибиотиков и оптимальный режим центрифугирования в каждом конкретном случае указываются в инструкции по диагностике соответствующих вирусных болезней.

Задание 5. Описать правила подготовки вируссодержащего материала для исследования (органы и ткани, выделения из носа и глаз, фекалии, моча, содержимое папул, пузырьков и пустул, чешуйки и корки, кровь, материал для серологического исследования).

Экспозиция суспензии с антибиотиками не менее 30-60 мин 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 вируссодержащий материал используют для заражения лабораторных животных, куриных эмбрионов или культур клеток. В случае положительного бактериологического контроля суспензию вируса подвергают дополнительной обработке антибиотиками и повторно ставят контроль. Суспензию хранят при минус 20 - минус 70°C.

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. мин⁻¹. Надосадочную жидкость отсасывают в стерильные пробирки и в них добавляют пенициллин по 1 тыс. ЕД на 1 мл и стрептомицин по 1 мг на 1 мл, выдерживают 60 мин при комнатной температуре и после бактериологического контроля используют для заражения. Из осадка клеток готовят мазки для РИФ.

Задание 5. Описать правила подготовки вируссодержащего материала для исследования (органы и ткани, выделения из носа и глаз, фекалии, моча, содержимое папул, пузырьков и пустул, чешуйки и корки, кровь, материал для серологического исследования).

Подготовка фекалий. Пробу кала (приблизительно 1 г) помещают в баночку с бусами, содержащую 10 мл раствора Хенкса или фосфатно-буферного раствора. После гомогенизации материала встряхиванием и последующего центрифугирования при 2-3 тыс. мин⁻¹ в течение 30 мин надосадочную жидкость отсасывают, добавляют пенициллин по 2-3 тыс. ЕД, стрептомицин по 2-3 мг и нистатин по 30 ЕД на 1 мл. После 60-минутного контакта производят посев на стерильность, замораживают и хранят при минус 10 - 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.

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

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⁻¹ в течение 10-15 мин. После обработки пенициллином и стрептомицином (соответственно 1-3 тыс. ЕД и 1-3 мг на 1 мл) материал используют для заражения.

Задание 5. Описать правила подготовки вирусосодержащего материала для исследования (органы и ткани, выделения из носа и глаз, фекалии, моча, содержимое папул, пузырьков и пустул, чешуйки и корки, кровь, материал для серологического исследования).

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 2-3 тыс. мин⁻¹ 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 нед после заболевания. Брать кровь и готовить сыворотку необходимо стерильно, нельзя применять антикоагулянты или консерванты, которые могут сделать сыворотку антикомплементарной, а в реакции нейтрализации оказать 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, проводят высевы на бактериологические среды. Вместо отстаивания в холодильнике можно после обведения кровь центрифугировать.

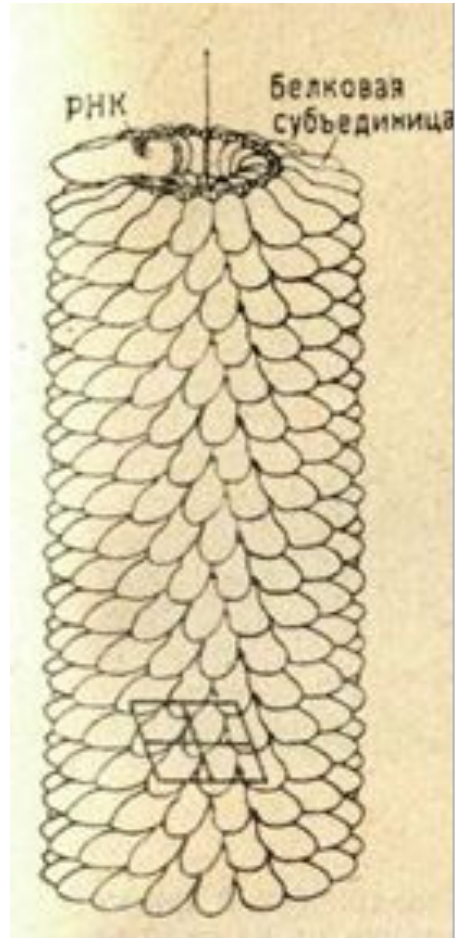
Серологические методы вирусологической диагностики требуют исследования парных сывороток, поэтому необходимо правильно сохранять первые пробы, пока не будут получены вторые. Хранить сыворотки необходимо в холодильнике при 4°C или в замороженном состоянии, строго соблюдая порядок нумерации и соответствия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

**Вопрос 2. Способы
укладки капсомеров,
цитоплазматические
тельца включения и
вирионы вирусов**

Задание 6. Оформить сопроводительный документ к патологическому материалу.

Задание 7. Охарактеризовать и зарисовать основные способы укладки капсомеров вокруг молекул нуклеиновой кислоты.

1

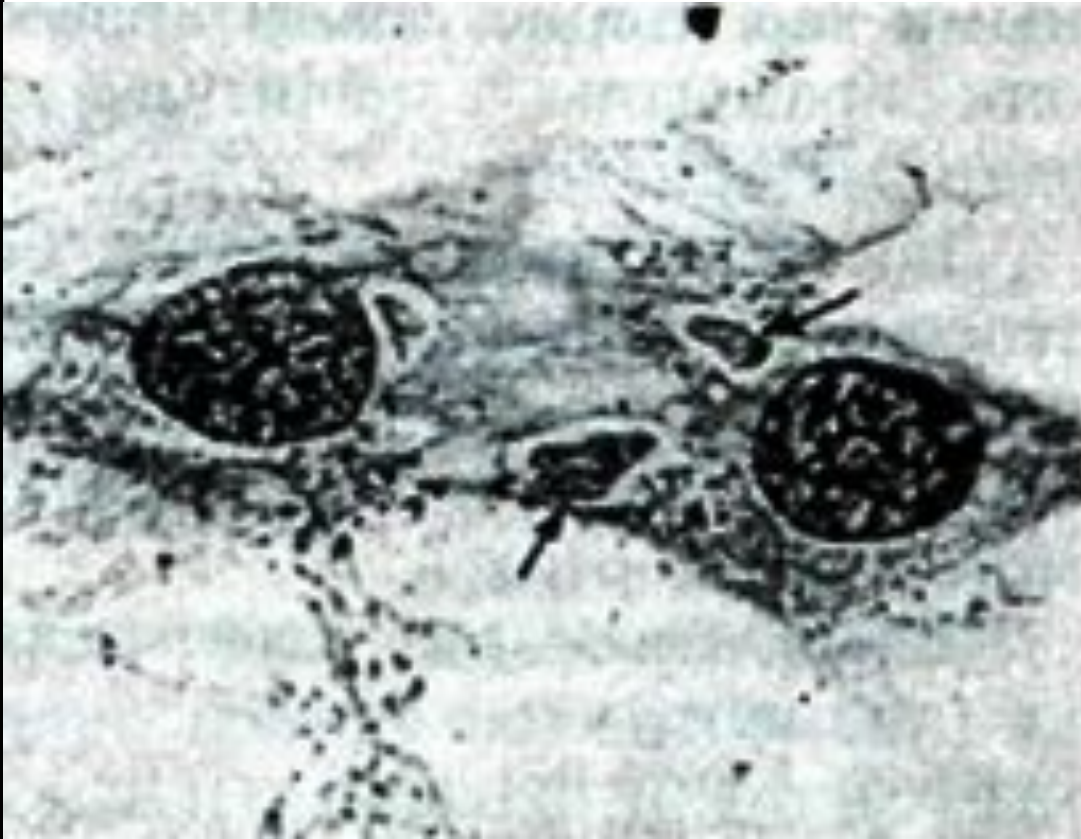


2



Задание 8. Охарактеризовать и зарисовать цитоплазматические тельца включения.

Рисунок

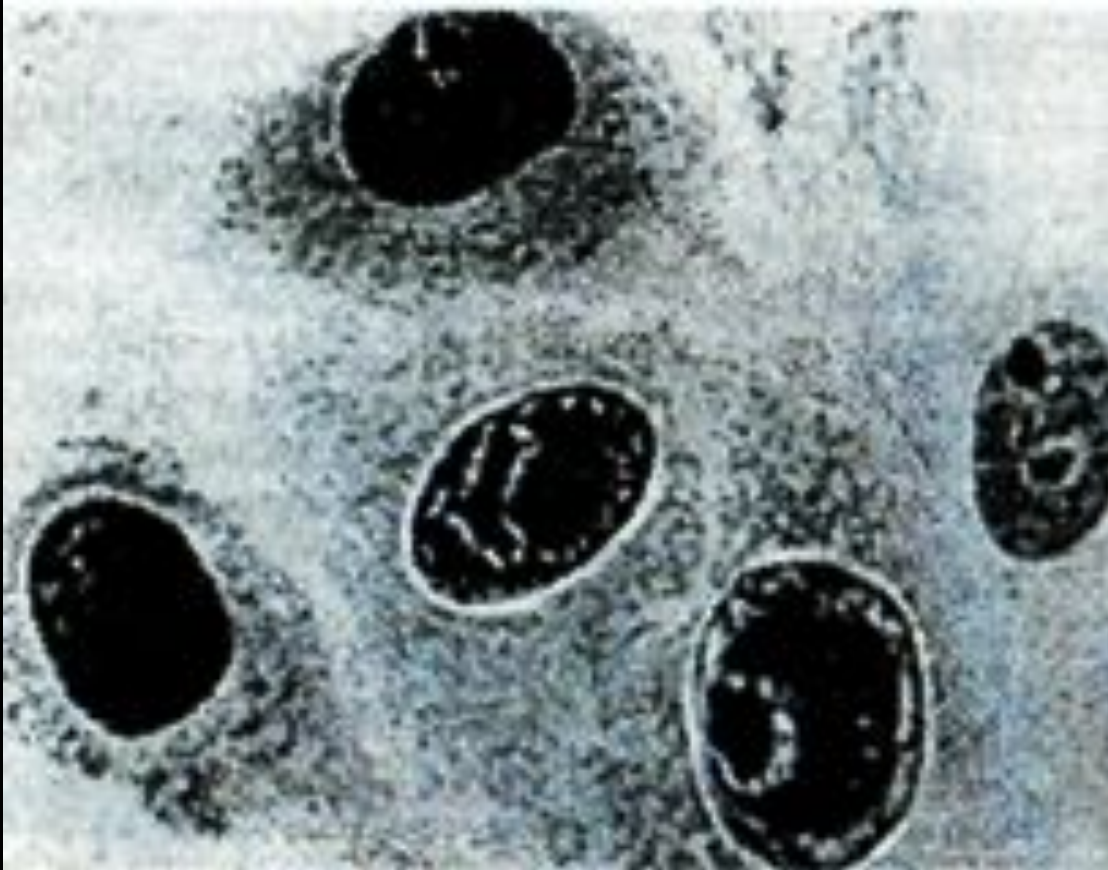


Описание

Цитоплазматические тельца-включения, образованные вирусом ПГ-3 в клетках почки эмбриона коровы

Задание 9. Охарактеризовать и зарисовать внутриядерные тельца включения.

Рисунок



Описание.

Внутриядерные тельца включения, образованные парвовирусом свиней в клетках ПК-15.

Задание 10. Охарактеризовать и зарисовать вирионы вируса оспы (а), везикулярного стоматита (б), аденовируса крупного рогатого скота (в), ротавируса телят (г), гриппа кур (д), коронавируса кур (е).

Рисунок

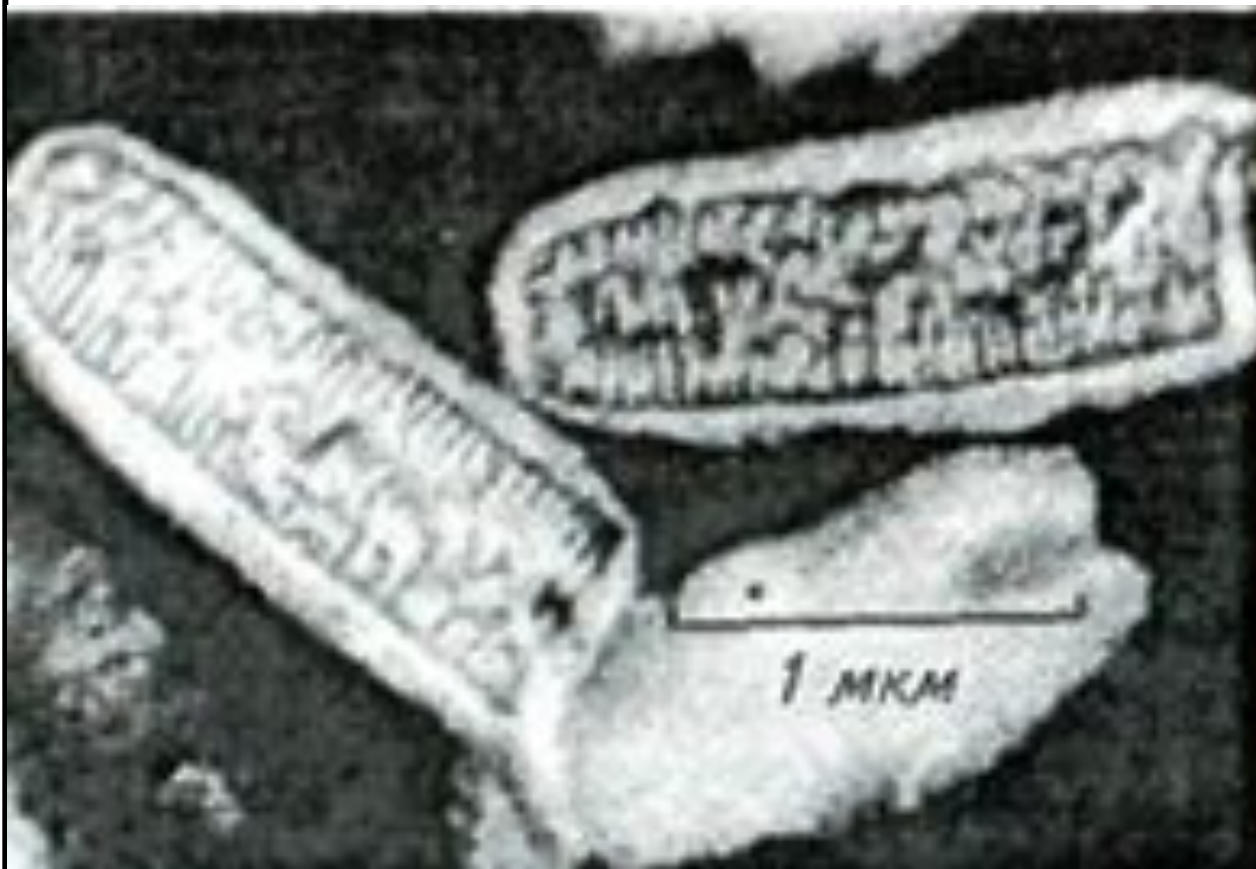


Описание.

Вирионы вируса оспы верблюдов.

Задание 10. Охарактеризовать и зарисовать вирионы вируса оспы (а), везикулярного стоматита (б), аденовируса крупного рогатого скота (в), ротавируса телят (г), гриппа кур (д), коронавируса кур (е).

Рисунок

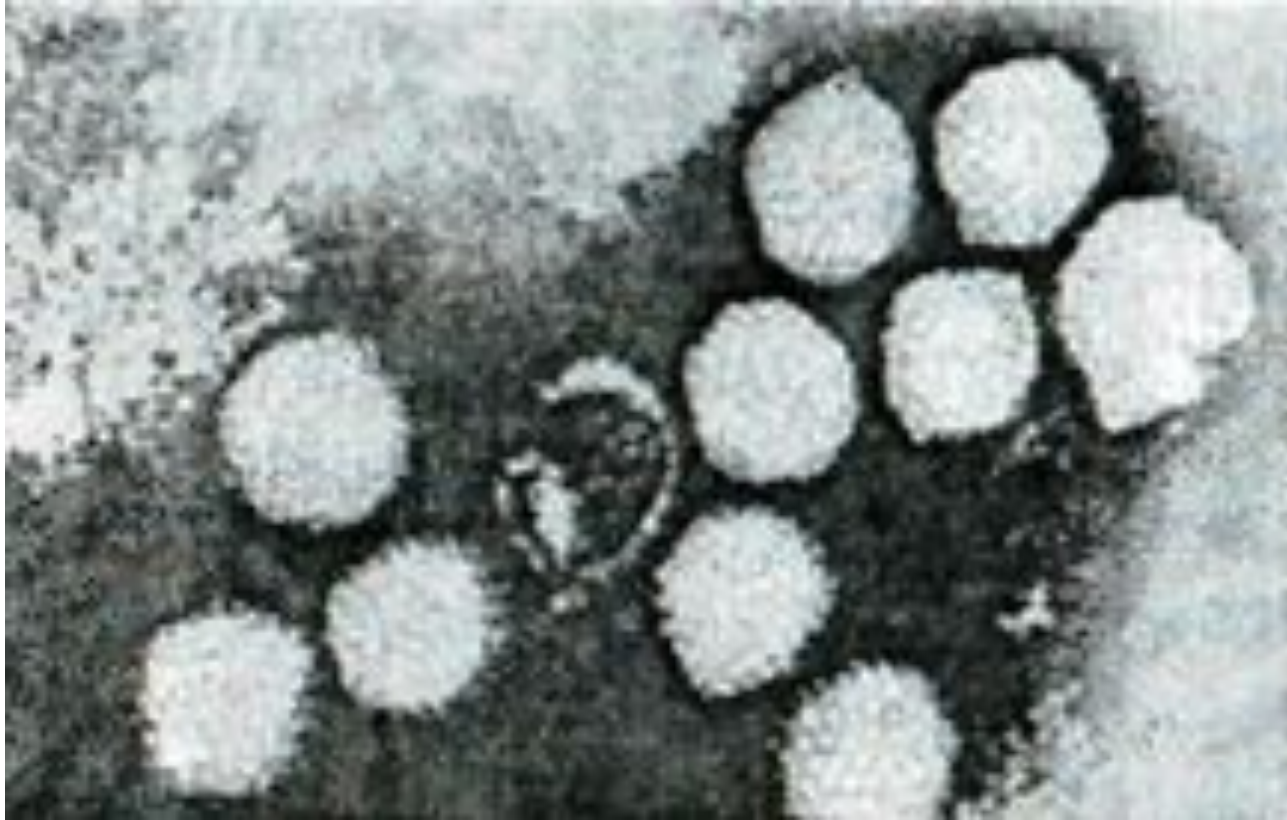


Описание.

Вирионы вируса
везикулярного
стоматита

Задание 10. Охарактеризовать и зарисовать вирионы вируса оспы (а), везикулярного стоматита (б), аденовируса крупного рогатого скота (в), ротавируса телят (г), гриппа кур (д), коронавируса кур (е).

Рисунок

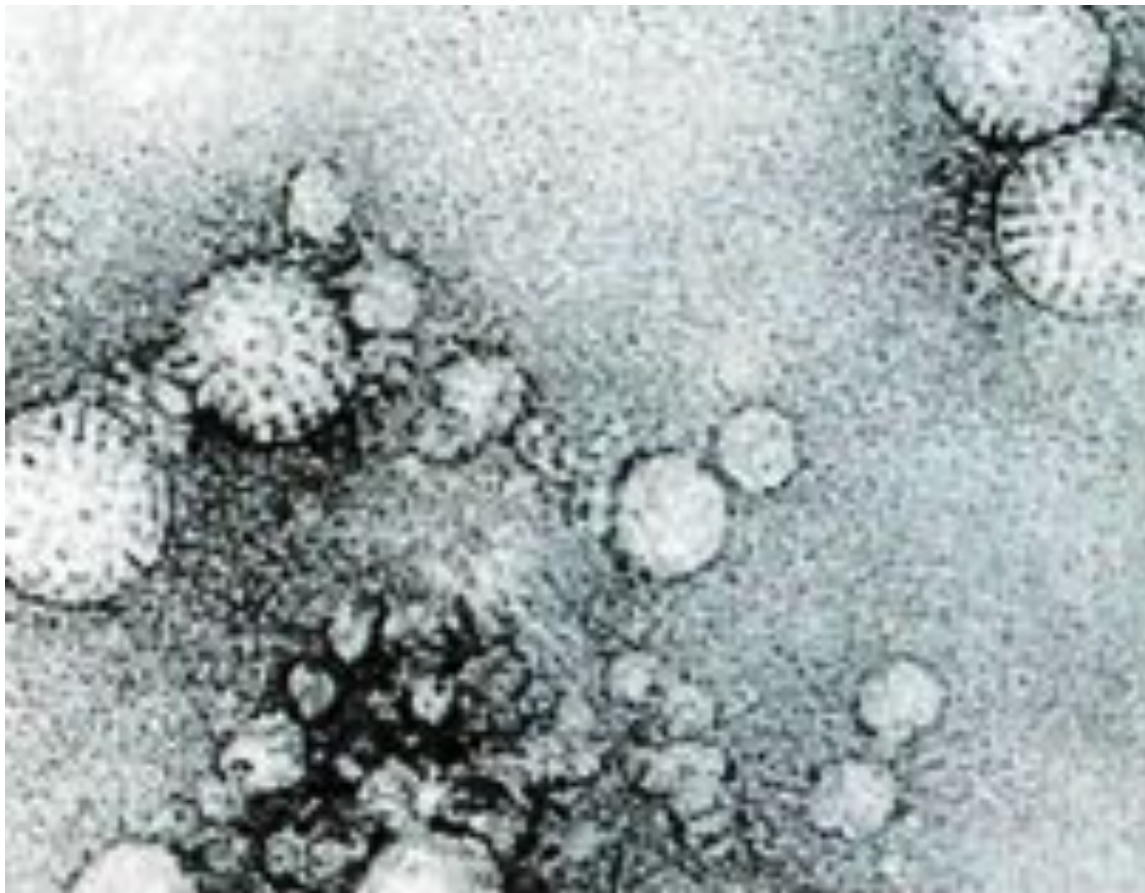


Описание.

Вирионы
аденовируса
крупного
рогатого скота

Задание 10. Охарактеризовать и зарисовать вирионы вируса оспы (а), везикулярного стоматита (б), аденовируса крупного рогатого скота (в), ротавируса телят (г), гриппа кур (д), коронавируса кур (е).

Рисунок



Описание.

Вирионы ротавируса
телят

Задание 10. Охарактеризовать и зарисовать вирионы вируса оспы (а), везикулярного стоматита (б), аденовируса крупного рогатого скота (в), ротавируса телят (г), гриппа кур (д), коронавируса кур (е).

Рисунок

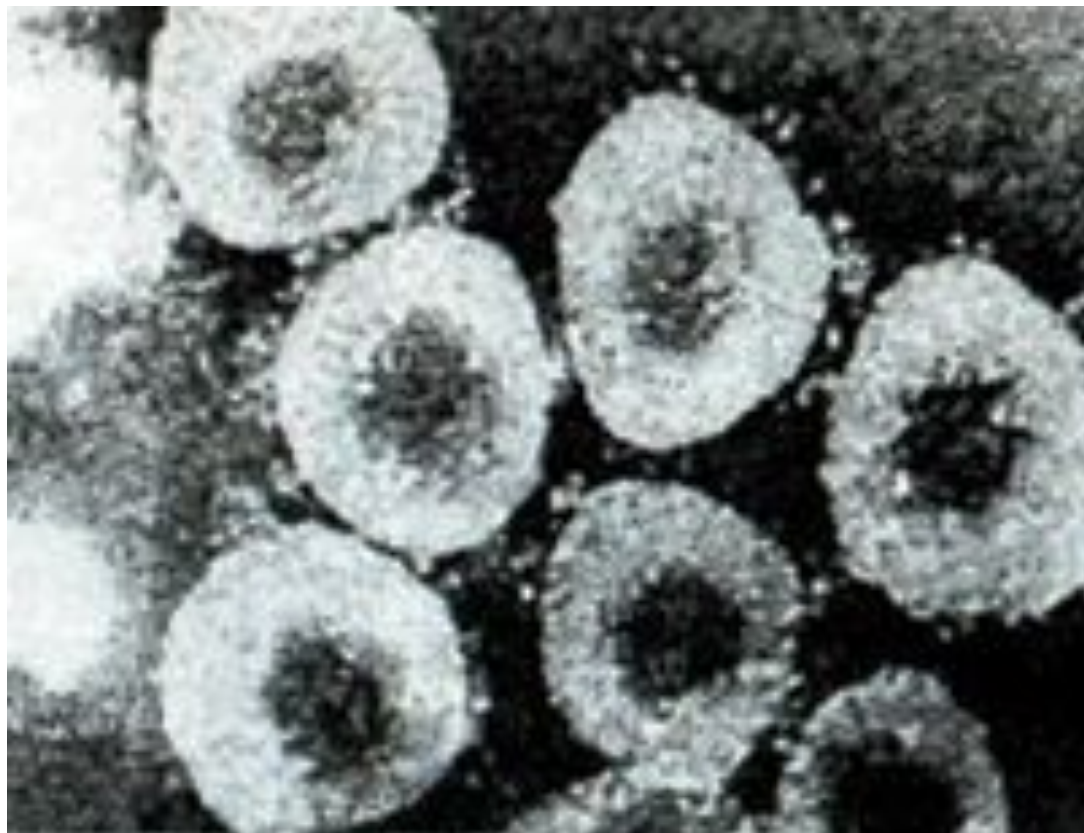


Описание.

Вирионы вируса гриппа кур

Задание 10. Охарактеризовать и зарисовать вирионы вируса оспы (а), везикулярного стоматита (б), аденовируса крупного рогатого скота (в), ротавируса телят (г), гриппа кур (д), коронавируса кур (е).

Рисунок



Описание.

Вирионы коронавируса кур

Задание 11. Опишите что собой представляют вирусные тельца включения и как они классифицируются в зависимости от внутриклеточной локализации.

Задание 12. Укажите специфические названия телец-включений в инфицированных клетках (табл.).

Вирусная инфекция	Тельца-включения
Бешенство	Бабеша-Негри
Оспа птиц	Боллингера
Оспа млекопитающих	Гварниери
Чума плотоядных	Лентца
Инфекционный ларинготрахеит кур	Зейфреда
Инфекционный гепатит плотоядных	Рубарта