

**Министерство сельского хозяйства Российской Федерации**

**Федеральное государственное бюджетное образовательное  
учреждение высшего образования**

**«Саратовский государственный аграрный университет  
имени Н.И. Вавилова»**

**ВИРУСОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ**

**Краткий курс лекций**

**для студентов III курса**

**Специальность**

**36.05.01 Ветеринария**

**Саратов 2017**

**Вирусология и биотехнология:** краткий курс лекций для студентов 3 курса специальности 36.05.01 Ветеринария /Е.С. Красникова // ФГБОУ ВО Саратовский ГАУ.- Саратов, 2017.

Краткий курс лекций по дисциплине «Вирусология и биотехнология» составлен в соответствии с программой дисциплины и предназначен для студентов специальности 36.05.01 Ветеринария. Краткий курс лекций содержит теоретический материал по вирусологии и биотехнологии. Направлен на формирование у студентов навыков использования знаний основ вирусологии для диагностики и профилактики вирусных болезней животных; навыков по использованию биотехнологических методов выделения, разделения, очистки и конструирования биологически активных веществ, производства биопрепаратов. Материал ориентирован на вопросы профессиональной компетенции будущих ветеринарных врачей.

## Введение

Дисциплина «Вирусология и биотехнология» относится к общепрофессиональному ветеринарно-биологическому циклу. Дисциплина состоит из двух курсов: курса «Вирусология» и курса «Биотехнология».

В курсе «Вирусология» изучаются основные виды вирусов и прионов, формы их существования и физико-химическую структуру, особенности таксономии, патогенез вирусных болезней на уровне клетки и организма, особенности противовирусного иммунитета, современные подходы к профилактике и принципам диагностики вирусных болезней животных, характеристику некоторых, наиболее актуальных, вирусных болезней.

В курсе «Биотехнология» изучаются теоретические основы биотехнологии и основы биотехнологических производств; биотехнологические аспекты производства профилактических, диагностических и терапевтических препаратов, в том числе генно-инженерных вакцин, моноклональных антител, иммобилизованных ферментов; основные и вспомогательные элементы технологии производства и контроля качества биопрепаратов; методы подготовки технологического оборудования к работе, выделения, концентрирования, высушивания и приготовления готовых лекарственных форм препаратов из продуктов микробного синтеза, способы масштабирования и оптимизации биотехнологических процессов

Дисциплина является предшествующей для следующих дисциплин: «Иммунология», «Эпизоотология и инфекционные болезни», «Организация ветеринарного дела» и «Ветеринарно-санитарная экспертиза»

Вирусология и биотехнология тесно связаны с производственной деятельностью людей. Качество знаний по вирусологии и биотехнологии позволяет теоретически осмыслить проблемы, связанные с диагностикой, лечением и профилактикой вирусных заболеваний, производством диагностических, лечебных и профилактических препаратов.

## Лекция 1

### Роль вирусов в инфекционной патологии животных, растений и человека. Ветеринарная вирусология, ее задачи и достижения.

#### 1.1. Открытие вирусов, история их изучения..

Вирусология (vira-яд) – наука о вирусах - мельчайших, невидимых невооруженным глазом организмах, не имеющих клеточного строения, белоксинтезирующей системы и содержащих только ДНК или РНК

Вирусология подразделяется на:

**Общую вирусологию** – изучает природу и происхождение вирусов, их классификацию, строение, химический состав, генетику и селекцию, устойчивость к физико-химическим воздействиям, общие механизмы взаимодействия вируса и клетки, вируса и макроорганизма, основы противовирусного иммунитета, общие признаки (клинику) вирусных болезней, методы диагностики и профилактики

**Частную вирусологию** – изучает систематическое положение конкретных возбудителей, строение, размеры и устойчивость вирионов, лабораторные методы культивирования вирусов, антигенные свойства, эпизоотологические особенности вызываемого заболевания, методы диагностики, терапию и специфическую профилактику.

История становления вирусологии как науки отличается от многих других наук тем, что развиваться она начала задолго до того, как были открыты сами вирусы.

Еще в конце XVIII столетия Э. Дженнер в Англии сделал величайшее открытие — разработал против оспы живую вакцину, с помощью которой во всем мире началась борьба с этим страшным заболеванием. Затем Л. Пастер создал метод прививок против бешенства и других инфекций, положив начало научному обоснованию борьбы с вирусными болезнями с помощью живых ослабленных вакцин.

**Еще в 1886 году** немецкий ученый А. Мейер, работавший в Голландии, показал, что сок растений, больных мозаичной болезнью, вызывает у здоровых растений такое же заболевание. Мейер был уверен, что виновник болезни микроб, и в течение ряда лет безуспешно искал его.

**В 1892 году** профессор ботаники Петербургского университета Дмитрий Иосифович Ивановский подтвердил некоторые находки Мейера. Несколько лет подряд изучал он мозаичную болезнь, поразившую обширные плантации табака в Крыму. Ученый работал как одержимый. Он показал, что сок больных растений заразен, но его инфекционность теряется после кипячения. Ивановский был убежден, что, хотя в соке не было видно каких-либо грибков и других паразитов, причиной болезни, несомненно, должны быть бактерии.

Д. Ивановский опроверг утверждение Мейера о том, что сок больных растений теряет свои заразные свойства после фильтрования через двойной слой фильтровальной бумаги. Ивановский показал, и в этом главное значение его открытия, что сок сохраняет свои инфекционные свойства после пропускания через свечи Пастера — Шамберлена, сделанные из мелкопористой глины, которая удаляет из жидкости любые видимые в микроскоп организмы, любые бактерии. Так было доказано существование патогенных агентов, намного меньших, чем все известные в ту пору микроорганизмы.

Открытие вирусов (так их стали называть впоследствии), сделанное Д. Ивановским, который не был даже микробиологом, представлялось тогда многим ученым неким любопытным парадоксом. Никто не думал, что из этой, казалось бы, случайной находки мельчайших микроорганизмов разовьются современные знания о фактически новом царстве живой материи, широко раздвинувшем старые границы известного мира животных и растений.

**После открытия Ивановского в 1896 датский микробиолог М. Бейеринк** повторил его опыты и подтвердил, что агент, вызывающий мозаичную болезнь табака, свободно проходит через фарфоровые фильтры.

После этих опытов Бейеринк написал, что причиной болезни является вирус, который скорее всего находится в жидком или растворенном состоянии и не является плотной частицей».

Через два года (1898) германские микробиологи **Ф. Леффлер и П. Фрош** показали, что ящур, эпидемическая болезнь крупного рогатого скота, также вызывается фильтрующимся агентом — вирусом. Бейеринк написал по этому поводу научную статью, где заявил, что он не может согласиться с господином Леффлером в отношении корпускулярной природы возбудителя ящура, так как вирус должен быть жидким веществом.

**В 1901** году В. Рид и его сотрудники установили, что возбудитель желтой лихорадки, тяжелейшей тропической болезни людей, также проходит через фильтры и является вирусом.

В 1915 году **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.

Вспоминая историю открытия вирусов, следует перечислить некоторые знаменательные даты: **1892 год** — открыт вирус табачной мозаики; **1897-й** — фильтрующийся вирус ящура; **1901-й** — вирус желтой лихорадки; **1902-й** — вирус оспы птиц и овец; **1903-й** — вирус бешенства; **1905-й** — вирус оспенной вакцины; **1907-й** — вирус Денге (тропического вирусного заболевания); **1908-й** — вирус оспы людей и трахомы; 1909-й — вирус полиомиелита; 1911-й — вирус саркомы кур Рауса; **1915-й** — бактериофаг; **1916-й** — вирус кори; **1917-й** — вирус герпеса, 1982- вирус СПИД, 1997 – открыты прионы.

Этот список свидетельствует, что метод фильтрования материалов через фарфоровые фильтры позволил ученым быстро разграничивать мир вирусов от мира микробов и открывать одного за другим возбудителей вирусных болезней.

**В 1932** году крупный английский химик В. Элфорд создает искусственные мелкопористые коллоидные мембраны с точно установленным размером отверстий в пределах от 50 до 300 нанометров. (Раньше эти величины называли миллимикронами, а теперь обозначают термином «нанометр», что значит — миллиардная доля метра.) Пропуская через эти мембраны растворы, содержавшие некоторые бактериофаги и вирус осповакцины, Элфорд устанавливает их размеры. Этот метод ультрафильтрации широко используется для определения размеров вирусов.

Когда ученые исследуют вирусы, поражающие животных, растения, микробов, они используют в качестве модели соответствующие виды животных, растений и микроорганизмов. Иное дело, когда пытаются выделить вирус от человека. Приходится каждый раз отыскивать таких лабораторных животных, в организме

которых вирус сможет размножиться и вызвать развитие определенной клинической картины болезни.

**В 1931 году** американские исследователи М. Вудруф и Э. Гудпасчер изобрели метод культивирования вирусов в развивающемся курином эмбрионе. После 7—10 дней инкубации в куриное яйцо вводили материал, содержащий вирусы.

Метод отличался гораздо большей чувствительностью и исключал возможность случайного загрязнения исследуемого материала спонтанными вирусами, которые нередко находятся в организме лабораторного животного. Яичная скорлупа делала внутреннее содержимое яйца вполне герметичным и препятствовала проникновению извне чужеродных вирусов и бактерий. В курином яйце не развивались антитела, и вирусы могли беспрепятственно размножаться.

В курином эмбрионе были выращены и изучены все известные вирусы гриппа. Эмбрионы используют и для приготовления вакцины против гриппа.

Наиболее быстрое развитие вирусологии началось **после 1948 года**, когда Д. Эндерс, известнейший американский исследователь-вирусолог, впоследствии лауреат Нобелевской премии, разработал метод так называемых однослойных тканевых культур.

Любые кусочки живых тканей, взятые от человека, животных, насекомых, растений, после их обработки раствором особого фермента — трипсина, получаемого из поджелудочной железы коров, распадаются на отдельные клетки. После удаления трипсина клетки приобретают способность жить в искусственных условиях, внутри стеклянных пробирок или флаконов с небольшими количествами питательной среды. В таких благоприятных условиях клетки активно размножаются, постепенно покрывают тонким слоем поверхность стекла и могут существовать в течение большого промежутка времени. Нужно лишь поместить их в термостат при температуре 37 градусов Цельсия.

Такие культуры клеток хорошо поддерживали рост различных вирусов. С помощью метода тканевых культур за последние двадцать лет удалось подробно изучить, как живут и размножаются многие известные вирусы. Кроме того, этот метод позволил выделить и исследовать несколько сот ранее неизвестных вирусов. Ведется производство разнообразных вирусных вакцин и диагностических препаратов, возник новый молекулярно-биологический раздел вирусологических исследований.

## **1. 2. Роль вирусов в инфекционной патологии животных, растений и человека. Ветеринарная вирусология, ее задачи.**

### **Вирусная угроза**

Вирусы способны вызывать заболевания у растений (вирус табачной мозаики, Y вирус картофеля), человека и животных. Вирусы поражают бактерии, грибы, беспозвоночных. Некоторые вирусы являются антропоозоонозами, т.е. общими для животных и человека.

Вирусы появились на земле гораздо раньше человека и постоянно «сопровождали» его на всем протяжении эволюции. Достаточно вспомнить оспу, наводившую ужас на средневековую Европу. Или, например, такое вирусное заболевание как полиомиелит. Неизвестно, как называли древние египтяне полиомиелит, искалечивший правую ногу принца восьмой династии (1580–1350 до н.э.), изображенного на этой стеле. Болезнь была неизлечима по настоящее время. Спасти от нее может только вакцинация, которая начала применяться лишь в 20 веке. Слово «эпидемия» знакомо каждому. Оно ассоциируется у нас с катастрофическими морами прошлого, а с экранов нас ежегодно предупреждают об очередном нашествии

вируса гриппа. Как считают специалисты, грипп был известен людям с глубокой древности. Признаки «лихорадки», схожей с гриппом, описывали еще Гиппократ, Тит Ливий и Диодор. Первые сведения о широком распространении инфекции датированы 1179 годом, когда, по сегодняшним предположениям, сильнейшая эпидемия гриппа охватила Италию, Германию и Англию. Но достоверные описания эпидемий относятся к периоду XVI—XVIII веков, на протяжении которых страны Европы сотрясала «итальянская лихорадка». После пандемии 1780—1782 годов заболевание стали называть «инфлюэнца» (от лат. *influere* — «проникать», «распространяться») и «гриппом» (от франц. *gripper* — «схватывать»). И это не удивительно. В 20-х годах прошлого века от «испанки» погибло от 20 до 40 миллионов человек. Свежи в нашей памяти и события последнего времени - птичий грипп, «свиной» грипп. Вирус постоянно мутирует и надо создавать все новые вакцины. Не удалось человечеству побороть и СПИД, хотя в последнее время и появляются сообщения об испытаниях различных вакцин и противовирусных препаратов.

В последнее время всё чаще говорят о «новых» эпидемиях, вызванных ранее неизвестными или несвойственными человеку болезнями. И хотя ни атипичная пневмония, ни сменивший ее на первых полосах СМИ птичий грипп не вызывают поветрий, даже отдалённо напоминающих по масштабам смертоносные эпидемии прошлого, ученые продолжают пугать простых смертных мрачными сценариями грядущих катастроф.

Мир меняется

Всемирная организация здравоохранения, координирующая на протяжении последних десятилетий усилия медиков 193-х государств в борьбе с глобальными проблемами медицины, обнародовала очередной ежегодный доклад. Будучи авторитетнейшей международной медицинской организацией, ВОЗ отмечает проблему «новых» инфекций как одну из основных угроз не только для жизни людей, но и человеческой цивилизации в целом.

За последние 40 лет, как отмечается в докладе, неизвестные раньше человеческие болезни стали появляться гораздо чаще – сейчас таких заболеваний регистрируется по одному в год, а то и более. Откуда же свалилась на человечество эта неожиданная напасть?

Не принимая во внимание апокалиптические теории, можно обратить внимание на несколько причин. Условиями развития любой эпидемии являются наличие источника инфекции, восприимчивого к ней организма и способов передачи микроба от больного человека к здоровому. Первое, и, наверное, основное из изменений последних лет – это возросшая плотность населения земли и беспрецедентные объёмы пассажирских перевозок. Всё это облегчило микробам и вирусам способы передачи от одного человека к другому. Если в начале XX столетия за время путешествия от одного континента до другого человек успевал заболеть гриппом и вылечиться от него, то в наши дни человек, подцепивший экзотическую инфекцию в Гонконге, может через несколько часов оказаться в московском метро. Впрочем, роль международной коммуникации в распространении эпидемий известна очень давно. Например, причиной пандемии чумы, поразившей Азию в конце XIX века считаются корабельные крысы, обеспечившие распространение болезни более чем в 100 портовых городах.

Нетрудно заметить, что все перечисленные болезни вызываются вирусами. (лихорадка Эбола, грипп, СПИД, африканская чума свиней) В прошлом, конечно, вирусные болезни тоже не давали человечеству покоя: достаточно вспомнить

«испанку» 1918-го года и оспу, наводившую ужас на средневековую Европу. Однако наряду с ними бесчинствовали многочисленные бактериальные инфекции: чума, холера, брюшной и сыпной тиф. Сейчас большинство из них обуздано и более или менее успешно контролируется, по крайней мере в развитых странах. И если для борьбы с бактериальными инфекциями человечество располагает обширным арсеналом антибиотиков, то аналогичных лекарств для борьбы с вирусными болезнями практически нет. Существуют, конечно, методы профилактики, такие как вакцинация, однако разработка и внедрение необходимых препаратов – дело весьма сложное, дорогое, а главное не быстрое, поэтому в качестве экстренной защиты вряд ли подходит.

Если все инфекционные болезни, вызываемые всевозможными микроорганизмами, принять за 100%, то вирусные болезни в медицине составят примерно 80%, а в ветеринарии-50% и более.

Среди множества инфекционных болезней животных (более 1340 нозологических единиц) есть группа болезней, которые именуются особо опасными, или конвекционными. Международное эпизоотическое бюро поместило в группу А, имея в виду, что они могут вызывать массовое поражение животных, наносить большой экономический ущерб животноводству.

Болезней в этой группе 15, в том числе 14 – вирусной этиологии: ящур, везикулярный стоматит, везикулярная болезнь свиней, чума крупного рогатого скота, чума мелких жвачных, нодулярный дерматит, лихорадка долины Рифт, блютанг, оспа овец и коз, африканская чума лошадей, африканская чума свиней, классическая чума свиней, чума (грипп) птиц, болезнь Ньюкасла. Некоторые болезни из этого списка поражают и человека.

Причиной другой незлечимой болезни – губчатой энцефалопатии КРС являются другие представители царства *Vira*-прионы. Они-же поражают и человека, разрушая головной мозг- такие болезни как куру, болезни Крейтцфельда-Якоба.

Другая группа «неинфекционных» болезней, возбудителями которой, как выяснилось, тоже являются вирусы, — злокачественные опухоли. Первый онкогенный вирус был открыт почти сто лет назад — так называемый вирус саркомы Рауса, который поражает птиц. Позже стало очевидно, что вирус может вызывать рак и у млекопитающего — один из папилломавирусов вызывает рак кожи кролика.

#### Задачи ветеринарной вирусологии

-Изучение структуры, химического состава, биологии, генетики и селекции вирусов, взаимодействие вируса и клетки, устойчивость вирусов к различным факторам;

-Разработка эффективных методов борьбы с вирусными болезнями;

-Совершенствование существующих и разработка новых методов диагностики вирусных болезней.

Для ликвидации вирусных заболеваний животных и недопущения их заноса на территорию России и на отдельные территории и животноводческих комплексов необходимо предпринимать самые строгие меры. Это прежде всего вакцинация восприимчивого поголовья (ящур, болезнь Ньюкасла), недопущение заноса заболеваний, своевременная диагностика.

### Вопросы для самоконтроля

1. Что является объектом изучения вирусологии?

2. Как подразделяется вирусологии в зависимости от объектов изучения?
3. Какой ученый первым впервые открыл вирус табачной мозаики?
4. Кто и когда впервые предложил культивировать вирусы на культурах клеток?
5. Перечислите вирусные заболевания, входящие по классификации Международного эпизоотического в группу А.
6. Назовите задачи ветеринарной вирусологии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс] : учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. - Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с.: ил. - [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znanium.com>]. <http://znanium.com/bookread2.php?book=508936> ISBN 978-985-06-2237-2. дата обращения – 20.06.2017 г.
2. Вирусология и биотехнология / Белоусова Р.В., Ярыгина Е.И., Третьякова И.В., Калмыкова М.С. Издательство "Лань", 2016г.- 220 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <https://e.lanbook.com>] <https://e.lanbook.com/reader/book/88026/#1> ISBN: 978-5-8114-2266-1. дата обращения – 20.06.2017 г.
3. Луканин А. В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств/Луканин А.В. - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. - 312 с.: 60x90 1/16. - (Высшее образование) [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znanium.com>] <http://znanium.com/bookread2.php?book=527386> ISBN 978-5-16-011479-8. дата обращения – 20.06.2017г.
4. Молчанов Г. И. Фармацевтические технологии: современные электрофизические биотехнологии в фармации: Уч. пос. / Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Л.М. Кубалова. - 2-е изд. - М.: Альфа-М: ИНФРА-М, 2014. - 336 с.: ил.; 60x90 1/16. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znanium.com>] <http://znanium.com/bookread2.php?book=314485> ISBN 978-5-98281-260-5

## Лекция №2

### Культивирование вирусов

#### 2.1. Обзор живых систем для культивирования вирусов

В настоящее время существуют следующие методы культивирования вирусов:

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

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

Ту или иную инфекцию иногда изучают на животных нескольких видов, обладающих разной чувствительностью к данному вирусу, что позволяет дифференцировать вирусы, вызывающие клинически сходные симптомы болезни (например, ящур, везикулярный стоматит, везикулярная экзантема и везикулярная болезнь свиней).

**На чувствительность животных к вирусам влияют следующие факторы.**

1. Возраст.
2. Наличие неспецифических ингибиторов, которые выполняют защитную функцию организма.
3. Пол животных. Наиболее чувствительны особи женского пола — самки (болезнь Марека), менее — мужского пола (самцы).
4. Генетические линии. Одни животные более чувствительны, другие — резистентны.

*По генетическим качествам лабораторных животных делят на четыре группы:*

- 1) животные смешанного происхождения, полученные от разных животноводов, такие животные гетерогенны;
- 2) животные, полученные непосредственно из одного источника, однако генетически такие животные вариабельны;
- 3) инбредные линии животных. Их получают в результате спаривания брата с сестрой или родителей с детьми по крайней мере не менее 20 поколений. При таком методе разведения достигается все возрастающая степень гомозиготности. Из большого числа инбредных линий в качестве примера можно указать две линии мышей: инбредная линия СЗН, полученная Стронгом (1920 г.) путем скрещивания самок мышей Bagg-Albino с самцами ДВА (мыши этой линии имеют светло-коричневую окраску).

4) однородные гибриды F1. Высокая степень гетерозиготности, характерная для каждого гибрида, связана здесь с генетическим однообразием, которое соответствует степени гомозиготности родительских линий. Как правило, однородные гибриды P1 менее изменчивы, чем обе родительские линии.

Отрицательная сторона выделения вируса на лабораторных животных — возможность диагностических ошибок вследствие активации скрытого вирусоносительства.

В последнее время для обнаружения вируса в определенном окружении используют «сторожевых» животных, т. е. животных, выставляемых в качестве поста в целях выявления инфекционного агента. В лабораториях таких животных используют для выявления утечки вируса.

Для некоторых вирусологических работ, например при выделении вируса с невыясненными болезнетворными свойствами, необходимо использовать гнотобиотов. Термин «гнотобиоты» объединяет две категории животных: безмикробных (стерильных), не содержащих никаких жизнеспособных микробов, и гнотифор — носителей одного (моногогнотофоры), двух (дигнотофоры) или более (полигнотофоры) микроорганизмов.

Безмикробных животных все шире применяют в вирусологических исследованиях, так как обычные животные часто являются латентными вирусоносителями, что сказывается на результатах экспериментов. Доказана большая чувствительность гнотобиотов к вирусной инфекции. В настоящее время безмикробные животные по динамике роста делятся на три группы:

I — обезьяны, поросята, цыплята растут лучше обычных животных или наравне с ними;

II — крысы, мыши, собаки, кошки растут наравне с обычными животными; III — морские свинки, кролики, козлята, ягнята растут хуже обычных животных.

Особое значение среди гнотобиотов занимают СПФ-животные, которые свободны только от патогенных микроорганизмов. В их организме имеются все необходимые для нормальной жизнедеятельности бактерии и вирусы, которые в совокупности создают группу так называемой резидентной (полезной) микрофлоры. В настоящее время получены лабораторные СПФ-животные — крысы, морские свинки, кролики, поросята, птицы и др.

Другим недостатком выделения вирусов на животных является то, что для их содержания и кормления требуются немалые материальные затраты.

#### **Способы заражения животных**

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

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

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

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

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

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

#### **Культивирование вирусов на куриных эмбрионах**

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

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

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

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

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

#### **Условия, влияющие на размножение вирусов в куриных эмбрионах.**

1. **Температура** от 35 до 37 °С является оптимальной для размножения вирусов гриппа.

2. **Возраст эмбриона.** В зависимости от вида вируса, способа заражения и задач исследования используют эмбрионы в возрасте 8—12 дней. Для культивирования вирусов гриппа чаще берут 9—10-дневные эмбрионы.

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

4. **Метод заражения.** При заражении в амнион и желточный мешок вирус осповакцины накапливается медленно и в низких титрах, а эмбрионы погибают через 48 ч, поражения на оболочках появляются в меньшем количестве. При заражении на ХАО поражения образуются чаще. При инфицировании же в аллантоисную полость эмбрионов погибает значительно меньше. При нанесении вируса в небольших концентрациях на ХАО гемагглютинины накапливаются в больших концентрациях, чем при заражении в аллантоисную оболочку.

#### ***Заражение куриных эмбрионов.***

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

Яйца заражают при помощи стерильных шприца для туберкулинизации и специальных игл. Место заражения на яйце заливают парафином.

Учитывая патогенность исследуемых вирусов, работы ведут в маске, резиновых перчатках и защитных очках.

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

***Заражение в амнион.*** Применяют главным образом для выделения вирусов из материала клинических проб. Инфицированный материал, введенный в полость амниона, заглатывается эмбрионом, а также попадает в дыхательные пути.

***Заражение на хорионаллантоисную оболочку.*** Чаще всего используют для выделения и культивирования вирусов, образующих на оболочке бляшки или оспины (вирусы оспы, инфекционного ларинготрахеита птиц и др.), а также для титрования этих агентов, так как число инфекционных частиц можно рассчитать по количеству бляшек или оспин.

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

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

***Наблюдение за зараженными эмбрионами.*** Длительность наблюдения зависит от вируса и дозы его введения. Эмбрионы просвечивают 2 раза в день — в

начале и в конце работы, погибшие вынимают и исследуют. Результаты наблюдений записывают в протоколы исследований.

Отрицательный результат заражения не исключает присутствия вируса в исследуемом материале. Он может свидетельствовать о том, что вируса ввели слишком мало или что к данному вирусу эмбрион нечувствителен. Для исключения первого предположения необходимо провести 1—2 пассажа.

#### ***Дезмбринированные яйца.***

В основе метода лежит удаление эмбриона из яйца в период, когда к его скорлупе изнутри полностью прилегает хорионаллантоисная оболочка. Если внутрь такого яйца добавить питательную среду, то образуется своеобразная культура ткани, в которой может размножаться вирус.

#### **Недостатки метода культивирования вирусов в куриных эмбрионах:**

- куриные эмбрионы могут быть носителями микроорганизмов (сальмонеллы, туберкулезная палочка), в том числе вирусов (лейкоз птиц, бронхит кур и др.) и противовирусных антител;
- не все вирусы культивируются в куриных эмбрионах.

### ***ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК В ДИАГНОСТИКЕ ВИРУСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ***

Внедрение метода культивирования клеток и тканей в вирусологию и диагностику вирусных болезней позволило не только познать глубже сущность вирусов, но и расшифровать этиологию ряда болезней, создать высокоэффективные противовирусные вакцины (живые и убитые) для их профилактики.

Метод культуры клеток заключается в том, что от убитого животного как можно быстрее после клинической смерти берут ткань или клетки и до наступления биологической смерти помещают их в соответствующие питательные среды и условия, обеспечивающие поддержание процессов жизнедеятельности. Наряду с множеством других преимуществ метод культуры тканей относительно дешев и поэтому может быть использован массово.

Культура тканей позволяет получить достаточно чистый вирус (с небольшим количеством чужеродных антигенов), что очень важно при изготовлении сывороток и антигенов для серологических реакций.

В настоящее время в практической вирусологии широко используются не только первично-трипсинизированные, но и перевиваемые, и диплоидные клетки.

#### **2.2. Культуры клеток: классификация, особенности, преимущества перед другими живыми системами.**

Культивирование вирусов в культурах тканей применяют в следующих случаях:

- для замены лабораторных и домашних животных;
- получения большого количества вирусов, необходимых для производства биологических препаратов — вакцин, сывороток и диагностикумов;
- изучения развития вирусов в зараженных клетках.

**Культура тканей** — сборное понятие, обозначающее систему, в которой клетки, ткани или органы сохраняют жизнеспособность или способность размножаться *in vitro* более 24 ч. В зависимости от вида биологического объекта различают: **культуру клеток** — термин, который обозначает рост клеток *in vitro* и включает в себя также рост единичных клеток (клетки в культуре не образуют ткань); **культуру тканей или органов** — термин, который обозначает поддержание роста

тканей, зачатков органов или их частей *in vitro* при сохранении их дифференцировки, структуры и (или) функции.

#### **Культивирование клеток.**

Для роста и размножения клеток вне организма необходим комплекс физико-химических факторов. Для клеток млекопитающих и птиц оптимальная температура размножения колеблется в пределах 36...38,5°C. Для поддержания жизнедеятельности клеток большое значение имеет солевой состав питательной среды, создающий необходимую буферность и изотоничность. Для роста клеток животных обязательно присутствие в среде ионов Ca<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg, Cl, карбонатов и фосфатов, которые входят в состав всех физиологических солевых растворов. Оптимальный рост и развитие клеток возможны в среде при pH 7,2...7,4; значительное отклонение от указанного оптимума отрицательно сказывается на росте культуры клеток. Для роста клеток обязательно кислород и диоксид углерода, аминокислоты, витамины, глюкоза.

В зависимости от входящих компонентов питательные среды делят на две группы: 1) содержащие естественные компоненты (сыворотку, амниотическую жидкость и др.); 2) синтетические и полусинтетические.

Натуральные среды состоят из смеси соответствующего солевого раствора (Хенкса, Эрла), сыворотки (животных и человека), тканевого экстракта (эмбрионов кур, коров, человека), гидролизата лактальбумина.

**Культуры тканей различают в зависимости от условий выращивания клеток.**

**1. Культуры переживающих тканей** в жидкой среде и на агаре, которые или вообще не размножаются *in vitro*, или дают очень слабый рост, т. е. в них отсутствует процесс размножения клеток.

**2. Культуры растущих клеток** – клетки активно делятся и размножаются

**Однослойная культура клеток, монослой** — клетки, растущие в один слой на определенной поверхности (первично-трипсинизированные культуры, культура перевиваемых и диплоидных клеток)

**Первичная культура** — культура, для получения которой использованы клетки, ткани или органы, взятые непосредственно из организма.

**Клеточная линия** получается из первичной культуры после первого пассажа. Складывается из большого количества клеточных линий, представленных в первичной культуре.

**Суспензионная культура** — тип культуры, при котором клетки размножаются во взвешенном состоянии в питательной среде.

**Стабильная (перевиваемая) клеточная линия** — клеточная линия, обладающая способностью к неограниченному количеству пассажей.

Наиболее распространены культуры клеток, выделенные из нормальных и раковых тканей человека.

Преимущества перевиваемых клеток: независимость от источников тканей, так как клетки пересеваются бесконечно, на клетки не влияют большие концентрации антибиотиков, соответствие стандартному состоянию.

Недостатки перевиваемых клеток безграничный рост — свойство опухолевых клеток, быстрое наступление деструктивных изменений.

**Диплоидная клеточная линия**—линия клеток, 75% которой имеют такой же кариотип, как и нормальные клетки того вида, из которого они выведены. Культуры диплоидных клеток свободны от микоплазм и латентных (скрытых) вирусов.

**Гетероплоидная клеточная линия** — линия клеток, которая содержит менее 75 % клеток с диплоидным набором хромосом. Это не означает, что клетки имеют характер новообразования или обладают способностью к неограниченному росту *in vitro*. При описании гетероплоидной клеточной линии следует указать наряду с кариотипом процент клеток исходной линии.

**Субкультура** — перенос клеток из одной системы в другую, пассаж.

**Эксплантат** — вырезанный кусок ткани или органа, используемый для культуры *in vitro*.

**Клеточный штамм** - выводится из первичной культуры или из клеточной линии путем селекции или клонирования клеток со специфическими свойствами (маркерами).

**Подштамм** -можно получить из штамма путем изоляции единичной клетки или группы клеток, обладающих свойствами, которыми не обладают остальные клетки штамма.

**Клон**— популяция клеток, полученная путем деления (митоза) одной клетки. Клон не всегда однороден и не должен быть таким, поэтому нельзя использовать термины «клон» или «клонированный» для обозначения однородной популяции клеток.

**Клонированный штамм или линия**— штамм или линия, выведенные из одного клона.

**Пассаж**— синоним субкультуры, т. е. перенос клеток из одной системы в другую. При употреблении этого термина необходимо отметить, что именно пассируется, так как вирусологи используют его для обозначения переноса выращиваемой жидкости, а не клеток.

**Число пассажей**— число переносов выращиваемых клеток из одной системы в другую.

**Интервал субкультивирования** — интервал между последующими пассажами. Этот термин не имеет ничего общего с определением «время генерации клеток».

**Время генерации клеток** — интервал между последующими делениями клеток. Лучше всего определять с помощью микрофотографии. Термин этот не идентичен термину «время удвоения популяции».

**Время удвоения популяции** . Термин касается всей популяции и определяет время, за которое количество клеток возрастает, например с  $1 \cdot 10^6$  до  $2 \cdot 10^6$ .

**Абсолютная эффективность посева** — процент единичных клеток, которые после внесения в систему для выращивания (посев) образуют колонии. Обязательно всегда сообщать общее число введенных клеток, тип посуды и условия (род питательной среды, температура, открытая или закрытая система, атмосфера, CO<sub>2</sub> и т. д.).

**Относительная эффективность посева** — процент посеянных клеток, образующих колонии по отношению к контролю, в котором за 100 % принимается абсолютная эффективность посева. Необходимо всегда сообщать общее число введенных клеток, условия выращивания и абсолютную эффективность посева в контроле.

**Фибробласты** — клетки веретенообразной или нерегулярной формы, образующие волокна. В культурах клеток невозможно морфологически отличить фибробласты от клеток многих других типов. В культурах органов и тканей, в

которых сохраняются связи между клетками, фибробласты можно идентифицировать морфологически.

**Фибробластоподобные клетки** — клетки неизвестного происхождения веретенообразной или нерегулярной формы.

**Эпителиальные клетки**— тесно лежащие рядом друг с другом клетки, которые образуют слой с очень маленьким количеством межклеточного вещества.

**Изменение культуры** — постоянное изменение собственных свойств, так изменения морфологические, хромосомальные, чувствительности к вирусу, потребностей питания, способности роста, и т. д. **Термин «трансформация»** следует употреблять только тогда, когда изменения являются следствием введения в клетки нового генетического материала.

В настоящее время термин «культура тканей» включает в себя в широком смысле все методы — от культивирования отдельных клеток до культивирования целых органов

#### *Недостатки культур тканей*

1. **Загрязнение бактериями, дрожжами и грибами.**
2. **Вирусная контаминация.**

#### **Вопросы для самоконтроля**

1. Перечислите живые системы для культивирования вирусов.
2. Перечислите недостатки различных живых систем для культивирования вирусов?
3. Дайте определение понятию «Культура тканей»?
4. Как подразделяются культуры тканей в зависимости от условий выращивания клеток.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс] : учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. - Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с.: ил. - [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znanium.com>]. <http://znanium.com/bookread2.php?book=508936> ISBN 978-985-06-2237-2. дата обращения – 20.06.2017 г.
2. Вирусология и биотехнология / Белоусова Р.В., Ярыгина Е.И., Третьякова И.В., Калмыкова М.С. Издательство "Лань", 2016г.- 220 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <https://e.lanbook.com>] <https://e.lanbook.com/reader/book/88026/#1> ISBN: 978-5-8114-2266-1. дата обращения – 20.06.2017 г.
3. Луканин А. В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств/Луканин А.В. - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. - 312 с.: 60x90 1/16. - (Высшее образование) [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znanium.com>] <http://znanium.com/bookread2.php?book=527386> ISBN 978-5-16-011479-8. дата обращения – 20.06.2017г.
4. Молчанов Г. И. Фармацевтические технологии: современные электрофизические биотехнологии в фармации: Уч. пос. / Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Л.М. Кубалова. - 2-е изд. - М.: Альфа-М: ИНФРА-М, 2014. - 336 с.: ил.; 60x90 1/16. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znanium.com>] <http://znanium.com/bookread2.php?book=314485> ISBN 978-5-98281-260-5

## Лекция №3

### Общая характеристика вирусов. Структура и химический состав вирионов

#### 3.1. Отличия вирусов от бактерий и хламидий. Особенности принципа организации вирусов (морфология, типы симметрии, размер, простые и сложные вирусы)

В отличие от бактерий и риккетсий вирусы характеризуются следующими свойствами:

1. **Вирусы имеют малую величину**, а поэтому обладают свойствами фильтроваться через все существующие бактериальные фильтры (Зейтца, Беркефельда, Шамберлана). Поскольку вирусы так малы, их под обычным микроскопом не видно. Величина вирионов колеблется от 8 до 332 нм.

2. **Вирусы являются строгими (облигатными, абсолютными) внутриклеточными паразитами.**

3. **Вирусы не имеют собственного обмена веществ (метаболизма), живут и размножаются за счет ферментов и веществ клетки, в которой они паразитируют.**

4. **При паразитировании в клетках вирусы вызывают образование специфических телец-включений внутри клеток.** Располагаются такие тельца-включения либо в ядре, либо в цитоплазме клетки (внутриядерные или цитоплазматические тельца). Обнаружение телец-включений под микроскопом имеет большое диагностическое значение (при бешенстве, оспе, гриппе, чуме и вирусном гепатите плотоядных, ларинготрахеите и бронхите кур и др.).

5. **Вирусы не имеют клеточного строения и они просто устроены, нет цитоплазмы, рибосом и ядра.** Они, как правило, в центре содержат нуклеиновую кислоту в виде спирали, которая может быть вытянута (у палочковидных вирусов) или дополнительно свернута в форме клубка (у сферических вирионов). Снаружи нуклеиновая кислота покрыта белковой оболочкой, состоящей из молекул белка. Каждая субъединица оболочки называется капсомером, а вся белковая оболочка - капсидом. В связи с этим всю вирусную частицу (вирион) называли нуклеокапсид, а сейчас называют «вирион». Укладка капсомеров на вирусной нуклеиновой кислоте у разных вирусов неодинакова. Если вирусная нуклеиновая кислота имеет вид спирали (у палочковидных вирусов), то капсомеры располагаются по ходу спирали, окружая нуклеиновую кислоту в виде чехла (муфты). В этом случае говорят о спиральном виде симметрии. Если же эта нуклеиновая кислота имеет вид спирали, свернутой в клубок (как свернутый морской канат), то капсомеры располагаются снаружи этого клубка в виде правильного многогранника (у сферических вирусов). В этом случае говорят о кубическом типе симметрии. Имеются вирусы (бактериофаги) с комбинированным типом симметрии.

Нуклеиновая кислота вируса является носителем вирулентных и наследственных свойств, а белок играет защитную роль для нуклеиновой кислоты и имеет значение как антиген. По строению белка вирусы различны и антигенное строение их поэтому неодинаково.

У крупных вирусов кроме этих структур имеется еще вторая (липопротеидная) оболочка, называемая суперкапсидом или «пеплос». Липиды, входящие в состав этой оболочки, имеют обычное клеточное происхождение.

Нуклеиновая кислота занимает 20-45%, а остальное белок. В состав белков вируса входит до 18 аминокислот. В химическом отношении вирусы содержат нуклеиновые кислоты, белки, углеводы и могут быть жиры.

6. **Вирусы, как правило, содержат только одну из нуклеиновых кислот - либо ДНК (дезоксирибонуклеиновая кислота), либо РНК (рибонуклеиновая кислота).** Поэтому вирусы делят на ДНК и РНК-содержащие (Рибовира и Деоксивири). В отличие от других организмов у вирусов ДНК и РНК могут быть одно или двухнитчатые. Цепь нуклеиновой кислоты состоит из нуклеотидов, которые в химическом отношении состоят из остатка фосфорной кислоты, азотистых оснований (пуриновых и пиримидиновых) и углеводов (рибо- за или дезоксирибоза).

7. **Вирусы имеют разобщенный (дисъюнктивный) тип размножения, который заключается в том, что при внедрении в живую клетку вируса клетка начинает продуцировать вирусный белок и вирусную нуклеиновую кислоту за счет своих запасов и материалов, но синтезируются они в разных участках клетки (т. е. разобщенно), а затем идет их компанация (соединение, сборка) и образуется новая вирусная частица - вирион.** Каждая зараженная клетка продуцирует тысячи новых вирионов, способных заразить соседние здоровые клетки. Размножение вирусов называют репродукцией.

8. **Вирусы слабо устойчивы к гниению и нагреванию.** Поэтому при взятии материала для лабораторных исследований важно, чтобы он был свежим.

9. **Вирусы устойчивы к холоду и хорошо переносят минусовые температуры.** В условиях лаборатории вирусосодержащий материал сохраняют в морозилке обычного холодильника (-20°, -15° С), однако более длительно сохраняется вирус в низкотемпературных холодильниках при -70° С или в жидком азоте.

10. **У многих вирусов выражен тканевой тропизм, т. е. локализация в определенных тканях организма.** Однако тропизм носит непостоянный характер и может зависеть от вида животного, возраста и стадии течения заболевания.

11. **Некоторые вирусы способны кристаллизоваться и быть в кристаллической форме.**

#### *Структура и состав вирусов*

Вирусы не имеют клеточного строения. Полная вирусная частица называется **вирион**.

По строению различают :

1. **Простые (безоболочечные) вирусы.** Состоят из нуклеиновой кислоты-нуклеотида и белковой оболочки, называемой **капсид (от лат. capsula-футляр)**. Капсид состоит из повторяющихся морфологических субъединиц – **капсомеров**. Нуклеиновая кислота и капсид взаимодействуют друг с другом, образуя **нуклеокапсид** (т.е. белковый чехол (капсид) в котором заключен вирусный геном (ДНК или РНК).

2. **Сложные (оболочечные) вирусы** снаружи капсида окружены липопротеиновой оболочкой (суперкапсид или **пеплосом**), которая играет важную роль в инфекционности. Эта оболочка является производной структурой от мембран вирусинфицированной клетки. Она приобретается вирионом в тот момент, когда нуклеокапсид проникает через клеточную мембрану почкованием. Белки оболочки кодируются вирусом, а липиды заимствуются из мембраны клетки. На оболочке вируса расположены **гликопротеидные шипы (пепломеры)**. Под оболочкой некоторых вирусов находится матриксный **М-белок**, придающий дополнительную жесткость вирионам.

В настоящее время установлено, что капсомеры располагаются симметрично, причем у одной группы вирусов - по спирали (**спиральный тип симметрии**), у другой образуют многогранник, ограниченный определенным числом равносторонних треугольников (**кубический тип симметрии**), у третьей имеют более сложную структуру (**комбинированный тип симметрии**).

**Спиральный тип** симметрии наблюдается, как правило, у вирусов крупных размеров. Характерными особенностями вирусов со спиральной симметрией являются не только их сравнительно большие размеры, но и полиморфизм. Капсиды их состоят из капсомеров, уложенных в виде спирали. У вирусов **сферической формы** спираль укладывается витками с разным диаметром таким образом, что формируется шарообразная оболочка, напоминающая клубок свернутого канатика. С поверхности эти структуры покрыты второй оболочкой (пеплосом), содержащей липиды и выступы (ворсинки) антигенной природы. Под спиралеобразной сферической оболочкой таких вирусов располагается нуклеиновая кислота.

**Вирусы, обладающие кубической (икосаэдрической) симметрией, иначе называют** сферическими, так как их полиэдрические вирионы кажутся шаровидными, хотя фактически имеют форму многогранников.

Вирионы с кубической симметрией могут быть построены в виде тетраэдра, октаэдра или икосаэдра, причем последний тип наиболее распространенный. Икосаэдр - это правильный многогранник, имеющий 20 граней, 12 вершин и 30 ребер. Капсид защищает центральную часть вириона, в которой расположена нуклеиновая кислота. По этому принципу построены вирусы герпеса, имеющие наружную суперкапсидную оболочку, аденовирусы, пикорнавирусы (возбудители полиомиелита, ящура и др.)

**Сложные вирусы** представлены несколькими группами. У миксовирусов (гриппа, чумы птиц и др.) РНК с белковой оболочкой уложена по спирали, а поверх нуклеокапсида находится сферическая липопротеидная оболочка с шиповидными отростками. К сложным принадлежат также вирусы группы оспы, которые превосходят все известные вирусы по размерам и сложности строения.

Особую группу вирусов составляют **бактериофаги**. У всех разновидностей бактериофагов есть головка, построенная по типу кубической симметрии; у большинства - хвостовой отросток со спиральным строением. Головка бактериофага имеет форму многогранника, от одной из вершин которого отходит хвостовой отросток, оканчивающийся шипами

Поверхность головки покрыта белковой оболочкой, которая состоит из однородных белковых субъединиц. В полости головки располагается нуклеиновая кислота (ДНК или РНК) и небольшое количество белка. Хвостовой отросток состоит из полого стержня, заканчивающегося шестиугольной пластинкой с шестью шипами фибриллами.

Хвостовой отросток около головки бактериофага окружен воротничком, к которому прикреплен чехол, покрывающий весь стержень. Чехол хвостового придатка бактериофага состоит из спирально свернутого белкового тяжа, обладающего способностью сокращаться подобно мышцам. Эта способность к сокращению имеет определенное значение при внедрении ДНК в бактериальную клетку.

#### **Вирусные элементарные тельца и внутриклеточные включения.**

В конце XIX в. при изучении мазков-отпечатков и срезов из органов животных, больных оспой, и при некоторых других заболеваниях в клетках были обнаружены особые мелкие образования, названные элементарными тельцами. С внедрением в

практику вирусологических исследований электронной микроскопии подобные тельца выявлены при большинстве вирусных болезней человека и растений. Установлено, что они представляют собой зрелые вирусные частицы, способные при попадании в новые клетки вызывать репродукцию подобных себе частиц. Термин «элементарные тельца» - синоним вирионов.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Вирусные белки имеют молекулярную массу 5—200 кД. Наиболее просто устроенные вирусы (вирусы-сателлиты, дефектные вирусы) кодируют синтез только одного белка, многие патогенные вирусы кодируют синтез 5—10 белков, крупные вирусы, такие как вирусы оспы, герпесвирусы, кодируют синтез до 200 белков. Хотя

это немного по сравнению с клетками про- и эукариотов (кодируют соответственно более 5000 и 100000 белков).

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

#### **Нуклеиновые кислоты.**

У вирусов они являются носителями наследственности и определяют инфекционные свойства.

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

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

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

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

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

#### **Вирусные геномы**

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

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

Геномы полиома-, папиллома-, гепадна- и цирковирусов представлены кольцевой ДНК. ДНК гепаднавирусов частично двуспиральная, частично односпиральная. ДНК вирусов полиомы и папилломы является суперспиральной. Большинство линейных вирусных ДНК обладает способностью приобрести циркулярную конфигурацию, которая требуется для репликации по вращающемуся

кольцевому механизму. У некоторых ДНК-вирусов (так же как у РНК-ретровирусов) имеются концевые повторяющиеся последовательности.

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

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

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

Различные семейства вирусов позвоночных значительно различаются по структуре и функции генома. Основные типы вирусных геномов можно представить следующим образом:

- 1) двуцепочечной линейной молекулой ДНК с открытыми (герпесвирусы, аденовирусы, иридовирусы) или ковалентно связанными концами (вирусы оспы, асфаровирусы);
- 2) одноцепочечной линейной молекулой ДНК (парвовирусы);
- 3) одноцепочечной кольцевой молекулой ДНК (цирковирусы);
- 4) двуцепочечной кольцевой молекулой ДНК (папилломавирусы, полиомавирусы);
- 5) частично двуцепочечной кольцевой незамкнутой молекулой ДНК (гепадна-вирусы);
- 6) одноцепочечной молекулой РНК, являющейся мРНК (положительно-геномные вирусы: пикорнавирусы, тогавирусы, флавивирусы, астровирусы, калици-вирусы, коронавирусы, артеривирусы, нодавирусы);
- 7) одноцепочечной единой (рабдовирусы, парамиксовирусы, филовирусы, бор-навирусы) или фрагментированной (ортомиксовирусы) линейной молекулой РНК, комплементарной мРНК — отрицательно-геномные вирусы;
- 8) одноцепочечной фрагментированной кольцевой ковалентно несвязанной отрицательной или двуполярной РНК (буньявирусы, аренавирусы);
- 9) двуцепочечной линейной фрагментированной молекулой РНК (реовирусы, бирнавирусы);
- 10) двумя идентичными линейными молекулами плюс-РНК, являющимися матрицами для синтеза ДНК (ретровирусы).

Молекулярная масса ДНК различных вирусов позвоночных варьирует в широких пределах: от 0,7—1,5 МД у цирковирусов и парвовирусов, до 150-200 МД у вирусов оспы. Молекулярная масса генома у РНК вирусов колеблется менее значительно - от 2,0 до 20,0 МД.

### Вопросы для самоконтроля

1. Назовите отличия вирусов от бактерий и хламидий.
2. Назовите типы вирусов по строению.
3. Какой химический состав имеют вирусы.
4. Какую функцию у вирусов выполняют структурные вирусные белки.
5. Какую функцию у вирусов выполняют неструктурные вирусные белки.
6. Какую функцию у вирусов выполняют нуклеиновые кислоты, липиды у углеводов.
7. Перечислите основные типы вирусных геномов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс] : учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. - Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с.: ил. - [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>]. <http://znaniium.com/bookread2.php?book=508936> ISBN 978-985-06-2237-2. дата обращения – 20.06.2017 г.
2. Вирусология и биотехнология / Белоусова Р.В., Ярыгина Е.И., Третьякова И.В., Калмыкова М.С. Издательство "Лань", 2016г.- 220 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <https://e.lanbook.com>] <https://e.lanbook.com/reader/book/88026/#1> ISBN: 978-5-8114-2266-1. дата обращения – 20.06.2017 г.
3. Луканин А. В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств/Луканин А.В. - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. - 312 с.: 60x90 1/16. - (Высшее образование) [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=527386> ISBN 978-5-16-011479-8. дата обращения – 20.06.2017г.
4. Молчанов Г. И. Фармацевтические технологии: современные электрофизические биотехнологии в фармации: Уч. пос. / Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Л.М. Кубалова. - 2-е изд. - М.: Альфа-М: ИНФРА-М, 2014. - 336 с.: ил.; 60x90 1/16. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=314485> ISBN 978-5-98281-260-5

## Лекция № 4 Таксономия вирусов

### 4.1 Основные принципы современной таксономии и номенклатуры вирусов, их научное и практическое значение. Прионы и вириоды, их место в таксономии.

#### Номенклатура вирусов.

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

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

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

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

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

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

**Род** - это группа видов с определёнными общими характеристиками, отличающимися от вирусов других родов. Критерии для выделения родов включают в себя: феномены генетических взаимодействий, круг восприимчивых хозяев,

патогенность, географическое распространение, способ передачи, антигенные свойства.

Названия родов вирусов оканчиваются на *-virus*.

**Семейство** - это группа родов с общими характеристиками, отличающимися от вирусов других семейств. Критерии, используемые для деления на семейства, включают в себя фундаментальные свойства вирионов: тип и структуру нуклеиновой кислоты, наличие липопротеиновой оболочки, стратегию вирусного генома, размер и морфологию вирионов.

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

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

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

**ПРИОНЫ** — общее определение возбудителей категории **прионных инфекций**, предложенное Prusiner (1982). Слово — акроним, образовано по аналогии со словом «вирион» от англ. *proteinaceous infection particle*. В буквальном значении **прионом** называется белковая инфекционная частица очень маленького размера, устойчивая к инактивации факторами, влияющими на нуклеиновые кислоты

**Прионы** — неканонические патогены, вызывающие трансмиссивные губкообразные энцефалопатии: человека (куру, болезнь Крейтцфельда—Якоба, синдром Герстманна—Штреусслера—Шейнкера, семейная фатальная бессонница, амиотрофический лейкоспонгиоз); животных (скрепи овец и коз, трансмиссивная энцефалопатия норок, хроническая изнуряющая болезнь находящихся в неволе оленя и лося, губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, губкообразная энцефалопатия кошек).

Прионные инфекции характеризуются губкообразными изменениями мозга (трансмиссивные губкообразные энцефалопатии). При этом развиваются церебральный амилоидоз (внеклеточный диспротеиноз, характеризующийся отложением амилоида с развитием атрофии и склероза ткани) и астроцитоз

#### **PrP (cellular prion protein)**

Прионный белок обозначается как PrP (англ. prion protein), он может быть в двух изоформах; клеточной, нормальной (PrP<sup>C</sup>) и измененной, патологической (PrP<sup>CS</sup>). PrP<sup>C</sup> — клеточная, нормальная изоформа прионного белка с мол. массой 33-35 кД, детерминируется геном прионного белка (прионный ген — PrNP находится на коротком плече 20-й хромосомы человека). Нормальный PrP<sup>C</sup> появляется на поверхности клетки (заякорен в мембрану гликопротеином молекулы), чувствителен к протеазе. Возможно, он регулирует суточные циклы гормонов, передачу нервных импульсов, поддерживает циркадианные ритмы и метаболизм меди в ЦНС.

**PrP<sup>CS</sup>** (от названия прионной болезни овец *скрепи* — scrapie) и другие, например PrP<sup>CJD</sup> (при болезни Крейтцфельда—Якоба) — патологические, измененные посттрансляционными модификациями, изоформы прионного белка с мол. массой 27-30 кД. Такие прионы устойчивы к протеолизу (к протеазе К), к излучениям, высокой температуре, формальдегиду, глютаральдегиду, бета-пропиолактону; не вызывают воспаления и иммунной реакции. Отличаются способностью к агрегации в амилоидные фибриллы, гидрофобностью и вторичной структурой в результате

повышенного содержания бета-складочных структур (более 40 % по сравнению с 3% у PrP<sup>51</sup>). PrP<sup>51</sup> накапливается в плазматических везикулах клетки.

Итак, собственно прионный белок может существовать в двух формах — **нормальной и инфекционной**, и такое превращение нормального прионного белка в его инфекционную форму является фундаментальным событием, лежащим в основе размножения инфекционных прионов.

Оказалось, что процесс размножения и накопления инфекционных прионов в зараженном организме принципиально отличается от процесса размножения всех известных инфекционных агентов, в том числе и самых мельчайших, например бактерий, которые увеличиваются в числе в результате простого деления, а также от процесса размножения вирусов, для которого существует специальный термин — *репродукция*, в результате которой образуются новые вирусные частицы – вирионы. Откуда берутся и как накапливаются в организме инфекционные прионы? Да и уместно ли в данном случае слово «берутся»? С прионами все происходит как в нашей обыденной жизни в которой «дурные примеры заразительны». Так вот, случае попадания молекулы инфекционного прионного белка в здоровый организм в результате соединения одной молекулы **инфекционного** прионного белка, обозначаемой PrP<sup>Sc</sup>, с одной молекулой **клеточного (нормального) белка**, обозначаемой как PrP<sup>c</sup>, в молекуле последнего происходит пространственные изменения.

Таким образом, в отличие от всех известных инфекционных агентов, инфекционный прионный белок не синтезируется в организме заново, а накапливается исключительно за счет превращения (конформации) молекул нормального клеточного белка в инфекционные.

Интересно, что, помимо приобретения нормальным клеточным белком инфекционных свойств, он получает «в прионе» высокую устойчивость к проникающей радиации, разлагающему действию некоторых ферментов и к повышенной температуре.

Кроме вирусов и прионов к царству *Vira* относятся и вирусоподобные агенты, обладающие исключительно малым геном. Эти агенты были обнаружены при некоторых заболеваниях растений. Они содержат молекулу РНК, вес которой приблизительно равен 2—5 10<sup>4</sup> дальтон, или представляют собой низкомолекулярную РНК (около 10<sup>4</sup> дальтон), лишенную белковой оболочки. В связи с тем, что эти агенты обладают более простой организацией, чем обычные вирусы, их выделили в группу субвирусов, именуемых **вириды**. Эти возбудители существуют исключительно или преимущественно в репродуктивной фазе, используя для своей репликации ферментативные системы клетки хозяина. Эти агенты не возникают из обычных вирусов и не превращаются в них.

## 4.2. Семейства вирусов позвоночных ДНК-СОДЕРЖАЩИЕ ВИРУСЫ

### 1. Семейство вирусов Оспы (Family Poxviridae)

Семейство вирусов Оспы (от англ. pox - пустула, язва) включает в себя большую группу вирусов, поражающих позвоночных и насекомых, разделенных на два подсемейства: Chordopoxvirinae - вирусы оспы позвоночных и Entomopoxvirinae - вирусы оспы насекомых.

В подсемейство Chordopoxvirinae входит 8 родов: род Orthopoxvirus (от греч. orthos - прямой, правильный): вирусы вакцины и натуральной оспы мышей, кроликов,

коров, грызунов, буйволов, верблюдов, лошадей, обезьян; род *Pararoxvirus* (от греч. *para* - около): вирусы контагиозного пустулёзного дерматита овец и коз, папулёзного стоматита крупного рогатого скота, язвенного дерматита овец; род *Aviroxvirus* (от лат. *avis* - птица): вирусы оспы кур, голубей, канареек, перепёлок и др.; род *Caprioxvirus* (от лат. *capri* - коза): вирусы оспы овец и коз, нодулярного дерматита крупного рогатого скота; род *Leporioxvirus* (от лат. *leporis* - заяц): вирусы миксомы и фибромы кроликов, зайцев, белок; род *Suipoxvirus* (от лат. *suis* - свинья): вирус оспы свиней; род *Molluscipoxvirus* (от лат. *molluskum* - моллюск): вирус контагиозного моллюска; род *Yatapoxvirus*: вирусы, патогенные для обезьян и человека, вызывают образование опухолей.

Вирионы поксвирусов крупные, имеют форму параллелепипеда (или яйцевидную, как в случае рода *Pararoxvirus*), Их размер— (300—450) X (170—260) нм. У них имеется внешняя оболочка и лежащее под ней сложное образование из тубулярных структур, а также внутреннее ядро, состоящее из ДНК-содержащей сердцевины и одного или двух боковых телец. Геном представляет собой одну молекулу двухцепочечной ДНК с мол. массой (85—250) • 10<sup>6</sup>. Вирусы имеют более 30 структурных белков и несколько ферментов (включая ДНК-зависимую транскриптазу). Репликация и сборка происходят в цитоплазме на «вирусных фабриках» (тельцах-включениях), а образующиеся вирионы выходят из клетки при помощи почкования (вирусы с внешней оболочкой) или в результате разрушения клетки (вирусы без внешней оболочки). У поксвирусов имеется общий группоспецифичный нуклеопротеиновый антиген, а вирусы рода *Orthopoxvirus* синтезируют невирионный гемагглютиноген.

## **2. Семейство Асфарвирусов (Family Asfarviridae)**

### **а. Вирус африканской чумы свиней**

Семейство представлено одним родом с одноименным названием асфаровирусы, типовым представителем которого является вирус африканской чумы свиней (АЧС). Этот вирус заражает только домашних и диких свиней семейства *Suidae*. Кустарниковые свиньи и бородавочники являются естественными хозяевами вируса (АЧС) в природе. У них не проявляются клинические признаки болезни при инфицировании высоковирулентными изолятами вируса АЧС, вызывающими летальную, геморрагическую болезнь у домашних свиней. Инфицирование кустарниковых свиней приводит к слабой репликации вируса и незначительному апоптозу лимфоцитов в печени, а также к относительно слабому распространению вируса в других лимфоидных тканях [1193]. Попытки заразить этим вирусом другие виды животных оказались безуспешными. Вирус АЧС размножается в нескольких типах клеток ретикулоэндотелиальной системы свиней и вызывает суровую лейкопению. **Асфаровирусы представляют собой оболочечные вирионы диаметром 175—215 нм, обладающие сложным икосаэдрическим капсидом ~180 нм в диаметре. Капсид состоит из 1892—2172 гексогональных структурных единиц, которые имеют вид гексогональных призм с отверстием в центре.**

Геном вируса АЧС представлен одной линейной молекулой двухцепочечной ДНК размером 170—190 тпн в зависимости от изолята. ДНК имеет ковалентно замкнутые концы с инвертированными повторами и петлями. Геном кодирует до 200 белков, из которых 34 идентифицированы в структуре очищенных вирионов и около 100 — в инфицированных клетках *Vero*.

Одна из наиболее отличительных особенностей АЧС состоит в том, что сыворотка инфицированных свиней не нейтрализует вирус.

### **Семейство Iridoviridae**

-род Ranavirus Вирус лягушек 3. Возможные члены рода — 5 вирусов

-род Lymphocystivirus Вирус лимфоцистоза камбалы 1. Возможный член рода — лимфоцистоза камбалы 2

Неклассифицированный вирус в семействе - Вирус серебряного карася 1

Вирионы иридовирусов имеют липидсодержащую внешнюю оболочку (отсутствующую у некоторых вирусов насекомых) к икосаэдрический нуклеокапсид. Диаметр вириона 125—300 нм. Геном представляет собой одну молекулу двухцепочечной ДНК с мол. массой  $(100—250) \cdot 10^6$ . Вирусы имеют более 20 структурных белков, в том числе несколько вирионных ферментов. Репликация происходит в цитоплазме (хотя ядро и необходимо для синтеза ДНК), а вирионы освобождаются в результате почкования или при разрушении клетки. Возбудители заболеваний человека не обнаружены

### **2. Семейство вирусов Герпеса (Family Herpesviridae)**

Семейство герпесвирусов (от греч. herpes - ползучий лишай) включает в себя более 80 представителей, разделённых на 3 подсемейства, в каждом - по 2-4 рода.

Подсемейство Alphaherpesvirinae:

- род Simplexvirus: вирус простого герпеса и др.; род Varicellovirus: вирусы болезни Ауески, инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота (инфекционного пустулёзного вульвовагинита), ринопневмонии лошадей и др.;

род вирусов, подобных вирусу болезни Марека: вирус болезни Марека и др.; род вирусов, подобных вирусу ларинготрахеита птиц: вирус инфекционного ларинготрахеита птиц.

Подсемейство Bethaherpesvirinae: род Cytomegalovirus: цитомегаловирус человека и др.; род Muromegalovirus: цитомегаловирус мышей и др.; род Roseolovirus: герпесвирусы человека 6 и 7.

Подсемейство Gammaherpesvirinae: род Lymphocryptovirus: вирус Эпштейна-Барр; род Phadinovirus: вирус злокачественной катаральной горячки крупного рогатого скота и др.

Вирусы семейства инфицируют широкий круг хозяев, а у млекопитающих вызывают различные поражения центральной нервной системы, глаз, слизистых оболочек и кожных покровов.

**Морфология и химический состав.** Вирионы герпесвирусов имеют округлую форму, диаметр от 85 до 250 нм и состоят из 4 структурных компонентов: сердцевина, капсиды, мембраны и липопротеидной оболочки. Сердцевина представлена непрерывной линейной двуспиральной молекулой ДНК с молекулярной массой  $10-12 \cdot 10^7$  Д, с содержанием Г+Ц 56-74%. ДНК обладает инфекционностью. Капсид имеет икосаэдрическую форму, содержит 162 капсомера и покрыт внутренней мембраной. Наружные структуры вириона состоят из двуслойной липопротеидной оболочки с выступами на поверхности (рис. 5, 6).

По химическому составу вирусы на 70% состоят из белка, 22% - липидов, 6,5% - ДНК и 1,5% - углеводов.

### **3. Семейство Аденовирусов (Family Adenoviridae)**

Семейство Аденовирусов (от греч. aden - железа) объединяет группу вирусов, поражающих животных, и включает в себя два рода:

- род Mastadenovirus: около 80 серотипов аденовирусов млекопитающих, выделенных от человека, обезьян, крупного рогатого скота, свиней, собак, лошадей, мышей;

- род Aviadenovirus: аденовирусы птиц, около 14 серотипов.

Морфология и химический состав вируса. Размеры аденовирусов - 70-80 нм, форма - сферическая. Нуклеоид представлен двуспиральной нефрагментированной инфекционной линейной молекулой ДНК с молекулярной массой  $2\cdot 3\cdot 10^7$  Д. Нуклеиновая кислота имеет в своём составе около 60 генов и несёт информацию для кодирования 30-50 белков, содержание Г + Ц - от 48 до 61%. Капсидная оболочка состоит из 252 капсомеров, имеющих кубический тип симметрии и форму икосаэдра. В вершинах его плоскостей находятся пентоны, имеющие отростки и отходящие в виде 12 антенн. Вирусы состоят из 86-88% белка и 12-14% ДНК

#### **4. Семейство Парвовирусов (Family Parvoviridae)**

В семейство Парвовирусов (от лат. parvus - маленький) входит более 30 вирусов, поражающих позвоночных и насекомых. Они составляют 3 рода:

род Parvovirus: парвовирусы свиней, крупного рогатого скота, лошадей, собак, кроликов и др.; род Dependovirus: аденоассоциированные вирусы человека и обезьян, крупного рогатого скота, собак и птиц; род Densovirus: парвовирусы, поражающие насекомых. Морфология и химический состав вирусов. Вирионы имеют диаметр 18-28 нм, состоят из центральной части и капсидной оболочки. Центральная часть, нуклеоид, представлена одно-спиральной линейной молекулой ДНК с молекулярной массой  $1,2\cdot 1,8\cdot 10^6$  Д, обладающей инфекционностью. Капсидная оболочка имеет кубический тип симметрии, форму икосаэдра и состоит из 32 капсомеров. Белки вируса составляют 63-81%, нуклеиновая кислота - 19-37% массы вириона.

#### **5. Семейство Poliоmaviridae**

Род Polyomavirus

Полиомавирусы крупного рогатого скота, африканских зеленых мартышек, павианов, хомячков, мышей, волнистых попугайчиков, ВК, JC, пневмотропный вирус мышей. Вакуолизирующий вирус почек кроликов, вирусы обезьян 12 и 40.

Полиомавирусы ранее входили в семейство Papovaviridae\*. В соответствии с решениями 7 Международного Конгресса по таксономии вирусов, с 1 января 2002 г. выделены в новое семейство — Polyomaviridae. Полиомавирусы человека широко распространены. Антитела к вирусам имеют около 75 % людей. Полиомавирусы обычно не вызывают болезнь, но иногда могут поражать почки (ВК-вирус, выделенный из мочи человека с пересаженной почкой) или глиальные клетки (JC-вирус, выделенный из мозга больного прогрессирующей многоочаговой лейкоэнцефалопатией) у иммуносупрессированных людей. Прототипом полиомавирусов является вирус обезьян (Simian virus, SV-40 или 0B-40) мартышек и макак. Для человека он не патогенен.

**Структура и репродукция.** Вирионы полиомавирусов — безоболочечные. Полиомавирусы имеют меньший размер (45 нм в диаметре), чем папилломавирусы, и содержат меньшее количество ДНК. Геном разделен на ранний, поздний и некодирующий регионы. Среди белков вирусов различают: ранние неструктурные белки, большой Т-антиген и малый t-антиген; поздние (капсидные) белки — VP1, VP2, VP3. Белок VP1 — главный капсидный белок. Он участвует в прикреплении вируса к клетке. При продуктивной инфекции вирус собирается в ядре и выходит при лизисе клетки. Геном полиомавирусов обычно интегрирован в геном трансформируемой клетки.

#### **6. Семейство Hepadnaviridae**

-Род Orthohepadnavirus Вирусы гепатита В человека, лесных сурков и земляных белок. Возможный член рода — вирус гепатита арктических белок

-Род *Avihepadnavirus* Вирус гепатита В уток, цапель

-Неклассифицированный вирус в семействе Вирус гепатита гусей Росса

Вирионы (называемый частицей Дейна) вируса гепатита В и сходных вирусов имеют внешнюю оболочку (содержащую липиды и HBsAg), которая окружает нуклеокапсид (содержащий HBcAg). Вирион, (1), имеет диаметр 42 нм. Он включает ДНК-полимеразу и протеин Р, прикрепленные к геному, который окружен сердцевинным (core) антигеном HBcAd. Снаружи вирион имеет оболочку с гликопротеиновым поверхностным (surface) антигеном-HBsAg, состоящим из S, preSI, preS2 полипептидов. Вирусы содержат два главных полипептида, составляющие HBsAg, одну полипептидную цепь, составляющую HBcAg, и другие полипептиды (HBeAg). Репликация осуществляется в ядрах гепатоцитов (с накоплением HBcAg), а HBsAg образуется в цитоплазме в значительных количествах; этот процесс сопровождается экзоцитозом, приводящим к антигенемии.

Кроме частиц Дейна, в кровь инфицированных людей попадают HBsAg-содержащие частицы (неполные вирионы). Эти частицы (2, 3) могут быть сферическими или нитевидными. HBsAg включает три гликопротеина (L, M, S), содержащие группоспецифический (a) и типоспецифические детерминанты HBV (d или u и w или g).

#### **7. Семейство Papillomaviridae**

**Род Papillomavirus** Вирус папиллом кроликов, крупного рогатого скота, человека, овец, оленей, лосей, собак

семейство — Papillomaviridae. Папилломавирусы человека (ПВЧ) инфицируют и размножаются в сквамозном эпителии кожи, образуя доброкачественные бородавки (папилломы), и в слизистых оболочках, вызывая генитальные, оральные и конъюнктивальные папилломы; индуцируют пролиферацию эпителия. Папилломавирусы обладают онкогенным потенциалом. Так, папилломавирусы человека (ПВЧ-16, ПВЧ-18) вызывают цервикальные папилломы, дисплазию, рак. ПВЧ-16 — самый распространенный в России высокоонкогенный тип.

Вирусы передаются при микротравмах кожи и слизистых оболочек, а также половым путем.

Структура. Вирион папилломавируса — без оболочки. Икосаэдрический капсид (55 нм в диаметре) состоит из двух структурных (капсидных) белков, формирующих 72 капсомера. Геном — двунитевая циркулярная ДНК; имеет 8 ранних — early (E1—E8) генов, в зависимости от вируса, и 2 поздних — late (L1, L2), или структурных (капсидных) генов. ДНК вирусов связана с гистоновым клеточным белком. Различается около 120 генотипов папилломавирусов.

#### **8. Семейство Circoviridae**

**Род Circovirus** Вирус анемии цыплят, цирковирuсы свиней и попугаев (вирус болезни клюва и перьев попугаев). Возможный член рода — цирковирuс голубей

**Цирковирuсы представляют собой безоболочечные, сферические, икосаэдральной симметрии вирионы диаметром 17—22 нм (вирус анемии цыплят имеет более крупные вирионы — 22 нм). Капсид вирионов состоит из 32 капсомеров и имеет один главный структурный белок. Вирионы устойчивы к жирорастворителям и кислой среде (pH=3,0). Геном цирковирuсов представлен одной молекулой циркулярной одноцепочечной ДНК размером 1,7—2,3 тн. Геномы ЦВС-1 и ЦВС-2 представлены соответственно 1759 и 1768 нуклеотидами, гомология их последовательности составляет 76% [248]. Геномная ДНК**

цирковирусов реплицируется, по-видимому, по кругу от петлеобразной структуры [1135].

Цирковирусы размножаются в ядре, и вероятно, подобно парвовирусам, этот процесс зависит от S-фазы клеточного цикла. Размножение цирковирусов сопровождается образованием в цитоплазме или ядре полиморфных включений, иногда напоминающих паракристаллические структуры. Двухцепочечная репликативная форма ДНК цирковируса свиней и цирковируса анемии цыплят обладает инфекционностью (2596). Цирковирусы размножаются в основном в макрофагах и моноцитах и вызывают подавление иммунной системы, что отчетливо установлено при изучении анемии цыплят. Нарушение иммунной системы наиболее выражено при инфицировании молодых животных и часто способствует развитию вторичных инфекций.

## **РНК-СОДЕРЖАЩИЕ ВИРУСЫ**

### **1. Семейство Ретровирусов (Family Retroviridae)**

Семейство Ретровирусов (от лат. retro - обратно, назад) образовано в 1974 г., объединяет большую группу РНК-содержащих вирусов, поражающих позвоночных, и подразделяется на 7 родов: род Alpharetrovirus: вирус лейкоза птиц и др.; род Betaretrovirus: вирус опухолей молочных желез мышей и др.; род Gammaretrovirus: вирус лейкемии мышей и др.; род Deltaretrovirus: вирус лейкоза крупного рогатого скота и др.; род Epsilonretrovirus: вирус дермальной саркомы окуневых рыб и др.; род Lentivirus: вирус инфекционной анемии лошадей, вирусы иммунодефицита кошек и крупного рогатого скота, и др.; род Spumavirus: пенящие вирусы человека и обезьяны, синцитиальные вирусы крупного рогатого скота и кошек.

Морфология и химический состав. Зрелые вирионы содержат центрально-расположенный электронно-плотный нуклеоид. Он заключён в капсидную оболочку, имеющую форму икосаэдра. Внешняя вирусная оболочка имеет 2-контурную структуру с пуговкообразными шипиками на поверхности. Размеры вируса колеблются от 73 до 120 нм в диаметре.

Геном вируса может существовать в 2 формах: геномной 1- цепочечной РНК или в виде ДНК, синтезированной на геномной РНК и интегрированной в виде провируса в хромосому клетки-хозяина. Геномная РНК содержится только в зрелых вирионах и имеет молекулярную массу 10-12-106Д. Химический состав вирионов: белок - 60%, липиды - 35, углеводы - 3 и РНК-2%

### **2. Семейство Ортомиксовирусов (Family Orthomyxoviridae)**

Название семейства Ортомиксовирусов (от греч. orthos - прямой, муха - слизь) отражает структурную и биологическую особенности вирионов: наличие нитевидного нуклеокапсида и тропизм к слизистым оболочкам. Семейство имеет 4 рода: род Influenzavirus A: вирус гриппа А; род Influenzavirus B: вирус гриппа В; род Influenzavirus C: вирус гриппа С; род Thogotovirus: вирус Тогото и др.

Морфология и химический состав вирусов. Вирусы обладают выраженным плеоморфизмом, могут иметь округлые, нитевидные, грушевидные формы; диаметр вирионов 80-120 нм. Центральная часть представлена односпиральной РНК с молекулярной массой 4-5-10<sup>6</sup>Д и заключена в белковую капсидную оболочку. Сверху вирион покрыт сложной трёхслойной оболочкой, состоящей из белковой мембраны и двойного слоя липидов, её поверхность имеет выступы длиной 10-14 нм По химическому составу вирусы состоят из белка - 70%, липидов - 25%, углеводов - 4,2% и РНК - 0,8%.

### **3. Семейство Бирнавирусов (Family Birnaviridae)**

Семейство Бирнавирусов (от англ. bi - двойной, na - рибонуклеиновая кислота) образовано в 1984 г., включает вирусы, поражающие широкий круг хозяев, и состоит из 2 родов: род Aquabirnavirus: вирус инфекционного некроза поджелудочной железы лососевых рыб и др.; род Avibirnavirus: вирус инфекционного бурсита птиц.

Морфология и химический состав вируса. Вирионы имеют округлую форму, диаметром 55-60 нм. Нуклеоид представлен двунитиевой молекулой РНК с молекулярной массой  $2-4 \times 10^6$ Д. Он заключён в капсидную оболочку, состоящую из 32 капсомеров с кубическим типом симметрии (икосаэдр) Вирус состоит из белка - 90% и РНК - 10%.

#### **4. Семейство Парамиксовирусов (Family Paramyxoviridae)**

В семейство Парамиксовирусов (от греч. para - около и туха-слизь), состоящее из 2 подсемейств и 5 родов, входят вирусы, которые поражают позвоночных животных.

Подсемейство Paramyxovirinae: род Respirivirus: вирус парагриппа крупного рогатого скота и др.; род Morbillivirus (от лат. morbillus - корь) - вирусы чумы крупного рогатого скота, мелких жвачных и плотоядных и др.; род Rubulavirus: вирусы болезни Ньюкасла, паротита и др.

Подсемейство Pneumovirinae: род Pneumovirus: респираторно-синцитиальные вирусы крупного рогатого скота и др.; род Metapneumovirus: вирус ринотрахеита индеек.

Морфология и химический состав вирусов. Вирусные частицы округлой формы, размером 150-300 нм. Геном представлен односпиральной линейной молекулой РНК с молекулярной массой  $6-8 \times 10^6$ Д. Капсидная оболочка имеет спиральный тип симметрии. Липопротеидная оболочка покрыта выступами длиной 8-12 нм. В вирионах содержится 70% белка, 20-25% липидов, 6% углеводов и 0,5% РНК

#### **5. Семейство Рабдовирусов (Family Rhabdoviridae)**

Вирусы семейства Рабдовирусов (от греч. rhabdos - стержень, палочка) разделены на 4 рода: род Lyssavirus (от лат. lyssa - бешенство): вирусы бешенства; род Vesiculovirus (от лат. vesicula - пузырь): вирус везикулярного стоматита и др.; род Ephemerovirus: вирус эфемерной лихорадки крупного рогатого скота и др.; род Novirhabdovirus: вирус инфекционного гематопозитического некроза рыб и др.

Вирионы рабдовирусов имеют пулевидную форму, а у вирусов растений — часто бациллоподобную форму; их диаметр от 50 до 95 нм, длина 130—380 нм. Частицы имеют липидсодержащую внешнюю оболочку с поверхностными выступами, внутри которой заключен спиральный нуклеокапсид, образующий совершенную цилиндрическую структуру. Геном состоит из одной молекулы негативной одноцепочечной РНК с мол. массой  $(3,5—4,6) \cdot 10^6$ . Вирусы содержат от 4 до 5 главных полипептидов, включая транскриптазу. Они могут проявлять гемагглютинирующую активность благодаря наличию поверхностного гликопротеина. Перекрестные, (группоспецифичные) серологические реакции в основном протекают с участием белка нуклеопротеина N. Репликация происходит в цитоплазме, а сборка осуществляется с помощью отпочковывания от плазматической мембраны (в случае вируса везикулярного стоматита) или внутрицитоплазматических (вирус бешенства) мембран. Многие вирусы реплицируются в организме членистоногих и передаются ими.

#### **6. Семейство Пикорнавирусов (Family Picornaviridae)**

Семейство Пикорнавирусов (от англ. *pico* - маленький, *ta* - рибонуклеиновая кислота) объединяет более 200 вирусов животных и человека, которые разделены на 6 родов: род *Enterovirns*: полиовирусы человека, коксаки, ЕСНО, энтеровирусы человека и др.; род *Hepatovirus*: вирусы гепатита А человека и обезьян; род *Cardiovirus*: вирусы энцефаломиокардита и энцефаломиелита мышей; род *Rhinovirus*: риновирусы человека и крупного рогатого скота; род *Aphthovirus*: 7 серотипов вирусов ящура; род *Parachovirus*: парэховирус человека.

Морфология и химический состав вируса.

Вирус имеет размеры 20-25 нм, сферическую форму и представляет собой правильный икосаэдр. Он состоит из нуклеиновой кислоты и белковой оболочки. Нуклеиновая кислота представлена РНК, молекулярной массой 2-3-106Д, обладает инфекционностью. Белковая оболочка состоит из 32 капсомеров, имеющих кубический тип симметрии (рис. 27, 28). Вирионы содержат 68,5% белка и 31,5% РНК.

#### **7. Семейство Калицивирусов (Family Caliceviridae)**

Семейство Калицивирусов (от лат. *chalice* - чаша) объединяет несколько видов вирусов, имеющих характерную морфологию с чашеобразными углублениями на сферической поверхности капсида, которые разделены на 4 рода: род *Lagovirus*: вирус геморрагической болезни кроликов и др.; род *Vesivirus*: вирус везикулярной экзантемы свиней и др.; род вирусов, подобных вирусу Норволк: вирус Норволк и др.; род вирусов, подобных вирусу Саппоро: вирус Саппоро.

Морфология и химический состав вируса.

Вирус имеет округлую форму, размером 28-33 нм. Нуклеоид представлен односторонней РНК с молекулярной массой  $2,5-2,8 \times 10^6$ Д. Капсидная оболочка имеет кубический тип симметрии (икосаэдр) и состоит из 32 капсомеров. По химическому составу вирус на 20-30% состоит из нуклеиновой кислоты и 70-80% белка.

#### **8. Семейство Коронавирусов (Family Coronaviridae)**

Семейство Коронавирусов (от лат. *corona* - венец) сформировано в 1968 г. и включает 2 рода: род *Coronavirus*: антигенная группа 1 - вирус трансмиссивного гастроэнтерита свиней и др.; антигенная группа 2; гемагглютинирующий вирус энцефаломиелита свиней и др.; антигенная группа 3 - вирус инфекционного бронхита кур и др.; род *Togovirus*: торовирусы лошадей, крупного рогатого скота, свиней и человека.

Морфология и химический состав вирусов. Коронавирусы представляют сферические или плеоморфные частицы диаметром 60-200 нм. Их геном имеет 1-цепочечную молекулу РНК, которая обладает инфекционностью (+цепь) с молекулярной массой 5,5-6,1-106Д. Капсидная оболочка спирального типа симметрии, взаимодействуя с геномной РНК, образует гибкий протяжённый нуклеокапсид. Он окружён липопротеидной оболочкой, на поверхности которой имеются булавовидные выступы длиной 12-24 нм, образующие подобие солнечной короны.

Вирусы состоят из белка (57-69%), РНК (3-4%), липидов (18-25%) и углеводов (6-8%).

#### **9. Семейство Флавивирусов (Family Flaviviridae)**

В семейство Флавивирусов (от лат. *flavus* - жёлтый) входит большая группа вирусов, поражающих позвоночных и насекомых, состоит из 3 родов:

- род *Pestivirus* (от лат. *pestis* - чума): вирусы классической чумы свиней, диареи крупного рогатого скота и пограничной болезни овец;

- род *Flavivirus*: вирусы жёлтой лихорадки, клещевого энцефалита и др.;
- род *Hepacivirus*: вирус гепатита С.

**Морфология и химический состав вирусов.** Вирионы имеют сферическую форму, диаметр 35-60 нм. Они состоят из нуклеоида, представленного однонитиевой РНК с молекулярной массой  $4 \cdot 10^6$ Д, капсидной оболочки с кубическим типом (икосаэдр) симметрии, состоящей из 92 капсомеров и двухслойной липо- протеидной оболочки, на поверхности которой есть ворсинки (рис. 33). Вирус содержит белок - 57-66%, липиды - 17-31, углеводы - 6-9 и РНК - 3-8%.

#### **10. Семейство Reoviridae**

-род *Orthoreovirus* Ортореовирусы млекопитающих, птиц, летучих собак (Nelson Bay), павианов. Возможные члены рода — ортореовирусы питонов и гремучих змей

-род *Orbivirus* 19 вирусов— вирусы блютанга 1-24, африканской чумы лошадей 1-9, эпизоотической геморрагической болезни оленей 1-8, энцефалита лошадей 1-7 и др.

-род *Rotavirus* Ротавирусы групп А (многих видов млекопитающих и птиц), В (человека, крупного рогатого скота, свиней, овец), С (человека, крупного рогатого скота, свиней), D (птиц), Е (свиней). Возможные члены рода — ротавирусы групп F и G (птиц)

-род *Coltivirus* Вирусы колорадской клещевой лихорадки, Банна, Кадипиро

- род *Aquareovirus* Реовирусы рыб А, В, С, D, Е, F. Возможные члены рода — 5 вирусов

Вирусы указанных родов различаются по морфологическим и физико-химическим особенностям. Обычно вирусные частицы лишены внешней оболочки, содержат две капсидные оболочки (каждая с икосаэдрической симметрией) и имеют диаметр от 60 до 80 нм. Геном состоит из 10—12 сегментов линейной двухцепочечной РНК с общей мол. массой  $(12—20) \cdot 10^6$ . Вирусы содержат от 6 до 10 вирионных полипептидов, включая транскриптазу и другие ферменты. Репликация и сборка происходят в цитоплазме, часто в связи с гранулярной или фибриллярной вироплазмой. Рота- и реовирусы передаются прямым путем; орбивирусы переносятся членистоногими.

#### **9. Семейство Filoviridae**

Род вирусов, подобных вирусу Эбола. Вирусы Эбола, Заир, Судан, Рестон, Кот-д'Ивуар

Вирионы вирусов Марбург и Эбола имеют вид длинных нитевидных образований, иногда ветвящихся, а иногда U-образных, в форме цифры 6 или кольца. Диаметр вирионов всегда равен 80 нм, а длина сильно варьирует (достигая 14 000 нм). Инфекционная частица единичной длины имеет размер 790 нм (вирус Марбург) или 970 нм (вирус Эбола). Вирионы имеют липидсо- держащую внешнюю оболочку с поверхностными выступами, окружающую довольно жесткий спиральный нуклеокапсид. Геном состоит из одной молекулы предположительно негативной одноцепочечной РНК с мол. массой  $4,2 \cdot 10^6$ . Вирусы имеют пять главных полипептидов. Репликация происходит в цитоплазме, а сборка включает этап отпочковывания преформированного нуклеокапсиды от клеточной мембраны. Вирусы Марбург и Эбола относятся к категории особоопасных патогенов. С ними можно работать только в лабораториях, оборудованных с соблюдением самых строгих мер техники безопасности.

#### **10. Семейство Bunyaviridae**

- род *Bunyavirus* 47 вирусов: вирусы Буньямвера, Акабане, Орибока и др. Возможные члены рода — 4 вируса; род *Hantavirus* 22 вируса: вирусы Хантаан, Тула, Хабаровск и др.; род *Nairovirus* 35 вирусов: вирусы Дагби, болезни Найроби овец, Крымской — Конго геморрагической лихорадки, Сахалин и др.; род *Phlebovirus* 9 вирусов: вирусы лихорадки долины Рифт, Укуниеми и др. Возможные члены рода — 16 вирусов

Неклассифицированные вирусы в семействе - 41 вирус

Вирионы буньявирусов имеют липидсодержащую внешнюю оболочку с поверхностными выступами, которая окружает три кольцевых нуклеокапсида диаметром 2—2,5 нм. Диаметр частиц от 90 до 120 нм. Геном состоит из трех молекул «кольцевой» (концы удерживаются водородными связями) негативной одноцепочечной РНК с суммарной мол. массой (4,5—7)  $\times 10^6$ . Вирусы имеют четыре главных полипептида, включая транскриптазу, и проявляют гемагглютинирующую активность за счет одного из двух поверхностных гликопротеинов. Репликация происходит в цитоплазме, а сборка включает отпочковывание от мембран аппарата Гольджи. При совместном заражении близкородственные вирусы могут обмениваться участками генома

#### 11. Семейство *Arenaviridae*

-род *Arenavirus* 19 вирусов: вирусы лимфоцитарного хорио-менингита (Амапари, Ласса, Такари бе и др.). Возможный член рода — вирус Пампа

Вирионы аренавирусов имеют плеоморфную липидсодержащую оболочку с большими поверхностными выступами, внутри которой заключены два кольцевых или линейных нуклеокапсида и разное число рибосомоподобных частиц. Диаметр вирионов от 50 до 300 нм (в среднем 110—130 нм). Геном состоит из двух молекул линейной или «кольцевой» (концы могут удерживаться водородными связями) негативной одноцепочечной РНК с суммарной мол. массой (3,2—4,8)  $\cdot 10^6$ . Вирусы имеют три главных полипептида, включая транскриптазу. За типоспецифическую серологическую реактивность ответствен поверхностный гликопротеин, а за перекрестную реактивность — нуклеокапсидный белок. Репликация осуществляется в цитоплазме, а сборка включает отпочковывание от плазматической мембраны.

#### 12. Семейство *Astroviridae*

- род *Astrovirus* Астровирусы человека (8 серотипов), крупного рогатого скота (2 серотипа), овец, свиней, кошек, уток и индеек (по 1 серотипу). Астровирусы, вероятно, являются обычными обитателями пищеварительного тракта молодых животных и, как правило, связаны с гастроэнтеритами, но, в отличие от некоторых других вирусов, не вызывали или редко вызывали тяжелое заболевание или гибель, за исключением уток.

Семейство астровирусов включает один род с одноименным названием Астровирусы с отчетливыми видо-специфическими различиями. Известны вирусы: человека (7 серотипов), КРС (3 серотипа), свиней (1 серотип), овец, собак, кошек, оленей, мышей, индеек и уток (по 1 серотипу). Астровирусы человека и разных видов животных не связаны между собой антигенно. Название астровирусы происходит от того, что поверхность некоторых вирионов имеет вид 5- или 6-конечных звезд (*astron*, *star*). Астровирусы по некоторым свойствам подобны калицивирусам и пикорнавирусам, но отличаются от них размером и структурой вирионов, а также кодирующей емкостью генома и стратегией репликации (2500). Безоболочечные вирионы икосаэдрической симметрии диаметром 28-30 нм. Поверхность (при негативном контрастировании) некоторых вирионов (~10%) имеет вид 5- или 6-

конечных звезд. Капсид диаметром 33 нм покрыт 30 димерными отростками, выступающими над поверхностью вириона на 5 нм. Вирионы устойчивы при pH=3,0, а также к хлороформу, различным детергентам и растворителям липидов.

Геном представлен одной молекулой линейной положительной полярности одноцепочечной РНК размером 6,8 тн. Геномная РНК на 5'-конце ковалентно связана с белком VPg, полиаденилированная на 3'-конце и обладает инфекционностью. Вирион содержит 2—3 главных капсидных белка (90 и 27—30 кД) и несколько минорных или неструктурных белков. Субгеномная мРНК образуется в процессе репродукции; структурные вирусные белки образуются в процессе трансляции субгеномной РНК с образованием и последующим расщеплением полипротеина.

### 15. Семейство Arteriviridae

-род Arterivirus Вирусы артерита лошадей, респираторного и репродуктивного синдрома свиней, геморрагической лихорадки обезьян, повышающий уровень лактатдегидрогеназы мышей.

Название семейства происходит от названия болезни, вызываемой у лошадей вирусом артерита. Кроме лошадей, подобные вирусы вызывают заболевания у свиней, мышей и обезьян. Все артеривирусы способны вызывать бессимптомные персистентные инфекции у естественных хозяев, при некоторых обстоятельствах — тяжелые заболевания. Артеривирусы по организации генома и стратегии репликации подобны коронавирусам. Главным отличием артеривирусов является то, что их геном и вирионы примерно вдвое меньше, чем у коронавирусов. Артеривирусы имеют изометрический капсид, тогда как коронавирусы — геликоидальный (спиральный), у артеривирусов пепломеры варажены и более длинные, нежели у любых других вирусов. Общим для этих семейств является стратегия гнездовой транскрипции, что послужило основанием объединить их в один порядок — нидовирусы. Семейство артеривирусов содержит один род вирусов с одноименным названием.

Вирионы диаметром 40—60 нм содержат изометрический (вероятно, кубический) нуклеокапсид 25—35 нм в диаметре, окруженный тесно прилегающей оболочкой с сотообразной структурой. В процессе инфекции синтезируется 7—9 структурных и 8-13 неструктурных белков [1430].

Вирионы содержат нуклеокапсидный белок N (12 кД), негликозилованный внутренний мембранный белок M (16 кД) и по крайней мере два N-гликозилированных пепломерных белка Gs (25 кД) и G, (42 кД) [1135].

Двойной липидный слой, окружающий нуклеиновую кислоту, содержит 5-6 белков в необычно большом количестве по сравнению с другими одноцепочечными (+)РНК вирусами. Два из этих белков белок M и главный гликопротеин являются основными структурными компонентами [1430].

Геном представлен одной молекулой линейной одноцепочечной (+)РНК размером 13—15 тн. Геном прототипного артеривируса лошадей содержит 8 открытых рамок считывания. Три четверти 5'-конца генома вируса занимают две большие открытые рамки считывания, которые вместе кодируют вирусную репликазу. Продуктом обеих открытых рамок считывания является мультидоменный полипротеин, который расщепляется вирусными и клеточными протеазами на субъединицы зрелой репликазы. Открытые рамки считывания 2; 5 и 6, экспрессируемые субгеномными мРНК, кодируют соответственно большой и малый гликопротеины и трансмембранный белок. Открытая рамка считывания 7 кодирует фосфорилированный нуклеокапсидный белок.

Артеривирусы реплицируются в перинуклеарной зоне цитоплазмы клеток хозяина, которыми обычно являются макрофаги. Вирионы образуются почкованием через мембрану эндоплазматической сети во внутриклеточных везикулах, они перемещаются к поверхности клетки и освобождаются при экзоцитозе. Вирус артерита лошадей размножается с высоким титром в клетках лошади, а вирус лактатдегидрогеназы — в организме мышей, накапливаясь в плазме крови в титре  $10^{11}$  ИД<sub>50</sub>/мл в первые дни после заражения.

#### **16. Семейство Togaviridae**

-род Alphavirus 24 вируса: вирусы Синдбис, западного, восточного и венесуэльского энцефалитов лошадей, леса Семлики и др.

-род Rubivirus Вирус краснухи

Вирион имеет внешнюю липидсодержащую оболочку с поверхностными выступами, окружающую нуклеокапсид (по-видимому с икосаэдрической симметрией). Диаметр вириона от 40 до 60 нм. Геном состоит из одной молекулы позитивной инфекционной одноцепочечной РНК с мол. массой 4-106. Частицы содержат от трех до четырех главных вирусных полипептидов, причем одна или два из них гликозилированы. Большинство вирусов обнаруживает рН-зависимую гемагглютинирующую активность. Репликация происходит в цитоплазме, а сборка включает этап отпочковывания от мембраны хозяйской клетки. Все альфавирусы, но не рубивирусы способны размножаться как в членистоногих, так и в позвоночных.

#### **17. Семейство Bornaviridae**

-род Bornavirus Вирус болезни Борна

Вирус болезни Борна (ВББ) является единственным представителем рода и семейства борнавирусы. Вирус болезни Борна распространен во всем мире и поражает лошадей, овец, КРС, кошек, собак и страусов. Основными естественными хозяевами ВББ являются лошади и овцы, у которых он может вызывать невралгические симптомы или даже летальную инфекцию. В большинстве случаев заражение приводит к длительному носительству вируса без клинического проявления. У лошадей возможна вертикальная передача вируса. В естественных условиях заболевание установлено у крупного рогатого скота и кошек.

Вирионы представлены сферическими частицами диаметром 70—130 нм, которые содержат сердцевину (50—60 нм), покрытую оболочкой, обрамленной пепломерами длиной около 7 нм. Вирионы устойчивы при рН=5,0—12,0 [574].

#### **18. Семейство Nodaviridae**

-род Betanodavirus Вирусы, вызывающие некроз нервной ткани у морских рыб (камбала, групер, иглобрюх и др.)

-«Плавающий» род Deltavirus Вирус гепатита дельта

Вирус гепатита D (HDV) — дефектный РНК-содержащий вирус, один из возбудителей парентеральных вирусных гепатитов (гепатит D, или дельта). Вирус передается парентерально. Резервуар возбудителя — инфицированный вирусом человек. Структура. HDV имеет сферическую форму (35-40 нм) и маленький РНК-геном, представленный минус однонитевой кольцевой РНК. По структуре генома (кольцевая РНК) HDV напоминает вирионы. Геном заключен в дельта-антигенную сердцевину, снаружи которой имеется HBsAg-содержащая оболочка, кодируемая вирусом гепатита В (HBV). РНК-геном реплицируется и транскрибируется в ядре клеточными ферментами. Вирионы HDV образуются с помощью HBsAg. Сердцевинный дельта-антиген представлен малой (24 кД) или большой (27кД)

формой; преобладает малая форма. Различают три генотипа и несколько субтипов HDV. Чаще встречаются вирусы 1-го генотипа.

- «Плавающий» род вирусов, подобный вирусу гепатита E, Вирус гепатита E

Вирус гепатита E (HEV) ранее относился к семейству Caliciviridae. Недавно он был переведен из данного семейства в группу гепатит E-подобных вирусов. Впервые описан М. С. Балаяном и соавт. в 1983 г. Вызывает гепатит E — антропонозную инфекцию с преимущественным поражением печени. Источник инфекции — больные люди. Механизм передачи — фекально-оральный. Основной путь передачи — водный.

Структура. Вирион безоболочечный, сферический; диаметр 27-34 нм. Капсид икосаэдрический. Геном — однонитевая плюс-РНК, которая кодирует РНК-зависимую РНК-полимеразу, папаинподобную протеазу и трансмембранный белок, обеспечивающий внедрение вируса в клетку.

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Какие основные свойства вирусов положены в их номенклатуру?
2. Что такое «род» и «вид» вируса?.
3. Чем отличаются прионы и вирионы от вирусов.
4. Охарактеризуйте семейства ДНК-содержащих вирусов. Какова их роль в патологии человека и животных?
5. Охарактеризуйте семейства РНК-содержащих вирусов. Какова их роль в патологии человека и животных?

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

5. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс] : учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. - Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с.: ил. - [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniy.com>]. <http://znaniy.com/bookread2.php?book=508936> ISBN 978-985-06-2237-2. дата обращения – 20.06.2017 г.
6. Вирусология и биотехнология / Белоусова Р.В., Ярыгина Е.И., Третьякова И.В., Калмыкова М.С. Издательство "Лань", 2016г.- 220 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <https://e.lanbook.com>] <https://e.lanbook.com/reader/book/88026/#1> ISBN: 978-5-8114-2266-1. дата обращения – 20.06.2017 г.
7. Луканин А. В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств/Луканин А.В. - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. - 312 с.: 60x90 1/16. - (Высшее образование) [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniy.com>] <http://znaniy.com/bookread2.php?book=527386> ISBN 978-5-16-011479-8. дата обращения – 20.06.2017г.
8. Молчанов Г. И. Фармацевтические технологии: современные электрофизические биотехнологии в фармации: Уч. пос. / Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Л.М. Кубалова. - 2-е изд. - М.: Альфа-М: ИНФРА-М, 2014. - 336 с.: ил.; 60x90 1/16. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniy.com>] <http://znaniy.com/bookread2.php?book=314485> ISBN 978-5-98281-260-5

## Лекция № 5

### Репродукция вирусов

#### 5.1. Размножение вирусов. Общие представления.

Поиски этиологических агентов инфекционных заболеваний увенчались открытием сотен вирусов. Особенность вирусов является то, что вирионы представляют собой инертные формы, которые сами по себе не размножаются, а лишь существуют для перехода из одной клетки хозяина в другую и сохранения во внешней среде. В последнем случае они как-бы напоминают роль споровых форм микроорганизмов.

Патологические эффекты при вирусных заболеваниях складываются из взаимодействия нескольких факторов: токсического воздействия продуктов вирусных генов на метаболизм зараженных клеток; реакции хозяина на экспрессию вирусных генов в зараженных клетках; модификации экспрессии генов хозяина в результате их структурного или функционального взаимодействия с генетическим материалом вируса.

В большинстве случаев симптомы острых вирусных заболеваний могут быть непосредственно связаны с разрушением клеток инфицирующим их вирусом. Ключом к пониманию размножения вирусов является ряд положений и определений.

1. **Для того чтобы вирус мог размножиться, он должен вначале заразить клетку. Спектр хозяев определяется как типами клеток, так и видами животных, которых он может заражать и в которых он способен размножаться. Спектр хозяев разных вирусов значительно варьирует. Одни вирусы имеют широкий спектр хозяев, другие заражают лишь клетки одного типа определенных видов животных.** Способность клетки или животного заражаться называют **восприимчивостью**.

2. **В начале инфекции вирус вводит в клетку свой генетический материал — РНК или ДНК, часто вместе с необходимыми белками. Размеры, состав и генная организация вирусных геномов очень сильно варьируют.** Здесь следует подчеркнуть два положения.

#### **Цикл репродукции всех вирусов имеет несколько общих черт**

Вскоре после заражения и в течение нескольких часов после него удается обнаружить лишь небольшое количество родительского вируса. Этот период известен как **эклипсная фаза**; в это время геном вируса взаимодействует с хозяйским или вирусным аппаратом, необходимым для его экспрессии, но численность потомства вируса еще не превышает фонового уровня. Затем следует интервал, во время которого вирионы потомства накапливаются внутри или вне клетки с экспоненциальной скоростью. Этот период известен как **фаза созревания**. Через несколько часов в клетках, зараженных литическими вирусами, снижается метаболическая активность и они теряют структурную целостность. Клетки, зараженные другими вирусами, могут продолжать синтез вирионов неограниченное время. Цикл репродукции вирусов варьирует от 6—8 ч (пикорнавирусы) до 40 ч и более (некоторые герпесвирусы). Урожай вируса в расчете на одну клетку широко варьирует и в случае вируса полиомиелита, например может превышать 100 000 частиц.

Заражение восприимчивых клеток не означает, что неизбежно будут происходить размножение вируса и накопление его потомства

Различают три типа взаимодействия вируса с клеткой:

**Продуктивный тип** - происходит в *пермиссивных* клетках и характеризуется продукцией инфекционного потомства. Новые вирионы, по-разному выходящие из клетки: при ее лизисе – т.е. «взрывным» механизмом, (безоболочечные вирусы); путем почкования через мембраны клетки (оболочечные вирусы); в результате экзоцитоза

**Абортивный тип** характеризуется прерыванием инфекционного процесса и может наступить в силу двух обстоятельств:

- Несмотря на восприимчивость к заражению, клетки могут оказаться непермиссивными, так как, чаще всего по неизвестным причинам, в них способны экспрессироваться лишь некоторые вирусные гены.

- может быть результатом заражения как пермиссивных, так и непермиссивных клеток дефектными вирусами у которых отсутствует полный набор, вирусных генов.

**Интегративный тип (виrogenия)** заключается в интеграции, т.е. встраивании вирусной ДНК в виде провируса в хромосому клетки и их совместном существовании.

## 5.2. Клеточный геном и реализация генетической информации *in vivo*.

### **Формы взаимодействия вириона вируса с клеткой. Этапы репродукции вирионов. Внутриклеточные формы вируса. Исходы вирусной инфекции на уровне клетки.**

Цикл репродукции вирусов при продуктивной инфекции представляет собой специфическую последовательность событий, приводящих к образованию нового потомства вирионов:

1. Адсорбция вирионов на поверхности клетки,
2. Проникновение вируса или вирусного нуклеопротеида внутрь клетки,
3. Депротенизация генома,
4. Синтез вирусных компонентов,
5. Формирование и выход из клетки зрелых вирионов

Вирусы обладают тропизмом, т.е. способностью адсорбироваться и репродуцироваться в клетках строго определенных (излюбленных) тканей, зависящей от соответствия вирусных рецепторов рецепторам клеток.

#### **Прикрепление (адсорбция) вируса**

Прикрепление (адсорбция) вирионов к поверхности клетки — первая стадия вирусной инфекции. Для того, чтобы началась инфекция, вирионы должны быть способны прикрепляться к клетке. Процесс адсорбции вирусов состоит из двух быстро следующих друг за другом периодов - обратимого и необратимого. В период **обратимой адсорбции** вирус можно удалить с поверхности клетки при обработке версеном, хемотрипсином и другими химическими веществами. При **необратимой адсорбции** вирус удалить с поверхности клетки не удастся.

**Первичный контакт** с клеткой происходит в результате случайных столкновений вирионов с поверхностью клетки. Количество стабильных прикреплений вириона к клетке во много раз меньше количества случайных столкновений.

В основе прикрепления вируса к клетке лежат два механизма — неспецифический и специфический. Первый из них определяется силами электростатического взаимодействия, возникающими между разноименно

заряженными группами, расположенными на поверхности клетки и вируса. В этом процессе, прежде всего, могут участвовать положительно заряженные аминные группы вирусного белка и отрицательно заряженные группы клеточной поверхности. Наиболее важным механизмом прикрепления вируса является **специфическое взаимодействие** рецепторов вируса с комплементарными рецепторами клетки.

Прикрепление происходит за счет связи между вирионными прикрепительными белками на поверхности вирионов и рецепторами на плазматической мембране клеток.

На поверхности вирионов многих семейств вирусов (все РНК-содержащие оболочечные вирусы и аденовирусы) имеются **пепломеры** (выступы и шипы) длиной от 10 до 30 нм, которые принимают непосредственное участие в прикреплении вируса к клетке. Отщепление пепломеров с помощью протеолитических ферментов приводит к потере вирионами способности адсорбироваться на клетках. На поверхности вирионов, не имеющих пепломеров, находятся участки связывания с клеточной поверхностью, которые отличаются сложным строением и состоят из нескольких полипептидов. Спектр чувствительности клеток к вирусам в значительной мере определяется наличием соответствующих рецепторов. Рецепторный барьер может быть преодолен при заражении инфекционной нуклеиновой кислотой.

#### **Проникновение вируса в клетку**

После адсорбции вируса следует стадия проникновения его в клетку. Вирионы могут проникать в клетку одним из двух главных путей: **1.Опосредованным рецепторами эндоцитозом.**

#### **2.Слиянием**

#### **Раздевание вирионов (обнажение вирусного генома)**

Для того чтобы вирусные гены стали доступными для транскрипции, необходимо, чтобы вирионы были хотя бы частично раздеты. В случаях с оболочечными вирусами РНК, у которых оболочка целиком сливается с цитоплазматической мембраной или эндоплазматической мембраной, нуклеокапсид освобождается прямо в цитоплазму и транскрипция вирусной нуклеиновой кислоты начинается, когда она все еще связана с этой структурой. У безоболочечных реовирусов после проникновения вирионов в клетку происходит разрушение наружного капсида клеточными ферментами. Однако сердцевина вириона не разрушается на протяжении всего инфекционного процесса, и двуспиральная геномная РНК консервируется внутри субвирусной частицы.

#### **Синтез вирусных компонентов (эклипс-период)**

Вскоре после обнажения вирусного генома происходит уменьшение или исчезновение инфекционности, поскольку вирионов как таковых уже не существует, а инфекционность нуклеиновой кислоты намного меньше инфекционности полных вирионов. Данное явление было названо эклипсом (затмением), а фаза вирусной инфекции с момента адсорбции и до появления в клетке новых инфекционных вирионов — эклипс-фазой, или латентным периодом. При высокой множественности заражения клеток некоторая часть вирионов сохраняет инфекционные свойства в течение всей эклипс-фазы, что зачастую затрудняет определение ее продолжительности].

В течение этого периода происходят все существенные процессы вирусной репродукции, приводящие к образованию вирусных компонентов и формированию нового потомства вирионов. С появлением в клетке первых вновь синтезированных вирионов завершается эклипс-период размножения вируса.

Большинство РНК-вирусов размножается в цитоплазме, где отсутствуют ферменты, копирующие РНК на РНК-матрице, поэтому вирусный геном должен сам по себе функционировать как мРНК или вирус должен нести свою РНК-полимеразу, чтобы транскрибировать РНК на РНК-геноме. Синтез вирусных белков происходит только в цитоплазме клетки. В инфицированных клетках вирусные нуклеиновые кислоты и вирусспецифические белки синтезируются в значительно большем количестве, чем включаются в вирионы. Избыточный синтез структурных компонентов при репродукции вирусов является своеобразной платой за паразитизм на генетическом уровне.

Потомство вирионов проявляется спустя определенный период после того, как начал осуществляться синтез составляющих их компонентов. Продолжительность периода от момента инфицирования до появления дочерних вирионов довольно вариабельна и отражает глубокое различие между разными вирусами

#### **Выход вирионов из клетки**

Созревшие новые вирионы покидают клетку двумя способами, что зависит от вида и сложности строения вируса.

1. При первом (взрывном, или литическом) способе все потомство вируса покидает клетку почти одновременно вследствие взрыва (разрушения) клеточной стенки, что характерно для вирусов с одной оболочкой (полиомиелита, мелких РНК-вирусов).

2. При втором способе вирионы из клетки выходят постепенно и относительно длительно (2...6 ч), по мере созревания их на цитоплазматической мембране, что характерно для вирусов, имеющих вторую оболочку (миксо-, арбовирусы). Выделение таких вирионов из клетки сопровождается ферментативным разрушением клеточной стенки.

#### **Механизм репродукции отличается у вирусов, имеющих:**

- 1) двунитевую ДНК;
- 2) одонитевую ДНК;
- 3) плюс-одонитевую РНК;
- 4) минус-одонитевую РНК;
- 5) двунитевую РНК;
- 6) идентичные плюс-нитевые РНК (ретровирусы).

Двунитевые ДНК-вирусы — вирусы, содержащие двунитевую ДНК в линейной (например, герпесвирусы, аденовирусы и поксвирусы) или в кольцевой форме (как папилломавирусы).

Репликация двунитевых вирусных ДНК проходит обычным полуконсервативным механизмом: после расплетения нитей ДНК к ним комплементарно достраиваются новые нити. У всех вирусов, кроме поксвирусов, транскрипция вирусного генома происходит в ядре.

Уникальна по механизму репродукции гепаднавирусов (вируса гепатита В).

Геном гепаднавирусов представлен двунитевой кольцевой ДНК, одна нить которой короче (неполная плюс-нить) другой нити. После проникновения в клетку сердцевины вируса неполная нить ДНК-генома достраивается; формируется полная двунитевая кольцевая ДНКи созревающий геном попадает в ядро клетки. Здесь клеточная ДНК-зависимая РНК-полимераза синтезирует разные иРНК (для синтеза вирусных белков) и РНК-прегеном— матрицу для репликации генома вируса. Далее иРНК перемещаются в цитоплазму и транслируются с образованием белков вируса.

Белки сердцевины вируса собираются вокруг прегенома. Под действием РНК-зависимой ДНК-полимеразы вируса на матрице прегенома синтезируется минус-нить ДНК (Б), на которой образуется плюс-нить ДНК. Оболочка вириона формируется на НВs-содержащих мембранах эндо-плазматической сети или аппарата Гольджи. Вирион выходит из клетки экзоцитозом.

#### **Однонитевые ДНК-вирусы.**

Представителями однонитевых ДНК-вирусов являются парвовирусы

Поглощенный вирус поставляет геном в ядро клетки. Парвовирусы используют клеточные ДНК-полимеразы для создания двунитевого вирусного генома, так называемой репликативной формы последнего. При этом на исходной вирусной ДНК (плюс-нить) комплементарно синтезируется минус-нить ДНК, служащая матрицей в синтезе плюс-нити ДНК для новых поколений вирусов. Параллельно синтезируется иРНК, происходит трансляция вирусных белков, которые возвращаются в ядро, где собираются вирионы.

#### **Плюс-однонитевые РНК-вирусы.**

Это большая группа вирусов (пикорнавирусы, флавивирусы, тогавирусы и др.), у которых геномная плюс-нить РНК выполняет функцию иРНК. Вирус после эндоцитоза, освобождает в цитоплазме геномную плюс-РНК, которая как иРНК связывается с рибосомами: транслируется полипротеин, который расщепляется на 4 структурных белка (NSP 1-4), включая РНК-зависимую РНК-полимеразу. Эта полимеразы транскрибирует геномную плюс-РНК в минус-нить РНК (матрицу), на которой синтезируются копии РНК двух размеров: полная плюс-нить 49S геномной РНК; неполная нить 26S иРНК, кодирующая С-белок капсида и гликопротеины оболочки Е1-3. Гликопротеины синтезируются на рибосомах, связанных с мембранами эндоплазматического ретикулула, затем включаются в мембрану и гликозилируются. Дополнительно гликозилируясь в аппарате Гольджи, они встраиваются в плазмалемму. С-белок образует с геномной РНК нуклеокапсид, который взаимодействует с модифицированной плазмалеммой. Вирусы выходят из клетки почкованием.

#### **Минус-однонитевые РНК-вирусы (рабдовирусы, парамиксовирусы, ортомиксовирусы)**

Имеют в своем составе РНК-зависимую РНК-полимеразу.

Проникшая в клетку геномная минус-нить РНК парамиксовируса трансформируется вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой в неполные и полные плюс-нити РНК. Неполные копии выполняют роль иРНК для синтеза вирусных белков, Полные копии являются промежуточной матрицей для синтеза минус-нитей геномной РНК потомства. Вирус связывается гликопротеинами оболочки с поверхностью клетки и сливается с плазмалеммой. С геномной минус-нити РНК вируса транскрибируются неполные плюс-нитями РНК, являющиеся иРНК для отдельных белков и полная минус-нить РНК — матрица для синтеза геномной минус-РНК вируса. Нуклеокапсид связывается с матричным белком м. гликопротеин-модифицированной плазмалеммой. Выход вирионов — почкованием.

#### **Двунитевые РНК-вирусы.**

Механизм репродукции этих вирусов (реовирусов и ротавирусов) сходен с репродукцией минус-однонитевых РНК-вирусов. Особенность репродукции состоит в том, что образовавшиеся в процессе транскрипции плюс-нити функционируют не только как иРНК, но и участвуют в репликации: они являются матрицами для синтеза минус нитей РНК. Последние в комплексе с плюс-нитями РНК образуют геномные

двунитевые РНК вирионов. Репликация вирусных нуклеиновых кислот этих вирусов происходит в цитоплазме клеток.

**Ретровирусы (плюс-нитевые диплоидные РНК-вирусы, обратнотранскрибирующиеся), например вирус иммунодефицита человека (ВИЧ).**

ВИЧ связывается гликопротеином gp120 с рецептором CD4 Т-хелперов и других клеток. После слияния оболочки ВИЧ с плазмалеммой клетки в цитоплазме освобождаются геномная РНК и обратная транскриптаза вируса, которая на матрице геномной РНК синтезирует комплементарную минус-нить ДНК (линейная кДНК). С последней копируется плюс-нить с образованием двойной нити кольцевой кДНК, которая интегрирует с хромосомной ДНК клетки. С рекомбинантной ДНК-провируса синтезируются геномная РНК и иРНК, которые обеспечивают синтез компонентов и сборку вирионов. Вирионы выходят из клетки почкованием: сердцевина вируса «одевается» в модифицированную плазмалемму клетки.

#### **Дефектные интерферирующие вирусные частицы (ДИ-частицы)**

При обычной цитолитической инфекции значительную часть вирусного потомства представляют неинфекционные вирусные частицы, которые утратили способность к автономной репликации из-за дефектности их генома. Повреждения в важных для репликации генах чаще всего связаны с делеционными мутациями, хотя они могут быть и точечными. ДИ-частицы содержат дефектный геном, более короткий, чем геном стандартного инфекционного вируса. Величина утраченной части родительского генома может достигать 90%. Обладающие большим разнообразием ДИ-частицы для своей репликации нуждаются в гомологичном инфекционном вирусе-помощнике, так как размножаются в зараженных им клетках, проявляя специфическую интерференцию.

#### **Типы взаимодействия вирусов с клетками**

Репродукция в клетках всегда сопровождается более или менее выраженными цитопатическими действиями или эффектами, чаще всего завершающимися гибелью клеток. Сюда относятся нарушение метаболизма клетки и истощение ресурсов, затраченных на репродукцию вирусных частиц; изменения основных компонентов клетки в процессе синтеза, созревания и выхода вириона из клетки и др.

*Возможные результаты процессов взаимодействия различных вирусов и клеток можно разделить на пять типов.*

1. *Дегенерация (дистрофия) клеток, приводящая к их гибели (ЦПД, ЦПЭ).*
2. *Образование симпластов и синцитиев, представляющих собой гигантские многоядерные скопления клеточного вещества.*
3. *Трансформация клеток при действии вирусов, обладающих онкогенной активностью. Эти вирусы в культуре клеток вызывают образование очагов беспорядочного трехмерного роста, поэтому такое действие вирусов еще называют пролиферативной инфекцией.*
4. *Образование внутриклеточных включений. Они чаще всего представляют собой сочетания вирусных частиц с продуктами реакции клетки (тельца Бабеша-Негри при бешенстве).*
5. *Латентная (скрытая) инфекция клеток — своеобразное состояние равновесия между вирусом и клеткой, когда инфекция не проявляется какими-либо признаками. При этом наблюдается незначительная продукция вируса без повреждения клеток.*

### **Вопросы для самоконтроля**

1. Из взаимодействия каких факторов складываются патологические эффекты при вирусных заболеваниях.
2. Какие общие черты имеет цикл репродукции всех вирусов?
3. Охарактеризуйте этапы репродукции вирусов.
4. Перечислите возможные результаты процессов взаимодействия различных вирусов и клеток

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс] : учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. - Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с.: ил. - [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>]. <http://znaniium.com/bookread2.php?book=508936> ISBN 978-985-06-2237-2. дата обращения – 20.06.2017 г.
2. Вирусология и биотехнология / Белоусова Р.В., Ярыгина Е.И., Третьякова И.В., Калмыкова М.С. Издательство "Лань", 2016г.- 220 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <https://e.lanbook.com>] <https://e.lanbook.com/reader/book/88026/#1> ISBN: 978-5-8114-2266-1. дата обращения – 20.06.2017 г.
3. Луканин А. В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств/Луканин А.В. - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. - 312 с.: 60x90 1/16. - (Высшее образование) [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=527386> ISBN 978-5-16-011479-8. дата обращения – 20.06.2017г.
4. Молчанов Г. И. Фармацевтические технологии: современные электрофизические биотехнологии в фармации: Уч. пос. / Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Л.М. Кубалова. - 2-е изд. - М.: Альфа-М: ИНФРА-М, 2014. - 336 с.: ил.; 60x90 1/16. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=314485> ISBN 978-5-98281-260-5

## Лекция № 6

### Патогенез и иммунитет при вирусных инфекциях

#### 6.1. Патогенез при вирусных инфекциях

Для возникновения и развития инфекционного процесса, вызванного вирусами, необходимо наличие следующих условий:

- 1) наличие патогенного агента, т. е. вируса;
- 2) проникновение его в восприимчивый микроорганизм, т. е. в чувствительную клетку;
- 3) определенные условия внутренней и внешней среды, в которых происходит взаимодействие между микро- и макроорганизмами, в данном случае — между вирусом и клеткой-хозяином.

Естественной средой обитания для вирусов служит организм восприимчивых животных и человека, в котором возбудитель находит благоприятные условия для жизни, репродукции и поддержания вида.

Вирусы в организм животных и человека из окружающей среды попадают теми же путями, что и другие возбудители инфекционных заболеваний:

1. Алиментарный (фекально-оральный) (ротавирусные инфекции);
2. Трансмиссивный (при помощи кровососущих переносчиков Найроби)
3. Аэрогенный (грипп)
4. Контактный (гепатит)
5. Вертикальный (от матери к плоду) (ИНАН лошадей, болезни Ауэски)

После проникновения в организм хозяина вирус вступает в контакт с чувствительными тканями и клетками.

В результате реплицируется вирус и повреждаются клетки, что и лежит в основе клинического проявления болезни, вызываемой вирусами. Кроме того, необходимо, чтобы в это время вирус сумел избежать действия хозяйских защитных факторов, правда, в некоторых случаях защитная система хозяина даже способствует развитию болезни.

Вирусы используют различные стратегии для того, чтобы избежать защитной реакции организма. Организм, в свою очередь, использует различные иммунные механизмы для преодоления «изошрений» в реализации патогенного потенциала вирусов.

Стратегии вирусов, направленные на преодоление или снижение иммунологического прессинга со стороны хозяина

1. Репликация без цитопатогенного действия
2. Распространение от клетки к клетке путем сплавления мембран
3. Латентная непродуктивная инфекция непермиссивных клеток
4. Частичная экспрессия вирусных генов
5. Разрушение эффекторных клеток иммунитета и макрофагов
6. Подавление МНС-регуляции антигенной экспрессии
7. Устранение действия цитокинов
8. Избегание нейтрализации антителами (маскирование эпитопов (антигенных детерминант. Эпитоп комплиментарен активному центру антител или антигенраспознающему рецептору Т-лимфоцита) и иммунные ловушки)
9. Индукция не нейтрализующих антител

10. Индукция иммунологической толерантности (отсутствие иммунного ответа при наличии в организме антигенов, доступных для лимфоцитов)

**Общие принципы вирусного патогенеза**

**Таблица 1**

Ход вирусной инфекции можно разделить на несколько стадий.

Организм хозяина	Клетка
Проникновение вируса в хозяина	Адсорбция
Первичная репликация	Проникновение
Распространение вируса внутри хозяина	Разделение
Клеточный и тканевой тропизм и клеточные рецепторы	Транскрипция
Повреждение клеток	Трансляция
Иммунный ответ и другие защитные факторы хозяина	Сборка вируса
Персистенция вируса, латентность и медленные вирусные инфекции	Выход из клетки

В правом столбце таблицы перечислены события, происходящие внутри клетки с момента начала заражения. Эти внутриклеточные стадии репликации вирусов в конечном счете определяют судьбу зараженной клетки, т. е. ведут к ее гибели; клеточной трансформации, характеризующейся снятием ограничения роста; персистентной или латентной инфекции. В левом столбце приведены события на уровне организма или ткани, ведущие к заражению клеток и включающие иммунный ответ хозяина. Эта схема упрощена и идеализирована в том смысле, что не все вирусы используют все эти стадии каждый раз, когда они заражают своего хозяина; многое зависит от специфики вируса и хозяина.

**Специфические стадии вирусного патогенеза**

**1. Проникновение вируса в организм хозяина**

За исключением вирусов, проникающих в организм хозяина при прямой инокуляции в кровь, таких как вирус гепатита В и многие из тога- и буньявирусов, передающихся членистоногими, большая часть вирусов проникает в организм хозяина через барьеры слизистых дыхательных путей и пищеварительного тракта. Для вирусов, вызывающих заболевание в месте проникновения, для которых не характерно дальнейшее системное распространение, таких как вирусы гриппа (респираторный) и ротавирусы (желудочно-кишечный), проникновение, продвижение к органам-мишеням и первичная репликация могут рассматриваться как одна стадия, хотя каждую из ее ступеней могут регулировать различные вирусные и хозяйские факторы. Однако вирусы, ответственные за болезни в отдаленных от входных ворот

местах, должны проникать через барьер слизистых оболочек и распространяться в организме хозяина к этим местам, где происходит репликация вируса. К ним относятся, например, энтеровирусы (проникновение через пищеварительный тракт, проявления болезни в центральной нервной системе) или вирус ветрянки (проникновение через дыхательные пути, генерализованная инфекция с проявлением болезни на коже).

## 2. Первичная репликация

Многие вирусы, прежде чем распространиться по системам, реплицируются в месте первичного проникновения в организм хозяина. Вирус экстремелии (оспы мышей) перед системным рас-пространением через кровеносную систему реплицируется в коже в месте инокуляции, а затем в региональных лимфатических узлах, где прежде всего инфицируются макрофаги. При заражении вирусом полиомиелита первичная репликация происходит в лимфоидных фолликулах дыхательных путей и пищеварительного тракта.

## 3. Распространение вируса

Вирусы могут распространяться несколькими путями в зави-симости от места проникновения и поражаемых ими органов- мишеней:

1. Нейронный путь (например, при бешенстве).
2. Лимфатический путь (много примеров).
3. Гематогенный; а) ассоциированный с клеточными элементами (например, при краснухе, или в случае цитомегаловируса); б) в свободном виде с плазмой (например, в случае энтеровирусов) .

## 4. Сродство вирусов к клеткам и тканям и клеточные рецепторы

Специфическое сродство вирусов к клеткам и тканям чаще всего определяется присутствием на клеточной поверхности особых рецепторов для вируса. В некоторых случаях существование этих рецепторов показано, хотя их точная химическая природа еще не установлена.

## 5. Повреждение клеток

Основным проявлением вирулентности вируса являются разрушение зараженных вирусом клеток в тканях-мишенях и во-никающие в результате разрушения тканей физиологические изменения в организме хозяина. Наиболее ярким проявлением действия вируса на клетки является **цитопатогенное действие (ЦПД)**, проявляющееся в виде многообразных функциональных, биохимических и структурных изменений. Некоторые вирусы (герпес, корь и др.) вызывают слияние клеток, в результате чего образуются многоядерные клетки. Это явление называется **полиокариоцитозом**. Образование многоядерных клеток происходит вследствие разрушения клеточных оболочек, в результате которого близлежащие клетки сливаются, или вследствие деления ядра клетки посредством amitоза (деления цитоплазмы).

Второе проявление влияния вируса и клетки — это **трансформация** клетки. При этом геном вируса находится в клетке в течение неопределенно долгого времени, что приводит не к гибели клетки, а к приобретению ею способности к непрерывному росту и делению. Частота, с которой происходит подобное изменение, зависит как от вируса, так и от клетки. Такая трансформация заканчивается превращением трансформированной клетки в злокачественную опухолевую клетку, что приводит к гибели животного.

По аналогии с родительскими тканями различают два типа опухолей, гистологически отличающихся друг от друга: опухоли эпителиальные,

злокачественные, которые называют *карциномами*, и опухоли соединительной ткани, злокачественные, которые называют *саркомами*.

#### **6. Иммунный ответ и другие факторы защиты хозяина**

Во время вирусной инфекции активируются как гуморальный, так и клеточный отделы иммунной системы, а так-же ряд других факторов

#### **7. Персистенция вируса, латентность и медленные инфекции**

Вирусы — генетические паразиты, и в этом отношении им нет равных среди микроорганизмов. Взаимодействие вируса и клетки — всегда взаимодействие двух геномов: вирусного и клеточного. При этом вирусный геном подавляет клеточный геном и индуцируемые ими синтезы клеточных макромолекул. Вирус репродуцируется, используя клеточные системы синтеза и аккумуляции энергии, и в конечном итоге вызывает гибель клетки хозяина. Таким образом протекает большинство острых вирусных инфекций. Однако при некоторых обстоятельствах вирусы могут персистировать или становиться латентными в организме хозяина; при этом клинические проявления или реактивация вируса могут развиваться значительно позже момента заражения. **Персистентными** называют инфекции, при которых инфекционный вирус воспроизводимо и продолжительно выделяется из организма хозяина в течение значительно большего, чем при обычной инфекции, периода. Клинические проявления при персистентной инфекции могут быть выраженными, слабыми или полностью отсутствовать. При **латентных** инфекциях вирус остается в организме хозяина в скрытой форме; он выделяется при этом из организма с перерывами, обычно связанными с клиническими рецидивами болезни. **Медленные** вирусные инфекции характеризуются очень длительным инкубационным периодом, который измеряется месяцами и годами; в этот период клинические проявления отсутствуют.

При взаимодействии вирусов с чувствительными клетками происходят репродукция и цитопатогенное действие — специфическая морфологическая деструкция (разрушение) и функциональная патология зараженных вирусами клеток. При разрушении клеток происходит выход вирусов, которые проникают в здоровые клетки и репродуцируются. Этот процесс продолжается до тех пор, пока имеются здоровые клетки. При этом образуется патологический процесс. Под действием компонентов клеток и других элементов в организме происходит изменение обменных процессов, повышается температура тела и проявляются клинические признаки болезни.

Исходом болезни может быть:

1. Гибель животного
2. Выздоровление (реконвалесценция) животных,
3. Переход в хроническую форму вирусоносительство и вирусовыделение.

**Вирусоносительство** — сохранение патогенных вирусов в организме здорового животного и выделение их в окружающую среду в течение продолжительного времени. Обычно вирус-носителями служат реконвалесценты, клиническое выздоровление которых не означает полного освобождения организма от возбудителей инфекций. Возможно вирусоносительство и в инкубационном периоде болезни, а также после активной специфической иммунизации живыми вакцинами или симультантных прививок.

**Вирусовыделение** — выделение вирусов из организма больного животного или вирусоносителя.

#### **6.2. Иммуитет при вирусных инфекциях. Виды вирусных вакцин.**

Особенность иммунитета при вирусных инфекциях обусловлена тем, что вирусы являются строгие внутриклеточными паразитами и отличаются механизмами репродукции и взаимодействия с чувствительными клетками от клеточных микроорганизмов.

При вирусных инфекциях, как и при бактериальных, после переболевания в организме формируется иммунитет различной напряженности и длительности. Следует отметить, что при попадании вируса в организме не всегда происходят иммунологические реакции. Этот вид невосприимчивости свойствен животным определенного вида к определенному возбудителю инфекции и передается из поколения в поколение, например лошади не болеют ящуром, крупный рогатый скот — сапом, собаки — чумой свиней и др. В основе механизмов такой невосприимчивости (врожденного иммунитета — видового, наследственного, генетического) к определенным возбудителям лежит отсутствие в клетках рецепторов и субстратов, необходимых для взаимодействия вирусов, наличие веществ, блокирующих репродукции вирусов. Последние не могут репродуцироваться в организме, и заболевания не происходит. Необходимо отметить, что у новорожденных во многих случаях видовая устойчивость отсутствует, например, крольчата-сосуны и мышата чувствительны к заражению вирусом ящура.

Основой противовирусного иммунитета является клеточный иммунитет. АПК, поглотившие вирусы, активируют корецептор CD4 Тн1-хелпера. Клетки-мишени уничтожаются цитотоксическими лимфоцитами, а так-же НК-клетками и фогоцитами, взаимодействующими с Fc-фрагментами антител, прикрепленных к вирусспецифичным белкам инфицированной клетки. Слизистые оболочки защищены от вирусов секреторным Ig A и IgM-антителами, которые, окружая вирионы, препятствуют адсорбции вирионов на эпителиоцитах. Противовирусные антитела, как и факторы врожденного иммунитет - сывороточные противовирусные ингибиторы, способны нейтрализовать только внеклеточно расположенные вирусы.

Интерфероны усиливают противовирусную резистентность, индуцируя в клетках синтез ферментов, подавляющих образование нуклеиновых кислот и белков вирусов. Кроме того, интерфероны оказывают иммуномодулирующее действие.

Защитные приспособления, или факторы противовирусного иммунитета, подразделяют на неспецифические и специфические.

I. Факторы неспецифического противовирусный иммунитет:

- **общие механические и физиологические;**

**1. Кожа и слизистые** (сальные и потовые железы, мерцательный эпителий слизистых оболочек, слизь, слюна, слезы, кислое рН желудка, пищеварительные ферменты) являются первым барьером для вирусов.

**2. Температура тела.** При повышении температуры тела усиливаются процессы иммуногенеза, ускоряется обмен веществ, усиливается продукция интерферона, что в совокупности способствует выздоровлению.

**3. Выделение вируса** из организма различными секретами. В удалении вирусов из организмов принимают участие и выделительные системы. Вирусы уже через короткое время (10–30 мин) появляются в моче. В отличие от бактерий, они способны проходить через почечный фильтр.

- **гуморальные;**

**Пропердин** (гамма-глобулин) содержится в нормальной сыворотке крови и принимает участие в нейтрализации вирусов. Активность проявляется не за счет

самого пропердина, а за счет системы пропердина (комплемента и двухвалентных ионов магния).

**Ингибиторы** — это неспецифические противовирусные вещества белковой природы, которые присутствуют в нормальной сыворотке крови, секретах эпителия слизистых оболочек дыхательного и пищеварительного трактов, в экстрактах органов и тканей. Помимо сывороточных ингибиторов, различают ингибиторы тканей, секретов и экстрактов. Такие ингибиторы оказались активными в отношении многих вирусов. Например, секреторные ингибиторы респираторного тракта обладают антиагглютинирующей и вируснейтрализующей активностью.

Механизм действия ингибиторов заключается в соединении их с вирусами, при этом происходит нейтрализация вирусных рецепторов, что выражается в понижении их физико-химических адсорбционных свойств. В результате вирусы теряют способность адсорбироваться на поверхности чувствительных клеток и проникать в них; вирусные частицы отторгаются с поверхности чувствительных клеток.

3. **Гормоны** могут опосредованно влиять на резистентность к вирусным агентам. Например, большие дозы кортизона снижают, а малые дозы, наоборот, повышают защитные функции организма.

#### **- клеточные**

В неспецифическом противовирусном иммунитете участвуют фагоцитирующие клетки (микро- и макрофаги).

Роль лейкоцитов в противовирусном иммунитете малоэффективна (незначительна). Вирусы адсорбируются на лейкоцитах и поглощаются ими, но последующего разрушения их в клетках не происходит: весь процесс останавливается на стадии незавершенного фагоцитоза.

Неспособность макрофагами переваривать вирусы — одна из основных особенностей механизма противовирусного и противобактериального иммунитета. Однако в противовирусном иммунитете фагоцитозу не отводится существенная роль.

Если вирус преодолевает действие гуморальных факторов иммунитета (антител и ингибиторов) и проникает в чувствительную клетку, то с этого момента начинается внутриклеточное развитие возбудителя и инфекции, вызванной им. Однако проникновение вируса в клетку не всегда сопровождается его внутриклеточным развитием. Клетка остается морфологически неизменной, деструктивные процессы в ней не происходят, и она приобретает устойчивость к повторным заражениям другими вирусами.

Подавление процесса репродукции одного вируса другим в живых клетках называется **вирусной интерференцией**. Материальной основой интерференции служит особое вещество — интерферон, образующийся клеткой в ответ на проникновение в нее вируса. Он обладает антивирусной, антипролиферативной и иммуномодулирующей активностью. По химической природе интерферон (интерфероны) представляет собой гликопротеид (белок) с молекулярной массой 20...30 кДа. Интерферон инактивируется при замораживании и оттаивании, при нагревании до 60°C в течение 1 ч и при 100°C в течение 5 мин, при облучении ультрафиолетовым излучением, разрушается трипсином и пепсином. На него не действуют рибонуклеаза и дезоксирибонуклеаза, специфические иммунные сыворотки. Он не обладает токсичностью и антигенностью; его активность проявляется как в кислой, так и в щелочной среде (рН 2,0...10,0).

**Специфический противовирусный иммунитет.** Специфическая защита животных от вирусов осуществляется иммунной системой, которая обладает

уникальной способностью распознавать множество разнообразных агентов (микроорганизмы, в том числе и вирусы, токсины и др.) — **антигенов** и вырабатывать в ответ на это распознавание специфические **антитела** и сенсibilизированные лимфоциты.

Иммунные механизмы обеспечивают: гуморальные факторы; клеточные факторы.

#### **Типы гуморального иммунного ответа**

Иммунная система организма на вирусные инфекции или иммунизацию вирусными вакцинами отвечает выработкой антител, обладающих специфичностью к различным вирусным компонентам и принадлежащих к разным классам иммуноглобулинов.

Важнейшая биологическая функция **иммуноглобулинов** - специфическое связывание с антигеном. Антитела против некоторых эпитопов на поверхности вирионов нейтрализуют инфекционность, они могут также действовать как опсонины, облегчая поглощение и разрушение макрофагами. Кроме того, антитела могут прикрепляться к вирусным антигенам на поверхности инфицированных клеток, вызывая их разрушение вследствие активации классического или альтернативного действия комплемента или с помощью активации Fc-рецепторсвязывающих клеток, таких как НК-клетки, полиморфноядерные лейкоциты и макрофаги (антителозависимая цитотоксичность).

Различают четыре основных класса антител: два мономера **IgG** и **IgE** и два полимера **IgM** и **IgA**. Все иммуноглобулины имеют подобную структуру, но широко варьируют по аминокислотной последовательности антигенсвязывающего сайта, который определяет их специфичность для данной антигенной детерминанты. N-концевая последовательность L- и H-цепей образует антигенсвязывающий центр, то есть антидетерминанту. Чем больше антидетерминант на поверхности иммуноглобулина, тем выше его активность.

**Авидность** характеризует прочность связи антитела с соответствующим антигеном.

**Аффинность** - прочность связи между отдельными антидетерминантами и детерминантами.

**IgG** является основным классом антител в крови. Он состоит из двух H- и L-цепей, каждая из которых содержит постоянные и переменные участки. Молекулы IgG содержат два идентичных антигенсвязывающих Fab-фрагмента и Fc-фрагмент, выполняющий эффекторные функции (связывание комплемента, прикрепление к фагоцитам и плацентарному или колостральному трансферу),

Первоначально антитела относятся к классу **IgM**, но соматические рекомбинации (транслокации) затем рожают класс, обусловленный связыванием V-генных сегментов различными постоянными участками H-цепей. В изменении изоформ (переход изоформ на другой путь) важная роль принадлежит различным цитокинам. Таким образом, через несколько дней IgG, IgA и иногда IgE-антитела той же самой специфичности становятся доминантными в иммунном ответе.

В начальной фазе иммунного ответа синтезируется преимущественно IgM с относительно слабым сродством к антигену (авидный класс антител). IgM является пентамером с 10 Fab-фрагментами. Синтез IgM сменяется синтезом IgG, а затем IgA.

Устойчиво высокие титры антител могут отражать также персистенцию вирусной инфекции (например, вирусов герпеса, кори) или повторную стимуляцию вирусным антигеном, однако антитела к некоторым вирусам могут персис- тировать и

без явных признаков заболевания. IgG -антитела содержатся в сыворотке крови в наиболее высокой концентрации (~12г/л), откуда они поступают в тканевую жидкость. В отличие от других иммуноглобулинов, у человека и приматов они способны проникать через плаценту и снабжать плод материнскими антителами. Период полураспада их равен 10—35 дням.

Имуноглобулин А (IgA) является димером с 4 Fab-фрагментами. Проходя через эпителиальные клетки, IgA приобретает J-фрагмент (секреторный фрагмент), становясь секреторным sIgA, который секретируется через эпителий респираторного, кишечного и урогенитального трактов. Секреторный IgA более устойчив к протеазам, чем другие иммуноглобулины, и является основным иммуноглобулином на слизистых поверхностях, в молозиве и молоке многих видов млекопитающих. Поэтому IgA-антитела играют важную роль в защите от инфекции респираторного, кишечного и урогенитального трактов. Иммунизация через слизистые при некоторых инфекциях является более эффективной, чем системное введение вакцины. Димерные формы sIgA с соединительной j-цепью синтезируются лимфоидной тканью желудочно-кишечного, респираторного и урогенитального трактов. Имеется сообщение о существовании нового класса антител — **внутриклеточных вируснейтрализующих антител**, способных подавлять репликацию вируса.

В обеспечении устойчивости к вирусной инфекции могут участвовать не нейтрализующие антитела, хотя менее эффективно, чем нейтрализующие антитела. Огромную роль в противовирусном иммунитете играют **клеточные факторы**, в основном лимфоциты: Т-лимфоциты формируются из незрелых стволовых клеток в тимусе, В-лимфоциты — в фабрициевой сумке. Т-лимфоциты первыми распознают чужеродный антиген в организме, вырабатывают особые вещества (медиаторы), которые активизируют моноциты и В-лимфоциты, убивают клетки с адсорбированными на них вирусами (или другими антигенами), вырабатывают интерферон и др. В-лимфоциты под действием переработанного моноцитами антигена и медиаторов превращаются в плазмочиты, вырабатывающие специфические антитела. Некоторые формы Т-лимфоцитов (киллеры, супрессоры, хелперы) и В-лимфоциты вместе с моноцитами образуют мощный клеточный фактор защиты организма от вирусов.

### **Противовирусные вакцины**

Современной науке известны сотни видов патогенных вирусов, относящихся к 26 семействам, избирательно поражающим различные системы организма человека и животных. Природное многообразие вирусных болезней вызывало необходимость наряду с санитарно-гигиеническими мерами прибегнуть к специфической профилактике с использованием широкого круга вакцинных препаратов. Вакцинопрофилактика занимает ведущее место в борьбе со многими вирусными заболеваниями человека и животных. Несмотря на большое разнообразие вирусов и вызываемых ими заболеваний, имеются общие принципы приготовления и применения вирусных вакцин. Однако в настоящее время не все вирусные болезни в одинаковой степени удается контролировать с помощью вакцинации. Вакцинация должна сопровождаться развитием иммунологической памяти. В идеале, это поддержание специфических антител в высокой концентрации в сыворотке крови и на месте внедрения вируса. В тоже время Т-клетки, ответственные за специфический клеточный иммунитет, должны находиться в состоянии готовности быстро синтезировать свои летальные продукты (т.е. гранзимы и перфорины), когда происходит инфицирование. Все существующие на сегодня вакцины можно разделить

на три общие группы: инактивированные (убитые), живые (аттенуированные) и компонентные (субъединичные) вакцины. Каждая из этих категорий вакцин имеет свои преимущества и недостатки.

В зависимости от технологии изготовления различают несколько типов вирусных вакцин:

**1. Живые реплицирующиеся вакцины:**

—вакцины из природно ослабленных или гетерологичных вирусов;

—вакцины из вирусов, аттенуированных пассажами в гетерологичных организмах или в культурах клеток при обычной или пониженной температуре, или ре-ассортацией вирусных генов.

**2. Нереплицирующиеся вакцины, содержащие природные вирусные антигены:**

- вакцины из инактивированных целых вирионов и неструктурных вирусных белков;

- вакцины из нативных вирусных субъединиц.

**3. Вакцины, полученные с помощью рекомбинантной ДНК или других новых технологий:**

- вакцины, полученные путем делеции гена (генов) или точечного мутагенеза;

- вакцины на основе вирусных белков, экспрессированных *in vitro* в клетках эукариотов или прокариотов;

- вакцины из вирусных белков, собранных в вирусоподобные частицы;

- вакцины, экспрессирующие вирусные антигены с помощью вирусных векторов;

- вакцины на основе вирусных химер;

- ДНК-вакцины.

**4. Синтетические полипептидные вакцины.**

Синтетические пептидные вакцины- это препараты, содеожащие искусственно синтезированные короткие пептиды, имитирующие небольшие участки протективных антигенов вирусов, способные вызывать специфический иммунный ответ организма и защитить его от конкретного заболевания. Идентификация основных антигенных детерминант протективных антигенов многих вирусов позволила синтезировать антигенноактивные пептиды.

**5. Живые вакцины** содержат авирулентные штаммы вирусов, аттенуированные разными способами, и отличаются способностью размножаться в привитом организме (реплицирующиеся антигены). Остальные типы вакцин готовят из инактивированных вирусов или их антигенных и иммуногенных компонентов (нереплицирующиеся антигены).Используя другие принципы классификации, вакцинные препараты можно разделить на две большие группы: **цельновирионные и компонентные (субъединичные)**. Причем к первой группе относятся как традиционные живые, так и инактивированные вакцины. Живые гомологичные вакцины, в свою очередь, могут различаться способом получения и быть представленными природно аттенуированными или искусственно ослабленными штаммами, включая рекомбинантные и реассортантные, а также штаммы, аттенуированные целенаправленными изменениями генома биотехнологическими методами. К компонентным (субъединичным) вакцинам можно отнести все, которые не входят в рубрику цельновирионных вакцин. Прежде всего, сюда относятся вакцины, полученные из компонентов вирионов или вирус-инфицированных клеток

после их разрушения. Кроме них к этой категории относятся субъединичные вакцины, приготовленные из вирусных белков, экспрессируемых клонированными вирусными генами в эукариотических или прокариотических системах. Сюда же можно отнести живые рекомбинантные вакцины, которые по своей сути являются реплицирующимися субъединичными вакцинами. Клонированные гены, реплицируясь в составе вирусного вектора, обеспечивают экспрессию белков, ответственных за индукцию специфического иммунитета. Вакцины на основе вирусспецифических пептидов, получаемых синтетическим путем, в известном смысле, тоже можно отнести к разряду субъединичных (эпитопных) вакцин. Вакцины, содержащие антигены более чем одного вида возбудителя, называют комбинированными (ассоциированными). Большинство применяемых в настоящее время вакцин содержит антигены, идентичные или подобные антигенам вирулентного вируса, против которого предполагается создать иммунитет. Такие вакцины называют гомологичными. В некоторых случаях для приготовления вакцин используют гетерологичные вирусы, содержащие перекрестно-реагирующие антигены и создающие достаточный иммунитет. Такие вакцины называются гетерологичными.

#### **Вопросы для самоконтроля**

1. Какие стратегии вирусов, направленные на преодоление или снижение иммунологического прессинга со стороны хозяина вы знаете?
2. Дайте характеристику специфическим стадиям вирусного патогенеза.
3. Кто такие животные-вирусоносители?
4. Охарактеризуйте семейства ДНК-содержащих вирусов. Какова их роль в патологии человека и животных?
5. Охарактеризуйте семейства РНК-содержащих вирусов. Какова их роль в патологии человека и животных?

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

9. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс] : учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. - Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с.: ил. - [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>]. <http://znaniium.com/bookread2.php?book=508936> ISBN 978-985-06-2237-2. дата обращения – 20.06.2017 г.
10. Вирусология и биотехнология / Белоусова Р.В., Ярыгина Е.И., Третьякова И.В., Калмыкова М.С. Издательство "Лань", 2016г.- 220 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <https://e.lanbook.com>] <https://e.lanbook.com/reader/book/88026/#1> ISBN: 978-5-8114-2266-1. дата обращения – 20.06.2017 г.
11. Луканин А. В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств/Луканин А.В. - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. - 312 с.: 60x90 1/16. - (Высшее образование) [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=527386> ISBN 978-5-16-011479-8. дата обращения – 20.06.2017г.
12. Молчанов Г. И. Фармацевтические технологии: современные электрофизические биотехнологии в фармации: Уч. пос. / Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Л.М. Кубалова. - 2-е изд. - М.: Альфа-М: ИНФРА-М, 2014. - 336 с.: ил.; 60x90 1/16. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=314485> ISBN 978-5-98281-260-5

## Лекция №7

**Обзор некоторых вирусов, поражающих животных. Пневмоэнтериты крупного рогатого скота. Бычий аденовирус, вирус инфекционного ринотрахеита, вирус парагриппа третьего серотипа, вирус вирусной диареи и респираторно-синцитиальной вирус крупного рогатого скота: строение вирионов, особенности репродукции и антигенных свойств, характеристика болезней, вызываемых этими вирусами, особенности их диагностики и специфической профилактики.**

### **7.1. Инфекционный ринотрахеит, вирус парагриппа и респираторно-синцитиальной инфекция крупного рогатого скота**

(по Барышникову П.И., 2006)

#### ***Инфекционный ринотрахеит***

Вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота относится к роду *Varicellovirus* семейства герпесвирусов.

Морфология и химический состав. Вирионы герпесвирусов имеют округлую форму, диаметр от 85 до 250 нм и состоят из 4 структурных компонентов: сердцевины, капсиды, мембраны и липопротеидной оболочки. Сердцевина представлена непрерывной линейной двуспиральной молекулой ДНК с молекулярной массой 10-12·10<sup>7</sup> Д, с содержанием Г+Ц 56-74%. ДНК обладает инфекционностью. Капсид имеет икосаэдрическую форму, содержит 162 капсомера и покрыт внутренней мембраной. Наружные структуры вириона состоят из двуслойной липопротеидной оболочки с выступами на поверхности.

По химическому составу вирусы на 70% состоят из белка, 22% - липидов, 6,5% - ДНК и 1,5% - углеводов.

*Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота* (*Rhinotracheitis infectiosa bovim*) - остро протекающая контагиозная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, катарально-некротическим воспалением верхних дыхательных путей, поражением глаз, половых органов, центральной нервной системы, абортами. В естественных условиях заболевает только крупный рогатый скот независимо от породы, возраста и пола, но наиболее тяжело - откормочное поголовье. Источниками болезни являются больные и переболевшие животные, выделяющие вирус с носовым секретом, истечениями из глаз и половых органов, с молоком, мочой, калом, спермой. Заражение происходит аэрогенно, а также при осеменении (случке) и через объекты внешней среды. Инфекционный ринотрахеит чаще возникает в хозяйствах промышленного типа, при комплектовании групп животных с разным иммунным статусом.

Инкубационный период обычно 2-4 дня, болезнь протекает остро в респираторной и генитальной формах. При респираторной форме у животных внезапно повышается температура тела, учащается пульс и дыхание, развивается одышка, обильное слюнотечение, серозно-слизистые, а позднее гнойные выделения из носовых отверстий. Слизистые оболочки носа, глотки, гортани набухшие, отечные, носовое зеркало гиперемировано (красный нос). На слизистой оболочке носа и носовом зеркальце появляются эрозии и язвы. У больных животных отмечают сухой болезненный кашель, хрипы в легких и развитие пневмонии. У телят первых месяцев жизни развиваются пневмоэнтериты, нервные явления, возможно поражение глаз. У беременных животных на 6-8-м месяцах могут развиваться аборт. При генитальной форме у коров отмечают выраженную гиперемию и отек слизистой вульвы и

влагалища. В дальнейшем здесь появляются пузырьки с прозрачной жидкостью, а после их вскрытия - эрозии и язвы, покрытые слизью и пленками фибрина, из влагалища выделяются слизисто-гнойные истечения. У быков воспалительный процесс с аналогичными поражениями обычно локализуется на слизистой оболочке препуция.

Патологоанатомические изменения при респираторной форме характеризуются слизисто-гнойными скоплениями в просвете носовых ходов, гортани и трахеи. Слизистая оболочка здесь набухшая, отечная с очагами некроза, язвочками и кровоизлияниями, а при осложнении отмечают катаральную или гнойнокатаральную пневмонию. При генитальной форме обнаруживают отечность, везикулы и язвочки на слизистых оболочках половых путей, в отдельных случаях - эндометриты.

Устойчивость вируса. Быстро теряет активность в кислой среде и при действии эфира, ацетона, хлороформа, этилового спирта. При  $-60...-70^{\circ}\text{C}$  сохраняется 7-9 мес.,  $+37^{\circ}\text{C}$  - 4-10 сут.,  $+56^{\circ}\text{C}$  - 20 мин., в сперме быков - от 4 мес. до 1 года.

Антигенные свойства вируса. Существует три типа вируса: 1-й, 2-й (подтипы 2а и 2б) и 3-й (подтипы 3а и 3б). У вируса выделено и охарактеризовано девять структурных белков: VP105, VP90, VP74, VP64, VP54, VP50, VP47, VP40, VP31. Наибольшей иммуногенностью обладают VP74 и VP90. Вирусы, выделенные при респираторном и генитальном синдромах, в антигенном отношении идентичны, однако имеют различную электрофоретическую подвижность. В организме он индуцирует образование вируснейтрализующих, комплементсвязывающих и преципитирующих антител.

Экспериментальная инфекция воспроизводится на телятах, овцах и козах при интратрахеальном, интраназальном, алиментарном и внутривенном заражении. Болезнь обычно протекает в виде ринотрахеита с конъюнктивитом. При введении вируса в половые органы появляется локальная инфекция в виде инфекционного пустулезного вульвовагинита.

Локализация и выделение вируса. Вирус имеет тропизм к клеткам органов дыхания и размножения. Выделяется преимущественно с истечениями из носа и влагалища. Может быть обнаружен в слюне, моче, молоке, фекалиях, сперме. Продолжительность вирусоносительства у животных-реконвалесцентов наблюдается до 6-12 и даже 19 мес.

Гемагглютинирующая активность. Концентрированный вирус агглютинирует эритроциты мышей, хомяка, морской свинки, крысы и человека, что связано с мажорным гликопротеином VP90, расположенным в шипиках вирионов.

Культивирование вируса. Вирус легко культивируется в культуре клеток почки телят или эмбрионов коров, ЦПД наступает через 48-96 ч. При заражении перевиваемых линий почек и тестикул телят изменения развиваются на 4-6-е сут. и характеризуются подавлением митотической активности клеток и образованием внутриядерных включений, которые, сливаясь между собой, образуют одно крупное включение с выделенным светлым ободком. Кроме того, используют органные культуры слизистых оболочек верхних дыхательных путей, ротовой полости, желудочно-кишечного тракта и конъюнктивы, ЦПД здесь развивается через 29 дней фокусно по периферии эксплантантов. В культуре клеток под агаровым покрытием на 4-6-е сут. вирус вызывает образование бляшек диаметром 1-2 мм.

Лабораторная диагностика. При жизни от животного в лабораторию направляют слизь из носовой полости, глаз, влагалища, препуция, парные сыворотки крови; от трупа - кусочки трахеи, носовой перегородки, лёгких, печени, селезёнки,

лимфатических узлов, от абортированных плодов - плодовые оболочки, паренхиматозные органы. Диагноз ставят на основании выделения вируса в культуре клеток почек, лёгких и семенников крупного рогатого скота с последующей идентификацией в РН, ИФА, РНГА. Для экспресс-диагностики применяют МФА, парные сыворотки крови исследуют в РДП, ИФА и РНГА.

Для специфической профилактики применяют живые и инактивированные вакцины: живую вакцину ТК-А (ВИЭВ), ассоциированную культуральную вакцину Бивак (парагрипп-3), вакцину инактивированную комбинированную Комбовак (парагрипп-3, вирусная диарея, респираторно-синцитиальная, рота- коронавирусные болезни телят). В племенных хозяйствах применяют только инактивированные вакцины.

### ***Парагрипп крупного рогатого скота***

Вирус парагриппа крупного рогатого скота относится к роду *Respirovirus* подсемейства *Paramyxovirinae* семейства *Парамиксовирусов* (от греч. *para* - около и *myxa*-слизь).

Морфология и химический состав вирусов. Вирусные частицы округлой формы, размером 150-300 нм. Геном представлен односпиральной линейной молекулой РНК с молекулярной массой 6-8-10<sup>6</sup>Д. Капсидная оболочка имеет спиральный тип симметрии. Липопротеидная оболочка покрыта выступами длиной 8-12 нм. В вирионах содержится 70% белка, 20-25% липидов, 6% углеводов и 0,5% РНК.

*Парагрипп крупного рогатого скота (Paragrippus bovim)* - остропротекающая контагиозная вирусная болезнь, преимущественно молодых животных, характеризующаяся лихорадкой и катаральным воспалением верхних дыхательных путей, а в тяжелых случаях и поражением легких. Парагриппом обычно болеют телята в возрасте от 10 дней до года. Животные чаще заражаются аэрогенно, но возможны алиментарный и половой пути инфицирования. Заболеваемость животных может достигать более 70%, а летальность - 2% и выше (до 20%). Широкому перезаражению способствуют перегруппировка, перевозка, нарушение условий и технологии содержания животных. Серологическими исследованиями установлена широкая циркуляция вируса среди здорового крупного рогатого скота всех возрастных групп (до 80-100%), а также у овец, свиней, лошадей, буйволов и многих видов птиц, что определяет его постоянное и повсеместное сохранение в природе.

Инкубационный период болезни составляет 1-5 дней и начинается с повышения температуры тела до 41,6<sup>0</sup>С. Животные быстро худеют, шерстный покров становится взъерошенным и тусклым. Со 2-3-го дня болезни появляются кашель и хрипы, из носовых отверстий выделяется в начале серозно-слизистый, а позднее - слизисто-гнойный экссудат. Нередко отмечают слезотечение, слюноотделение, у отдельных телят - энтерит и бронхопневмонию.

Патологоанатомические изменения характеризуются катаральным воспалением слизистых оболочек верхних дыхательных путей с обильным скоплением слизистого и слизистогнойного экссудата, иногда - с единичными мелкими кровоизлияниями.

Устойчивость вируса. Вирус хорошо переносит лиофилизацию и сохраняет высокую активность при +4<sup>0</sup>С не менее 2 лет, он инактивируется при +50<sup>0</sup>С в течение 120 мин., при +60<sup>0</sup>С - 30 мин., высокочувствителен к действию ультрафиолетовых лучей, жирорастворителей, рН 3,4 и 0,5%-ному формалину.

Антигенные свойства вируса. Вирус обладает выраженной антигенной активностью и имеет 2 антигена: рибонуклеопротеидный (S-АГ) и поверхностный (V-АГ). В организме он индуцирует синтез антител, которые выявляются в РН, РСК, РТГА и РДП.

Экспериментальная инфекция воспроизводится при внутримышечном, внутривенном и аэрогенном заражении 3-6-месячных телят с отрицательными серологическими показателями.

Локализация и выделение вируса. Вирус локализуется в тканях гортани, трахеи, легких, миндалин, надгортанных и бронхиальных лимфоузлов. Выделение происходит преимущественно с носовой слизью, у быков-производителей - со спермой.

Гемагглютинирующая и гемадсорбирующая активность. Вирус агглютинирует эритроциты морской свинки, кролика, свиньи, коровы, мышей, овец при +4°C, несколько слабее - при +37°C. В заражённой культуре клеток вирус вызывает диффузную адсорбцию эритроцитов морской свинки, кролика, мышей и др. животных.

Культивирование вируса. Вирус хорошо размножается в первичной культуре клеток почки телят, эмбрионов коров, лёгких и тестикул телят с образованием синцития и вакуолей. Он также размножается в перевиваемых культурах клеток (HeLa, Vero, Herp-2, KB, ВНК-21) и куриных эмбрионах.

Лабораторная диагностика включает в себя:

- обнаружение антигена в патологическом материале от больных животных методом флюоресцирующих антител (мазки, отпечатки, гистосрезы);
- выделение вируса в культуре клеток и его идентификация в РТГА, МФА, ИФА и др.;
- выявление антител в сыворотке крови больных и переболевших животных в РТГА;
- обнаружение 4-кратного и более прироста антител в парных пробах сывороток.

Для специфической профилактики применяют живые (моно- валентную Паравак, бивалентную-Бивак (инфекционный ринотрахеит), трёхвалентную-Тривак (инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея) и инактивированные (Комбовак-инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, респираторно-синцитиальная, рота- и коронавирусные болезни телят) вакцины.

#### **Респираторно-синцитиальная инфекция крупного рогатого скота**

Респираторно-синцитиальный вирусы крупного рогатого скота относится к роду *Pneumovirus* семейства Парамиксовирусов (от греч. *para* - около и *muха*

- слизь)

Морфология и химический состав вирусов. Вирусные частицы округлой формы, размером 150-300 нм. Геном представлен односпиральной линейной молекулой РНК с молекулярной массой 6-8-10<sup>6</sup>Д. Капсидная оболочка имеет спиральный тип симметрии. Липопротеидная оболочка покрыта выступами длиной 8-12 нм (рис. 21, 22). В вирионах содержится 70% белка, 20-25% липидов, 6% углеводов и 0,5% РНК.

*Респираторно-синцитиальной инфукция крупного рогатого скота (РС-инфекция)* характеризуется поражением респираторного тракта и кратковременной гиперемией его у крупного рогатого скота.

*Симптомы:* симптомы обычно прогрессируют слабо и могут быть незамечены. Если болезнь прогрессирует, то отмечается кашель, повышенное слюноотделение, серозное истечение из носа, учащенное дыхание. В большинстве случаев процесс ограничивается повышенной температурой, катаром верхних дыхательных путей и ринитом. Болезнь длится, как правило, 3-10 дней и заканчивается выздоровлением.

Устойчивость: нестоек к замораживанию, при 4°C погибает через неделю, при 56 °C – через 30 мин. Вирус чувствителен к эфиру, хлороформу и трипсину

Антигенная структура: имеет белок слияния - F<sub>0</sub> –белок.

Локализация и выделение вируса. В организме больных животных вирус локализуется в слизистой оболочке респираторного тракта. Возможно длительное вирусоносительство у телят.

Экспериментальная инфекция легко воспроизводится на телятах, интраназальном заражении.

Культивирование вируса осуществляют в первичных культурах клеток почки, семенников, легких, селезёнки крупного рогатого скота

Лабораторная диагностика включает в себя:

- обнаружение антигена в патологическом материале от больных животных методом флюоресцирующих антител (мазки, отпечатки, гистосрезы);
- выделение вируса в культуре клеток и его идентификация в РТГА, МФА, ИФА и др.;
- выявление антител в сыворотке крови больных и переболевших животных в РТГА, РСК, РН;

Для специфической профилактики предложены живые вакцины KB 94 (Франция), вакцина из штамма Risposal (Нидерланды). Иммунитет сохраняется в течение 5 мес. После вакцинации.

## **7.2 Вирусная диареи и аденовирусная инфекция крупного рогатого скота**

### **Вирусная диарея крупного рогатого скота**

Возбудитель вирусной диареи крупного рогатого скота относится к роду Pestivirus семейства Флавивирусов (от лат. flavus - жёлтый)

Морфология и химический состав вирусов. Вирионы имеют сферическую форму, диаметр 35-60 нм. Они состоят из нуклеоида, представленного однонитиевой РНК с молекулярной массой 4-10<sup>6</sup>Д, капсидной оболочки с кубическим типом (икосаэдр) симметрии, состоящей из 92 капсомеров и двухслойной липопротеидной оболочки, на поверхности которой есть ворсинки . Вирус содержит белок - 57-66%, липиды - 17-31, углеводы - 6-9 и РНК - 3-8%.

*Вирусная диарея крупного рогатого скота* (болезнь слизистых оболочек, Diarrhea viralis bovum) - острая контагиозная болезнь, характеризующаяся лихорадкой, эрозийно-язвенным воспалением слизистых оболочек пищеварительного тракта и дыхательных путей, сопровождается кровавой диареей, конъюнктивитом и ринитом. У коров могут быть аборт.

Вирусной диареей болеет крупный рогатый скот обычно с двухмесячного возраста до 2 лет (чаще 5-6 мес.). Описаны случаи заболевания буйволов, оленей, косуль. Установлено наличие специфических антител у многих клинически здоровых животных. Заражение происходит алиментарным и аэрогенным путями, внутриутробно, возможно через инфицированную сперму. Болезнь чаще протекает в виде эпизоотических вспышек, в основном в холодное время года. Может поражаться

от 2 до 100% животных, а летальность достигает 50%. Инкубационный период при вирусной диарее составляет от 2 до 14 дней. Болезнь начинается с повышения температуры тела до 40,5-42<sup>0</sup>С, сопровождается гиперемией слизистых оболочек носовой полости и слизистыми истечениями из носовых отверстий. На слизистой оболочке ротовой полости обнаруживают покрасневшие участки, эрозии, язвы, покрытые сероватыми наложениями. Возможно образование язв на носовом зеркале, слизистой оболочке носа и влагалища. Через несколько дней появляется изнуряющий понос, со зловонными каловыми массами, примесью слизи, крови и пузырьков воздуха. В отдельных случаях в области межкопытной щели обнаруживают язвы и эрозии, что приводит к хромоте и неохотному передвижению животных. У стельных животных бывают аборты и снижение удоев.

Патологоанатомические изменения характеризуются истощением, обезвоживанием, наличием на слизистых оболочках пищеварительного тракта язв и эрозий неправильной формы, особенно на деснах, твердом небе и сычуге. Слизистая оболочка тонкого отдела кишечника набухшая, с кровоизлияниями, содержимое водянистое, зловонное, с примесью слизи и крови. Печень увеличена, охряного цвета с серыми очагами. Почки набухшие, с кровоизлияниями под капсулой. Кровоизлияния также могут быть под эпи- и эндокардом. У некоторых животных в легких отмечают пневмонию.

Устойчивость вируса. Вирус чувствителен к эфиру, хлороформу и трипсину. Быстро инактивируется теплом и в кислой среде, но обладает высокой устойчивостью при +4<sup>0</sup>С, -20<sup>0</sup>С, -40<sup>0</sup>С и в лиофилизированном состоянии; в крови, лимфоузлах, селезёнке и в другом патматериале при -15<sup>0</sup>С сохраняется до 6 мес.

Антигенные свойства вируса. В структуре вируса установлено 8 вирусспецифических белков: VP1-VP8. Все штаммы в антигенном отношении идентичны, но различаются по вирулентности, тропизму и цитопатогенному действию. В организме животных вирус индуцирует образование вируснейтрализующих, преципитирующих и комплементсвязывающих антител. Вирус диареи крупного рогатого скота имеет родство с вирусом чумы свиней.

Экспериментальная инфекция легко воспроизводится на телятах в возрасте от 2 до 6 мес. при внутривенном, интраназальном, внутрибрюшинном и подкожном введении вируссодержащего материала, а также контактным путём. Есть сообщения о возможности экспериментального заражения овец, коз, поросят и кроликов.

Локализация и выделение вируса. В организме больных животных вирус локализуется в слизистой оболочке желудочнокишечного тракта, в крови, лимфатических узлах, паренхиматозных органах. Он выделяется с калом, мочой, слюной, носовыми и глазными секретами, а также с экссудатом местных очагов поражения. Вирусоносительство может быть до 200 дней и более.

Культивирование вируса осуществляют в первичных культурах клеток почки эмбриона крупного рогатого скота, семенников телёнка или ягнёнка, перевиваемой культуре клеток селезёнки эмбриона крупного рогатого скота, в макрофагах и лимфоцитах, культивируемых *in vitro*. Цитопатические изменения наступают на 2-5-е сут. и характеризуются мелкозернистой инфильтрацией, округлением и отторжением клеток; есть нецито- патогенные штаммы вируса. Некоторые штаммы вируса после адаптации можно культивировать в куриных эмбрионах при заражении в желточный мешок: на 3-6-е сут. около половины эмбрионов погибает.

Лабораторная диагностика включает обнаружение антигена вируса диареи в РИФ (мазки, отпечатки, срезы), выделение возбудителя из патологического материала

в культуре клеток и его идентификация в РН или РИФ, а также выявление антител в сыворотке крови больных и переболевших животных (метод парных сывороток) в РСК, РНГА и РН. В лабораторию направляют патологический материал от больных животных, взятый в первые 2-3 дня при выраженных симптомах болезни, или от животных, убитых с диагностической целью в острой стадии заболевания: смывы со слизистой оболочки носовой полости, соскобы с изъязвленных и эрозированных участков слизистых оболочек, кровь, кусочки лёгких с бронхом, селезёнки, лимфоузлы, миндалины, поражённые участки слизистых оболочек.

Для специфической профилактики предложены живые (откормочные хозяйства) и инактивированные (Комбовак - инфекционный ринотрахеит, парагрипп-3, респираторно-синцитиальная, рота- и коронавирусные болезни телят) (репродуктивные хозяйства) вакцины. Продолжительность иммунитета в зависимости от вида вакцины от 1 до 5 лет.

#### ***Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота***

Семейство Аденовирусов (от греч. aden - железа) объединяет группу вирусов, поражающих животных, и включает в себя два рода:

- род Mastadenovirus: около 80 серотипов аденовирусов млекопитающих, выделенных от человека, обезьян, крупного рогатого скота, свиней, собак, лошадей, мышей; род Aviadenovirus: аденовирусы птиц, около 14 серотипов.

Морфология и химический состав вируса. Размеры аденовирусов - 70-80 нм, форма - сферическая. Нуклеоид представлен двуспиральной нефрагментированной инфекционной линейной молекулой ДНК с молекулярной массой 2-3·10<sup>7</sup> Д. Нуклеиновая кислота имеет в своём составе около 60 генов и несёт информацию для кодирования 30-50 белков, содержание Г + Ц - от 48 до 61%. Капсидная оболочка состоит из 252 капсомеров, имеющих кубический тип симметрии и форму икосаэдра. В вершинах его плоскостей находятся пентоны, имеющие отростки и отходящие в виде 12 антенн (рис. 12, 13).

Вирусы состоят из 86-88% белка и 12-14% ДНК.

*Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота* (Bovine Adenoviral Infections) - остропротекающая вирусная болезнь, характеризующаяся поражением органов дыхания, пищеварения и конъюнктивитами.

Заражение животных происходит воздушно-капельным и алиментарным путями, а также через конъюнктиву. Болеют чаще телята в возрасте от 2 нед. до 4 мес. Летальность у телят раннего возраста может достигать 60%. У клинически здоровых животных всех возрастов установлено латентное вирусоносительство.

Болезнь проявляется повышением температуры тела до 41,5°C, слезотечением, серозным, а позднее слизистым и гнойным истечением из носа, кашлем, тимпанией, коликами и диареей.

При патологоанатомическом вскрытии обнаруживают признаки геморрагического катарального гастроэнтерита и уплотнение, ателектаз и эмфизему лёгких.

Устойчивость вируса является достаточно высокой к действию трипсина, эфира, хлороформа, сапонина, дезоксихолата натрия и 50%-ному этиловому спирту. Вирус быстро инактивируется абсолютным этиловым спиртом, 0,1-0,3%-ным формалином, ультрафиолетовыми лучами за 30-60 мин. Он сохраняет активность при рН от 3,0 до 9,0 в течение 3 ч при +20-22°C, при -30°C - длительное время, при +4°C - более 6 мес., при +36°C - 15-60 дней, при +56°C - 1-3 дня; устойчив к повторному замораживанию и оттаиванию.

Антигенные свойства вируса. При репродукции аденовирусов в клетках образуются неинфекционные растворимые антигены трёх видов: А, В и С

. По антигену А штаммы серотипов 1-3 отличаются от штаммов серотипов 4-9 в РСК и РДП, и на основании этого все аденовирусы крупного рогатого скота делят на две антигенные подгруппы. Установлено антигенное родство аденовирусов крупного рогатого скота и человека - они обладают общим группоспецифическим антигеном.

Экспериментальная инфекция воспроизводится на телятах 15-30-дневного возраста и проявляется пневмоэнтеритами при явлениях общей слабости, летальность может достигать 60%. У животных старшего возраста болезнь протекает хронически.

Локализация и выделение вируса. Аденовирусы локализуются в конъюнктиве, носовой полости, гортани и выделяются с истечениями из глаз, носа, а также с фекалиями.

Гемагглютинирующая активность аденовирусов зависит от серотипа, вида и концентрации эритроцитов, температуры и рН среды. Обычно штаммы аденовирусов 1-го и 2-го серотипов агглютинируют эритроциты белых крыс, у штаммов 3-5-х серотипов это свойство проявляется только после концентрирования, а штаммы 6-9-х серотипов - негемагглютинирующие.

Культивирование вируса осуществляют в культуре клеток из почки эмбриона коров или тестикул быков, реже используют лёгкие эмбрионов коров. В заражённой культуре клеток они вызывают цитопатические изменения в виде включений, укрупнения и округления клеток, которые агрегируются в конгломераты с образованием в монослое пустот, напоминающих соты. Аденовирусы 1-3-х серотипов индуцируют образование одного включения неправильной формы, а 4-6-х - множественных внутриядерных включений правильной округлой формы. В культуре клеток под агаровым покрытием при 37°C через 5-7 дней образуются бляшки диаметром 0,5 мм.

Лабораторная диагностика включает:

- выделение вируса в культуре клеток из носоглоточных смывов, взятых в период острого течения болезни, и фекалий от больных телят до 10-го дня болезни;
- идентификацию вируса в МФА, РСК, РДП, РН и РТГА;
- ретроспективную серологическую диагностику по наличию антител у больных и переболевших животных в РНГА, ИФА.

Специфическая профилактика аденовирусной инфекции крупного рогатого скота предполагает применение инактивированной вакцины из штаммов двух серологических групп, а также бивалентной вакцины, содержащей аденовирусы двух групп и возбудителя пастереллеза крупного рогатого скота

*Вопросы для самоконтроля*

1. Назовите и охарактеризуйте возбудителя парагриппа крупного рогатого скота. Какая специфическая профилактика применяется при данном заболевании.
2. Назовите и охарактеризуйте возбудителя ринотрахеита крупного рогатого скота. Какая специфическая профилактика применяется при данном заболевании.
3. Назовите и охарактеризуйте возбудителя респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота. Какая специфическая профилактика применяется при данном заболевании.

4. Назовите и охарактеризуйте возбудителя аденовирусной инфекции крупного рогатого скота. Какая специфическая профилактика применяется при данном заболевании.

5. Назовите и охарактеризуйте возбудителя вирусной диареи крупного рогатого скота. Какая специфическая профилактика применяется при данном заболевании.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

а) основная литература (библиотека СГАУ)

13. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс] : учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. - Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с.: ил. - [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>]. <http://znaniium.com/bookread2.php?book=508936> ISBN 978-985-06-2237-2. дата обращения – 20.06.2017 г.

14. Вирусология и биотехнология / Белоусова Р.В., Ярыгина Е.И., Третьякова И.В., Калмыкова М.С. Издательство "Лань", 2016г.- 220 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <https://e.lanbook.com>] <https://e.lanbook.com/reader/book/88026/#1> ISBN: 978-5-8114-2266-1. дата обращения – 20.06.2017 г.

15. Луканин А. В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств/Луканин А.В. - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. - 312 с.: 60x90 1/16. - (Высшее образование) [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=527386> ISBN 978-5-16-011479-8. дата обращения – 20.06.2017г.

16. Молчанов Г. И. Фармацевтические технологии: современные электрофизические биотехнологии в фармации: Уч. пос. / Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Л.М. Кубалова. - 2-е изд. - М.: Альфа-М: ИНФРА-М, 2014. - 336 с.: ил.; 60x90 1/16. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=314485> ISBN 978-5-98281-260-5

б) дополнительная литература

1. Белоусова, Р. В. Ветеринарная вирусология : учебник / Р. В. Белоусова, Э. А. Преображенская, И. В. и Третьякова ; Международная ассоциация "Агрообразование". - М. : КолосС, 2007. - 424 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 978-5-9532-0416-3

2. Инфекционные болезни животных : учебник / А.А. Сидорчук, Н.А. Масимов, В.Л. Крупальник [и др.] ; под ред. А.А. Сидорчука. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : ИНФРА- М, 2017. — 954 с. + Доп. материалы [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>]. <http://znaniium.com/bookread2.php?book=641846> (Высшее образование: Специалитет). дата обращения – 20.06.2016 г.

3. Вирусология и биотехнология: учебное пособие / Фирсов Г.М., Акимова С.А., - 2-е изд., дополненное - Волгоград: Волгоградский ГАУ, 2015. - 232 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=615175>. дата обращения – 20.06.2016 г.

## Лекция №8

### Введение в биотехнологию. Биотехнологическое получение белков, ферментов, антибиотиков витаминов, интерферона.

#### 8.1. Введение в биотехнологию. Экологическая, сельскохозяйственная, промышленная биотехнология.

Человек с древнейших времен использовал биотехнологии в виноделии, пивоварении или хлебопечении. Но процессы, лежащие в основе этих производств, долго оставались загадочными. Их природа прояснилась лишь в конце XIX — начале XX века, когда были разработаны методы культивирования микроорганизмов, пастеризации, выделены чистые линии бактерий и ферменты. Для обозначения наиболее тесно связанных с биологией разнообразных технологий раньше использовали такие наименования, как «прикладная микробиология», «прикладная биохимия», «технология ферментов», «биоинженерия», «прикладная генетика», «прикладная биология». Это привело к возникновению новой отрасли — биотехнологической.

Французский химик Луи Пастер в 1867 году доказал, что брожение — это результат жизнедеятельности микроорганизмов. Немецкий биохимик Эдуард Бухнер уточнил, что оно вызывается и бесклеточным экстрактом, содержащим ферменты, катализирующие химические реакции. Использование чистых ферментов для переработки сырья послужило толчком к развитию зимологии. Например, альфа-амилаза требуется для расщепления крахмала.

В это же время сделаны важные открытия в области нарождавшейся генетики, без которой была бы немыслима биотехнология современного уровня. В 1865 году австрийский монах Грегор Мендель ознакомил Брюннское общество естествоиспытателей со своими «Опытами над растительными гибридами», в которых он описал законы передачи наследственности. В 1902 году биологи Уолтер Саттон и Теодор Бовери предположили, что передача наследственности связана с материальными носителями — хромосомами. Уже тогда было известно, что живой организм состоит из клеток. Немецкий патолог Рудольф Вирхов дополняет клеточную теорию принципом «каждая клетка — из клетки». А опыты ботаника Готлиба Хаберландта продемонстрировали, что клетка может существовать в искусственной среде и отдельно от организма. Эксперименты последнего привели к открытию роли витаминов, минеральных добавок и гормонов.

Годом рождения самого термина «биотехнология» принято считать 1919-й, когда был опубликован манифест «Биотехнология переработки мяса, жиров и молока на больших сельскохозяйственных фермах». Его автор — венгерский агроэкономист, в то время министр продовольствия Карл Эреки. Манифест описывал переработку сельскохозяйственного сырья в другие пищевые продукты с помощью биологических организмов. Эреки предсказывал новую эпоху в истории человечества, сравнивая открытие этого метода с величайшими технологическими революциями прошлого: появлением производящего хозяйства в эпоху неолита и металлургии в бронзовом веке. Но до конца 1920-х годов под биотехнологией подразумевалось лишь использование микроорганизмов для ферментации. В 1930-е развивается медицинская биотехнология. Открытый в 1928 году Александром Флемингом пенициллин, производимый из грибов *Penicillium notatum*, уже в 1940-х годах начал выпускаться в промышленных масштабах. А в конце 1960-х — начале 1970-х годов была сделана

попытка объединить пищевую промышленность с нефтеперерабатывающей. Компания British Petroleum разработала технологию бактериального синтеза кормового белка из отходов нефтепромышленности.

В 1953 году было совершено открытие, которое вызвало впоследствии переворот в биотехнологии: Джеймс Уотсон и Фрэнсис Крик расшифровали структуру ДНК. И в 1970-х годах к биотехнологическим приемам добавилось манипулирование наследственным материалом. Буквально за два десятилетия были открыты все необходимые для этого инструменты: выделена обратная транскриптаза — фермент, который позволяет «переписывать» генетический код из РНК обратно в ДНК, открыты ферменты для разрезания ДНК, а также полимеразная цепная реакция для многократного воспроизводства отдельных фрагментов ДНК.

В 1973 году создан первый генетически рекомбинантный организм: в бактерию был перенесен генетический элемент от лягушки. Началась эра генетической инженерии, которая едва сразу же не закончилась: в 1975 году в городе Асиломар (США) на Международном конгрессе, посвященном изучению рекомбинантных ДНК-молекул, впервые были высказаны опасения относительно применения новых технологий.

«Тревогу забили не политики, не религиозные группы и не журналисты, как можно было бы ожидать. Это были сами ученые, — вспоминал Пол Берг, один из организаторов конференции и пионер создания рекомбинантных молекул ДНК. — Многие ученые опасались, что общественные дебаты приведут к неоправданным ограничениям на молекулярную биологию, но они поощряли ответственную дискуссию, приведшую к консенсусу». Участники конгресса выступили за мораторий на ряд потенциально опасных исследований.

Тем временем от биотехнологии и генетической инженерии отпочковалась синтетическая биология, которая занимается дизайном новых биологических компонентов и систем и редизайном уже существующих. Первой ласточкой синтетической биологии стал искусственный синтез транспортной РНК в 1970 году, а сегодня возможен уже синтез целых геномов из элементарных структур. В 1978 году фирма Genentech сконструировала в лаборатории бактерию *E.coli*, синтезирующую человеческий инсулин. С этого момента генетическая рекомбинация окончательно входит в арсенал биотехнологии и считается едва ли не ее синонимом. Одновременно был осуществлен первый перенос новых генов в геномы животной и растительной клетки. Нобелевский лауреат 1980 года Уолтер Гилберт заявил: «Мы можем получить для медицинских целей или для коммерческого применения фактически любой человеческий белок, способный влиять на важные функции человеческого тела».

В 1985 году проходят первые полевые испытания трансгенных растений, устойчивых к гербицидам, насекомым, вирусам и бактериям. Появляются патенты на растения. Начинается расцвет молекулярной генетики, бурно развиваются аналитические методы, такие как секвенирование, то есть определение первичной последовательности белков и нуклеиновых кислот.

В 1995 году на рынок было выпущено первое трансгенное растение (томат Flavr Savr), а уже к 2010 году трансгенные сельскохозяйственные культуры выращивали в 29 странах на 148 миллионах гектаров (10% от общей площади возделываемых земель). В 1996 году на свет появляется первое клонированное животное — овца Долли. К 2010 году было клонировано больше 20 видов животных: коты, собаки, волки, лошади, свиньи, муфлоны.

Таблица №2

## Направления биотехнологии и получаемые с ее помощью продукты

Отрасль	Примеры
Сельское хозяйство	Получение новых штаммов; новые методы селекция растений и животных (включая клонирование)
Производство химических веществ	Получение органических кислот (например, лимонной, итаконовой); использование ферментов в составе моющих средств
Энергетика	Увеличение потребления биогаза; крупномасштабное производство этанола как жидкого топлива
Контроль за состоянием окружающей среды	Совершенствование методов тестирования и мониторинга; прогнозирование превращений ксенобiotиков; улучшение методов переработки отходов, особенно промышленных
Пищевая промышленность	Создание новых методов переработки и хранения пищевых продуктов; получение пищевых добавок; использование белка, синтезируемого одноклеточными организмами; получение ферментов для переработки пищевого сырья
Материаловедение	Выщелачивание руд; контроль биоразложения

### Технологии в биотехнологии

**Технология** — это способы и приемы, используемые для получения из исходного материала (сырья) некоторого продукта. Очень часто для получения одного продукта требуется не один, а несколько источников сырья, не один способ или прием, а последовательность нескольких. Все многообразие технологий можно подразделить на три основных класса: физико-механические технологии; химические технологии; биотехнологии.

**В физико-механических технологиях** исходный материал (сырье) в процессе получения продукта меняет форму или агрегатное состояние без изменения своего химического состава.

**В химических технологиях** в процессе получения продукта сырье претерпевает изменения химического состава.

*Биотехнология как наука может рассматриваться в двух временных и существенных измерениях: современном и традиционном, классическом.*

**Новейшая биотехнология (биоинженерия)** — это наука о генно-инженерных и клеточных методах и технологиях создания и использования генетически трансформированных (модифицированных) растений, животных и микроорганизмов в целях интенсификации производства и получения новых видов продуктов различного назначения.

**В традиционном, классическом** смысле биотехнологию можно определить как науку о методах и технологиях производства, транспортировки, хранения и переработки сельскохозяйственной и другой продукции с использованием обычных, нетрансгенных (природных и селекционных) растений, животных и микроорганизмов, в естественных и искусственных условиях.

Высшим достижением новейшей биотехнологии является **генетическая трансформация**, перенос чужеродных (природных или искусственно созданных) донорских генов в клетки-реципиенты растений, животных и микроорганизмов, получение трансгенных организмов с новыми или усиленными свойствами и признаками.

**Цель биотехнологических исследований** — повышение эффективности производства и поиск биологических систем, с помощью которых можно получить целевой продукт.

Биотехнология дает возможность воспроизводить нужные продукты в неограниченных количествах, применяя новые технологии, позволяющие переносить гены в клетки-продуценты или в целый организм (трансгенные животные и растения), синтезировать пептиды, создавать искусственные вакцины.

### **Основные направления развития биотехнологии**

Расширение сфер применения биотехнологии существенно влияет на повышение уровня жизни человека. Быстрее всего внедрение биотехнологических процессов дает результаты в медицине, но, по мнению многих специалистов, основной экономической эффект будет получен в сельском хозяйстве и химической промышленности. Микрочипы, клеточные культуры, моноклональные антитела и белковая инженерия — это лишь небольшая часть современных биотехнологических приемов, используемых на разных стадиях разработки многих видов продукции. Понимание молекулярных основ биологических процессов дает возможность значительно сократить затраты на разработку и подготовку производства определенного продукта, а также повысить его качество. Например, сельскохозяйственные биотехнологические компании, создающие устойчивые к насекомым сорта растений, могут измерять количество защитного белка в клеточной культуре и не тратить ресурсы на выращивание самих растений; фармакологические компании могут использовать клеточные культуры и микрочипы для проверки безопасности и эффективности препаратов, а также для выявления возможных побочных эффектов на ранних стадиях получения лекарственных средств.

Генетически модифицированные животные, в организмах которых происходят процессы, отражающие физиологию различных человеческих заболеваний, обеспечивают ученых вполне адекватными моделями для проверки действия того или иного вещества на организм. Это также позволяет компаниям выявлять наиболее безопасные и эффективные препараты на более ранних стадиях разработки.

Применение биотехнологических приемов может повысить прибыльность производства и за счет сокращения процесса получения продукта. Так, небольшой фрагмент ДНК, используемый учеными исследовательской лаборатории для установления локализации гена в геноме паразита растения, впоследствии может выступить в качестве компонента диагностического набора, выявляющего наличие данного патогена, а моноклональные антитела, синтезированные для идентификации терапевтического белкового агента, в дальнейшем можно использовать для выделения и очистки искомого соединения.

Все это свидетельствует о важном значении биотехнологии и широких возможностях ее применения в различных отраслях народного хозяйства. Какие же направления являются наиболее приоритетными в этой области? Рассмотрим их.

**1. Повышение безопасности биотехнологического производства для человека и окружающей среды.** Требуется создание таких рабочих систем, которые будут функционировать только в строго контролируемых условиях..

**2. Снижение доли отходов производственной деятельности человека.**

Отходами производства называются его побочные продукты, которые не могут использоваться человеком или другими компонентами биосферы и применение которых нерентабельно или сопряжено с каким-то риском. Такие отходы накапливаются в пределах производственных помещений (территорий) или выбрасываются в окружающую среду.

**3. Снижение энергетических затрат на производство продукта, т. е.**

внедрение энергосберегающих технологий. Принципиальное решение этой проблемы возможно в первую очередь за счет использования возобновляемых источников энергии.

**4. Создание многокомпонентных растительных систем.**

Качество сельскохозяйственной продукции значительно ухудшается при применении минеральных удобрений и ядохимикатов, которые наносят колоссальный ущерб природным экосистемам. Преодолеть негативные последствия химизации сельскохозяйственного производства можно различными способами. Прежде всего необходимо отказаться от монокультур, т. е. от использования ограниченного набора биотипов (сортов, пород, штаммов). Недостатки монокультуры были выявлены еще в конце XIX столетия; они очевидны. Во-первых, в монокультуре возрастают конкурентные отношения между выращиваемыми организмами; в то же время монокультура оказывает лишь одностороннее воздействие на конкурирующие организмы (сорняки). Во-вторых, происходит избирательный вынос элементов минерального питания, что ведет к деградации почв. И наконец, монокультура неустойчива к патогенам и вредителям. Поэтому в течение XX в. она поддерживалась за счет исключительно высокой интенсивности производства. Разумеется, использование монокультур интенсивных сортов (пород, штаммов) упрощает разработку технологии производства продукции. Например, с помощью высоких технологий созданы сорта растений, устойчивые к определенному пестициду, который при возделывании именно данных сортов можно применять в высоких дозах. Однако в этом случае возникает вопрос безопасности такой рабочей системы для человека и окружающей среды. Кроме того, рано или поздно появятся расы патогенов (вредителей), устойчивые к данному пестициду.

**5. Разработка новых препаратов для медицины.**

В настоящее время ведутся активные исследования в области медицины: создаются различные типы новых препаратов — целевые и индивидуальные.

**Задачи биотехнологии**

Первоочередными задачами, стоящими перед биотехнологией, являются исследования в области разработки и получения:

— новых биологически активных веществ и лекарственных препаратов для медицины (интерферонов, инсулина, гормона роста человека, моноклональных антител и т. д.), повышающих качество жизни людей и позволяющих осуществлять раннюю диагностику и лечение тяжелых заболеваний — сердечно-сосудистых, злокачественных, наследственных, инфекционных, в том числе вирусных;

— микробиологических средств защиты растений от болезней и вредителей;

— бактериальных удобрений и регуляторов роста растений, повышения плодородия почв;

— новых, с заданными свойствами, высокопродуктивных и устойчивых к неблагоприятным факторам внешней среды сортов и гибридов сельскохозяйственных растений, полученных методами генетической и клеточной инженерии;

— ценных кормовых добавок и биологически активных веществ (кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов, ветеринарных препаратов и др.), необходимых для повышения продуктивности животноводства;

— новых методов биоинженерии для эффективной профилактики, диагностики и терапии основных болезней сельскохозяйственных животных;

— новых технологий получения хозяйственно ценных продуктов для использования в пищевой, химической, микробиологической и других отраслях промышленности;

— технологий глубокой и эффективной переработки сельскохозяйственных, промышленных и бытовых отходов; использования сточных вод и газоздушных выбросов для получения биогаза и высококачественных удобрений; производства дешевых и эффективных энергоносителей (биотоплива).

К основным разделам современной биотехнологии относятся микробиологический синтез, клеточная инженерия, генетическая инженерия.

**Микробиологическим синтезом** называется синтез самых разнообразных веществ с помощью микроорганизмов. В настоящее время микроорганизмы применяют в различных высоких технологиях: для производства антибиотиков, кормового белка и аминокислот, биологически активных соединений (витаминов, гормонов, ферментов, стимуляторов роста) и т. д. Превращение одних веществ в другие с помощью микроорганизмов называется биоконверсией. Применяя методы **генетической и клеточной инженерии**, современная биотехнология осуществляет широкое конструирование генетически модифицированных организмов (ГМО), в том числе микроорганизмов, растений и животных. В дальнейшем предполагается использование ГМО в природных условиях (в сельском хозяйстве, рыбоводстве, для биологической борьбы с вредителями сельского и лесного хозяйства и т. д.). Однако перед генетической инженерией стоит ряд этических и технологических проблем. При выпуске ГМО в окружающую среду они могут взаимодействовать с разнообразными организмами, сообществами и экосистемами конкретных территорий, в то время как процесс и исход таких взаимодействий не всегда поддается прогнозированию. В частности, существует опасность внедрения «искусственных генов» в геном природных организмов в результате скрещивания ГМО и «диких» форм. Из-за возможных непредсказуемых последствий необходимы исследования, направленные на изучение биобезопасности ГМО.

#### **Биотехнологические основы высоких технологий**

Типы: технологии низкого и высокого уровня, экстенсивные и интенсивные, безотходные, безопасные, ресурсо- и энергосберегающие, трудоемкие, наукоемкие, прорывные. Современные биотехнологии различных направлений и различных уровней неразрывно связаны между собой в единую научно-производственную систему.

**Технологии низкого уровня** — это технологии традиционные, в известной мере устаревшие. К таковым относятся технологии биологической очистки сточных вод, получения биотоплива, некоторые виды микробиологического синтеза. Они характеризуются низкой наукоемкостью, т. е. базируются на использовании рабочих систем, полученных методами традиционной селекции. Такие технологии широко

используются в традиционном сельскохозяйственном производстве, в частности в растениеводстве.

Технологии низкого уровня с минимальными затратами материальных ресурсов, энергии и человеческого труда называют **экстенсивными** (например, повышение плодородия почв путем вывоза на поля навоза и торфа, заправки пожнивных остатков и/или сидератов — специально выращенных бобовых растений)

Более эффективны **интенсивные технологии низкого уровня**, и в первую очередь технологии внедрения новых сортов растений, пород животных и штаммов микроорганизмов. Качество сортов (пород, штаммов) определяется их повышенной продуктивностью при увеличении затрат человеческого труда, сырьевых и энергетических ресурсов, все более активном внедрении средств механизации, автоматизации и химизации

Прорывные, принципиально новые технологии могут быть опасны для человека и окружающей среды, поскольку последствия их применения непредсказуемы. Внедрение прорывных технологий, как правило, сопровождается появлением новых видов продуктов и новых видов отходов. Любой новый пищевой или промышленный продукт должен проходить всестороннюю проверку на аллергенность, канцерогенность и мутагенность, на совместимость с другими продуктами, на безопасность для окружающей среды и т. д.

На основе прорывных технологий **создаются биотехнологии высокого уровня** (или просто высокие биотехнологии). В противоположность технологиям низкого уровня, высокие биотехнологии характеризуются высокой наукоемкостью, т. е. использованием систем, полученных самыми современными методами генетики, микробиологии, цитологии, экологии, молекулярной биологии.

**Высокие биотехнологии также подразделяют на экстенсивные и интенсивные.** **Экстенсивные** высокие биотехнологии характеризуются относительно низкими затратами сырьевых и энергетических ресурсов. К технологиям подобного типа относится большинство микробиологических производств, технологических процессов по подготовке и переработке промышленного сырья, а также часть производства продукции на основе тканево-клеточных культур. Эти технологии частично интенсифицируются за счет компьютеризации производства.

**Интенсивные высокие биотехнологии** (в противоположность экстенсивным) реализуются с привлечением специалистов высочайшей квалификации, с использованием уникального оборудования и самых современных материалов. Эти биотехнологии применяют в медицине, а также для создания организмов с заранее заданными свойствами. Нужно отметить, что интенсификация высоких технологий, в отличие от интенсификации технологий низкого уровня, заключается в повышении качества ресурсного и информационного обеспечения.

Технологии разных уровней неразрывно связаны между собой: с одной стороны, высокие технологии базируются на технологиях низкого уровня, для их осуществления требуется определенный ресурсный, энергетический и информационный фундамент, с другой — достижения высоких технологий используются на низших уровнях биотехнологических производств.

Высокие технологии представляют собой величайшее достижение человеческого разума. Однако по ряду параметров они не только не превосходят технологии низкого уровня, но даже и уступают им. В частности, высокие технологии требуют все больших вложений всех видов ресурсов, они не решают проблемы

получения экологически чистой продукции, а само биотехнологическое производство может представлять угрозу для человека и окружающей среды.

## 8.2. Биотехнологическое получение белков, ферментов, антибиотиков витаминов, интерферона.

Огромная масса продуктов, которые мы потребляем, — биопродукты, полученные с помощью микроорганизмов. Эти продукты (хлеб, сыр, простокваша, вино и т. д.) еще и сегодня производят по технологии, разработанной нашими далекими предками и уходящей корнями в глубь тысячелетий, когда человек не осознавал природу этих процессов. В настоящее время благодаря достижениям современной науки микроорганизмы используются осознанно и интенсивно: создаются новые их виды, превышающие по производительности своих природных аналогов в десятки и сотни раз; разрабатываются симбиотические композиции, состоящие из нескольких видов микроорганизмов; используются высокоорганизованные клетки растений и животных, способных работать в подобранных питательных средах вне организма.

**Все препараты, получаемые микробиологическим синтезом, делятся на 3 группы:**

-биопрепараты, содержащие в товарном продукте в качестве основного активного компонента жизнеспособные микроорганизмы (средства защиты растений, закваски, бактериальные удобрения и т.д.);

-биопрепараты, в состав которых входит инактивированная биомасса (кормовые дрожжи, грибной мицелий т. д.);

-биопрепараты, получаемые на основе очистки продуктов метаболизма микроорганизмов.

Для получения продуктов микробного синтеза в каждом отдельном случае используются модифицированные, специальные технологии, включающие особенности питательных сред, режимов культивирования, выделения и концентрирования продуктов.

Тем не менее все процессы биосинтеза имеют общую схему:

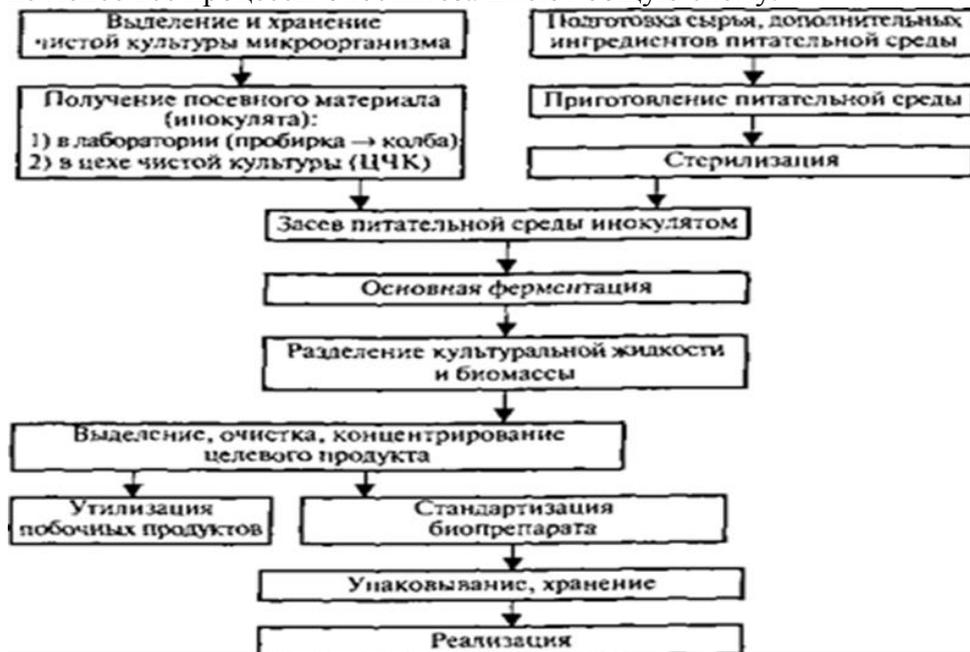


Рисунок №1 - Общая схема процессов биосинтеза

В биотехнологии «производительная сила» — это штамм - продуцент, поэтому именно его свойства определяют характер промышленного производства того или иного продукта. Используются как природные штаммы, выделенные из естественных источников, так и мутантные. В процессе производства полезные свойства штамма должны быть не только сохранены, но и усилены. Недостаточная чистота культуры приводит к снижению скорости роста технологических и экономических показателей производства, ухудшению качества целевого продукта. Только применение чистых культур производственных микроорганизмов гарантирует получение продукции высокого качества.

**Белок животного происхождения** — наиболее дефицитный компонент пищи. Мировая потребность в нем в настоящее время удовлетворяется лишь на 40 %. В связи с этим необходим поиск (в том числе и методами промышленно биотехнологии) ресурсов белка для пищевых целей.

Одним из современных способов получения белковых веществ является микробиологический синтез, поскольку по скорости роста микроорганизмы превосходят сельскохозяйственные культуры в сотни, а животных — в тысяч раз. Кроме того, для микробиологического синтеза не требуются больших земельных площадей, он не зависит от погодных и климатических условий и не загрязняет окружающую среду ядохимикатами.

Микробные белки близки по составу к белкам животного происхождения, и их применение в кормопроизводстве улучшает качество и усвояемость традиционных растительных кормов. Например, 1 т кормовых дрожжей обеспечивает экономию 5 т зерна и увеличивает продуктивность в животноводстве на 15-30 %. Современный средний завод по производству микробного белка мощностью 50 т/год, занимающий площадь 0,2 га, может обеспечить потребность в белке до 10 млн человек. Сельскохозяйственные технологии для таких масштабов производства требуют либо наличия до 16 тыс. га земельных угодий, засеянных пшеницей, либо содержания фермы, производящей 400 поросят в день.

В 1960-е гг. появился термин «белок одноклеточных организмов» (обычно употребляют его сокращенное название аббревиатуру БОО, от single cell protein — SCP), которым обозначают целые неживые высушенные клетки водорослей, дрожжей, бактерий или грибов, используемые в качестве белкового продукта для кормовых и пищевых целей. В отечественной литературе этот белок называют белково-витаминным концентратом или БОО. Все эти названия несколько условны, так как в биомассах, помимо белков, существенную долю занимают другие компоненты — сахара, липиды, нуклеиновые кислоты.

Для синтеза белка микроорганизмы способны использовать различные углеродсодержащие субстраты: углеводы, жидкие углеводороды, газообразные углеводороды; оксидаты углеводородов; углекислый газ, включая смеси с водородом.

Независимо от вида используемого сырья, типовая схема микробиологического производства белка включает получение и подготовку сырья, получение посевного материала, ферментацию, выделение, инактивацию, сгущение микробной биомассы, последующее высушивание и стандартизацию готового продукта.

Промышленное получение белка с использованием микроорганизмов обычно осуществляется в ферментаторах, работающих по принципу *хемостата*. В среду с размножающимся микроорганизмом непрерывно подают водный раствор минеральных солей и органический субстрат, конкретный для осуществляемого процесса. Культуру перемешивают, аэрируют и охлаждают. Причем целесообразно

использовать термотолерантные штаммы, что позволяет вести выращивание при максимально возможной температуре. С одной стороны, это снижает вероятность инфицирования, с другой — уменьшает затраты на охлаждение, так как расходы на эти цели тем ниже, чем больше разность температур между охлаждающим агентом и средой.

Специфика того или иного этапа зависит от особенностей культивируемого микроорганизма. Так, например, выращенные клетки дрожжей отделяют от водной среды сепарированием, а клетки грибов — фильтрацией. Термическую обработку проводят, как правило, при 80—90 °С. Сметанообразную массу после отмирания клеток высушивают в распылительной сушилке, полученные хлопья или порошок гранулируют и упаковывают. Для технолога важно, чтобы ферментатор работал с высокой производительностью, т. е. его массообменная характеристика использовалась максимально. В то же время избыток субстрата нежелателен, так как создаются условия для неполной его утилизации, что соответственно затрудняет очистку сточных вод, и повышается вероятность попадания его в готовый продукт. В качестве сырья могут быть использованы гидролизаты растительного сырья (древесина, лузга подсолнечника, рис, кукурузные кочерыжки, стебли хлопчатника, богасса и т.д.), углеводороды и т. д. В этом аспекте было выделено два направления:

- ориентация на чистые виды сырья, желательны индивидуальные соединения;
- использование различных отходов.

Оба заслуживают пристального внимания, так как в первом случае можно получить продукт постоянного качества, а во втором — создать безотходные технологии, снижая местное загрязнение среды.

Микроорганизмы, используемые в пищевой промышленности, часто входят в состав конечного продукта (хотя доля их там обычно невелика). Особенность белка одноклеточных организмов заключается в том, что он практически целиком состоит из микробной биомассы и в его производстве нередко принимают участие микробы, которые ранее в пище отсутствовали. По этой причине к белку одноклеточных организмов предъявляются повышенные требования (в том числе требование биобезопасности) учреждениями, контролирующими качество пищевых продуктов. Поэтому производство БОО направлено преимущественно на выработку кормов для животных, а не белков, непосредственно идущих в пищу. Корма для животных должны содержать некоторое количество белка (до 15-20 % — в зависимости от их вида и способа содержания). Для их производства можно использовать более широкий круг субстратов, в том числе и органические вещества отходов, что экономически выгодно.

К БОО-продуктам, производимым промышленностью на корм животным, относятся **прутин (Pruteen)** фирмы ICI (биомасса бактерий, выращенных на метаноле), **топрина (Toprina)** фирмы ВР (дрожжи, выращенные на алканах) и грибная масса, получаемая по технологии фирмы **Finnish Pekilo**. При ее производстве в качестве субстрата используют сульфитный щелок — отход бумажной промышленности. Все эти БОО представляют собой слабоокрашенные порошки.

Число БОО-продуктов, используемых в пище, немногочисленно. Это дрожжевой экстракт (гидролизат пекарских дрожжей), применяемый в небольшом количестве как вкусовая и витаминная приправа. Единственный новый официально разрешенный вид белковой пищи микробного происхождения — это **микопротеин**, производство которого налажено в Англии фирмой Ranks Novis Mc Dougal.

Грибной белок микопротеин — это пищевой продукт, состоящий в основном из мицелия гриба. Его производят методом непрерывного выращивания выделенного из почвы штамма *Fusarium graminearum*. Субстратом для него являются глюкоза и другие питательные вещества, а источниками азота — аммиак и аммонийные соли. После завершения стадии ферментации культуру подвергают термообработке (для уменьшения содержания рибонуклеиновой кислоты), а затем уже отделяют мицелий методом вакуумного фильтрования.

#### **Получение ферментных препаратов.**

**Ферменты** — это высокомолекулярные вещества белковой природы, активность которых зависит от состава и последовательности аминокислот. Поэтому промышленное их получение химическим синтезом в больших объемах не всегда возможно и желательно. Как правило, ферменты производят с помощью микроорганизмов или экстрагируют из растительных и животных клеток. Особенно много выпускают протеаз, глюкоамилаз,  $\alpha$ -амилаз и глюкозоизомераз. Микроорганизмы синтезируют большой спектр энзимов, а потому все активнее заменяют растительные и животные ферменты: амилазы грибов и бактерий вытеснили аналогичные ферменты солода и ячменя в пивоварении и хлебопечении; протеазы из аспергилловых грибов — животные и растительные протеазы из *Bacillus licheniformis*, используемые для размягчения мяса, заменили панкреатические протеазы в процессе дубления кожи и производстве моющих средств; реннин из *Mucor* успешно используется в сыроварении вместо сычужного фермента.

Типовые схемы получения ферментов включают:

1. **Получение активных продуцентов (музейной культуры)** и поддержание их в активном состоянии.
2. **Получение посевного материала (ПМ).**
3. **Приготовление питательных сред.**
4. **Производственное культивирование.**
5. **Получение стандартного ферментного препарата и его стабилизация осуществляются путем очистки, концентрирования, высушивания и стандартизации.**

#### *Получение антибиотиков.*

Антибиотики относятся, как уже отмечалось, ко вторичным метаболитам. Продуценты в процессе роста быстро проходят тропофазу (стадию быстрого роста), во время которой синтез антибиотиков незначителен, и переходят в идиофазу (замедления роста) — период синтеза идиолигов.

В настоящее время из культур многих микроорганизмов выделено большое количество антибиотиков (более 3000), но практическое применение нашли не более 150.

Промышленное получение антибиотиков включает следующие этапы.

**1. Подготовка среды.** В каждом конкретном процессе для того или иного штамма создается своя среда.

**2. Подготовка посевного материала.** Чистую культуру клонируют на агаризованной среде в пробирке, после чего переносят в колбы с жидкой питательной средой, богатой необходимыми веществами. Через две генерации при глубинном выращивании на шейкере в течение 48—72 ч (для каждой генерации) делают посев из колбы второй генерации в инокулятор объемом 10—15 дм<sup>3</sup>. Развившуюся культуру пересевают в другой инокулятор объемом от 100 до 500 дм<sup>3</sup>, а затем переносят в ферментатор.

### **3. Ферментация.**

### **4. Отделение биомассы, выделение и очистка антибиотика.**

### **5. Сушка, или обезвоживание, антибиотика.**

### **6. Контроль стерильности, фасование.**

1) посевом антибиотика, предварительно инактивированного, в питательную среду соответствующего состава при ежедневном наблюдении за возможным ростом микроорганизмов;

2) выявлением устойчивых к ним форм микроорганизмов и определением чувствительной к ним микрофлоры.

**7. Фармакологический контроль** предполагает испытание препарата антибиотика на токсичность, специфичность и патогенность.

После тщательного и всестороннего контроля определения максимально переносимой дозы (МПД), т. е. дозы, которая приводит к гибели 50 % подопытных животных (LD50) и к гибели всех животных (LD100), препарат рекомендуют к применению. Далее препарат фасуют, маркируют и отправляют в продажу.

#### **Витамины**

Витамины — это низкомолекулярные органические вещества, способные в очень низких концентрациях оказывать сильное и разнообразное воздействие на живые организмы. Они принимают активное участие в метаболизме человека и высших животных, оказывая влияние на различные физиологические процессы (цикл трикарбоновых кислот, распад и синтез жирных кислот, синтез аминокислот и др.) Природным источником многих витаминов являются растения и микроорганизмы.

В производстве многих витаминов ведущие позиции занимает химический синтез. Кроме того, для получения от дельных витаминов огромное значение имеет микробный синтез, например при производстве кормовых препаратов витаминов. Микробиологическим путем получают некоторые витамины группы В, а также эргостерин и каротин- являющиеся, соответственно, предшественниками витами на D2 и провитамина А.

#### **Получение витамина В12.**

Витамин В12 необходим для роста и развития многих животных и микроорганизмов (рис. 6.12). Способность к его синтезу широко распространена среди прокариотических микроорганизмов. Активно продуцируют витамин В12 *Propionibacterium*, а также *Pseudomonas* и смешанные культуры метанобразующих бактерий.

Микробиологический синтез — единственный способ получения витамина В12 — осуществляют в две стадии на основе пропионовокислых бактерий, способных к самостоятельному синтезу коэнзима В12 (аденозилкобаламина 5,6 ДМБ).

Первую стадию культивирования проводят в течение 80 ч в анаэробных условиях и при слабом перемешивании (до полной утилизации сахара). Полученную биомассу центрифугируют и сгущенную суспензию инкубируют во втором аппарате еще в течение 88 ч, аэрируя культуру воздухом (2 м3/ч). Питательная среда содержит сахара (обычно глюкозу, 1-10 %), добавки солей железа, марганца, магния и кобальта (10-100 мг/л), кукурузный экстракт (3-7 %) и азот в виде (NH4)2S04. Ферментацию проводят при 30 °С и рН 6,5-7,0. На второй стадии происходит образование ДМБ. После завершения ферментации витамин извлекают из клеток нагреванием в течение 10-30 мин при 80-120 °С. При последующей обработке горячей клеточной суспензии цианидом происходит образование CN-кобаламина. Продукт сорбируют, пропуская раствор через активированный уголь и окислы алюминия, а затем элюируют водным

спиртом или хлороформом. После выпаривания растворителя получают кристаллический витамин В12, выход которого достигает 40 мг/л.

Для нужд животноводства витамин В12 получают на основе смешанной ассоциации, состоящей из четырех культур углеводсбраживающих, аммонифицирующих, сульфатовосстанавливающих и собственно метанобразующих бактерий, которые взаимосвязанно расщепляют органический субстрат до СO<sub>2</sub> и СН<sub>4</sub>.

#### Получение витамина В2.

Название витамина В2 — рибофлавин — происходит от сахара рибозы, входящего в состав молекулы витамина в виде многоатомного спирта D- рибита. Он широко распространен в природе и в значительных количествах синтезируется растениями, дрожжами, грибами, бактериями.

Животные, не синтезирующие этот витамин, должны получать его в составе комбикормов, поскольку при его дефиците в организме нарушаются процессы белкового обмена, замедляется рост. Препараты рибофлавина используют в медицине для лечения ряда заболеваний, а в животноводстве — в качестве добавки в корма. Микроорганизмы синтезируют рибофлавин и две его коферментные формы — ФАД и ФМН.

Продуцентами витамина В2 являются бактерии (*Brevibacterium ammoniagenes*, *Micrococcus glutamaticus*), дрожжи (*Candida guilliermondii*, *C. flaveri*), микроскопические (*Ashbya gossypii*, *Eremothecium ashbyii*) и плесневые (*Aspergillus niger*) грибы.

Промышленное получение рибофлавина осуществляют химическим, микробиологическим и комбинированным синтезом. В последнем случае синтезированная микроорганизмами рибоза химически трансформируется в В2.

Для медицинских целей микробиологический рибофлавин получают на основе гриба *Aspergillus*.

#### Получение эргостерина.

Эргостерин является исходным продуктом при производстве витамина D<sub>2</sub> и кормовых препаратов дрожжей, обогащенных этим витамином. Витамин D<sub>2</sub> (эргокальциферол) образуется при облучении ультрафиолетом эргостерина, который в начальных количествах синтезируют бурые водоросли, дрожжи, плесневые грибы. Наиболее активные продуценты эргостерина — *Saccharomyces*, *Rhodotryla*, *Candida*.

В промышленных масштабах эргостерин образуется при культивировании дрожжей и мицелиальных грибов на средах, содержащих избыток сахаров и недостаток азота, при высокой температуре и хорошей аэрации. Более интенсивно эргостерин образуют дрожжи рода *Candida* на средах с углеводородами. Кристаллический препарат витамина D<sub>2</sub> получают при культивировании плесневых грибов (*Penicillium*, *pergillus*) Для получения кормовых препаратов проводят облучение суспензии или сухих дрожжей (*Candida*). Так, тонкий слой суспензии дрожжей облучают ультрафиолетовыми лампами с длиной волны 280-300 нм.

#### Получение интерферонов.

**Интерфероны** служат одним из самых эффективных средств лечения вирусных инфекций, но они видоспецифичны и могут быть получены только из клеток человека. Технология выделения и очистки интерферонов малоэффективна, прежде всего из-за крайне малого выхода конечного продукта. Поэтому получение генно-инженерного продукта является перспективной альтернативой традиционным методам выделения интерферонов.

Ген  $\alpha$ -интерферона получили химико-ферментативным методом. Одной из трудностей, которую пришлось преодолеть, было то, что интерферон синтезируется в виде предшественника с дополнительной (сигнальной) последовательностью аминокислотных остатков. Бактериальные клетки не имеют протеиназ, превращающих предшественники в зрелые белки, поэтому надо было синтезировать ген, кодирующий только зрелый интерферон. Такой ген был получен и введен в клетку *E. coli*. Физико-химические свойства  $\alpha$ -интерферона, выделенного из бактерий, оказались близки к свойствам интерферона, выделенного из крови доноров.

Значительным событием явилась удачная попытка введения генов интерферонов в дрожжевые клетки. Замена бактериальной клетки в качестве реципиента на дрожжевую сыграла огромную роль для всей генно-инженерной техники вообще и для получения интерферонов в частности.

Интерфероны выпускают в качестве лекарственных препаратов в виде капель в нос, мазей или растворов для инъекций. В настоящее время как у нас в стране, и за рубежом выпускают коммерческие препараты — челоовеческий лейкоцитарный, лимфобластный (Велферон, Iferon) и фибробластный (Ферон), а также интерфероны, полученные генно-инженерными методами: рекомбинантные  $\alpha$ -интерферон (Роферон, Реальдерон и др.),  $\beta$ -интерферон и  $\gamma$ -интерферон (Гаммаферон).

#### *Вопросы для самоконтроля*

1. Назовите направления биотехнологии и получаемые с ее помощью продукты.
2. Перечислите технологии, используемые в биотехнологии.
3. Перечислите задачи, стоящие перед биотехнологией.
4. На какие группы делятся препараты, получаемые микробиологическим синтезом.
5. Перечислите продуцентов белков, витаминов, интерферонов, ферментов.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

а) основная литература (библиотека СГАУ)

17. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс] : учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. - Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с.: ил. - [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>]. <http://znaniium.com/bookread2.php?book=508936> ISBN 978-985-06-2237-2. дата обращения – 20.06.2017 г.
18. Вирусология и биотехнология / Белоусова Р.В., Ярыгина Е.И., Третьякова И.В., Калмыкова М.С. Издательство "Лань", 2016г.- 220 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <https://e.lanbook.com>] <https://e.lanbook.com/reader/book/88026/#1> ISBN: 978-5-8114-2266-1. дата обращения – 20.06.2017 г.
19. Луканин А. В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств/Луканин А.В. - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. - 312 с.: 60x90 1/16. - (Высшее образование) [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=527386> ISBN 978-5-16-011479-8. дата обращения – 20.06.2017г.

20. Молчанов Г. И. Фармацевтические технологии: современные электрофизические биотехнологии в фармации: Уч. пос. / Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Л.М. Кубалова. - 2-е изд. - М.: Альфа-М: ИНФРА-М, 2014. - 336 с.: ил.; 60x90 1/16. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znanium.com>] <http://znanium.com/bookread2.php?book=314485> ISBN 978-5-98281-260-5

б) дополнительная литература

4. Белоусова, Р. В. Ветеринарная вирусология : учебник / Р. В. Белоусова, Э. А. Преображенская, И. В. и Третьякова ; Международная ассоциация "Агрообразование". - М. : КолосС, 2007. - 424 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 978-5-9532-0416-3

5. Инфекционные болезни животных : учебник / А.А. Сидорчук, Н.А. Масимов, В.Л. Крупальник [и др.] ; под ред. А.А. Сидорчука. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : ИНФРА- М, 2017. — 954 с. + Доп. материалы [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znanium.com>]. <http://znanium.com/bookread2.php?book=641846> (Высшее образование: Специалитет). дата обращения – 20.06.2016 г.

6. Вирусология и биотехнология: учебное пособие / Фирсов Г.М., Акимова С.А., - 2-е изд., дополненное - Волгоград: Волгоградский ГАУ, 2015. - 232 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znanium.com>] <http://znanium.com/bookread2.php?book=615175>. дата обращения – 20.06.2016 г.

## Лекция № 9

### Биотехнологические основы культивирования микроорганизмов

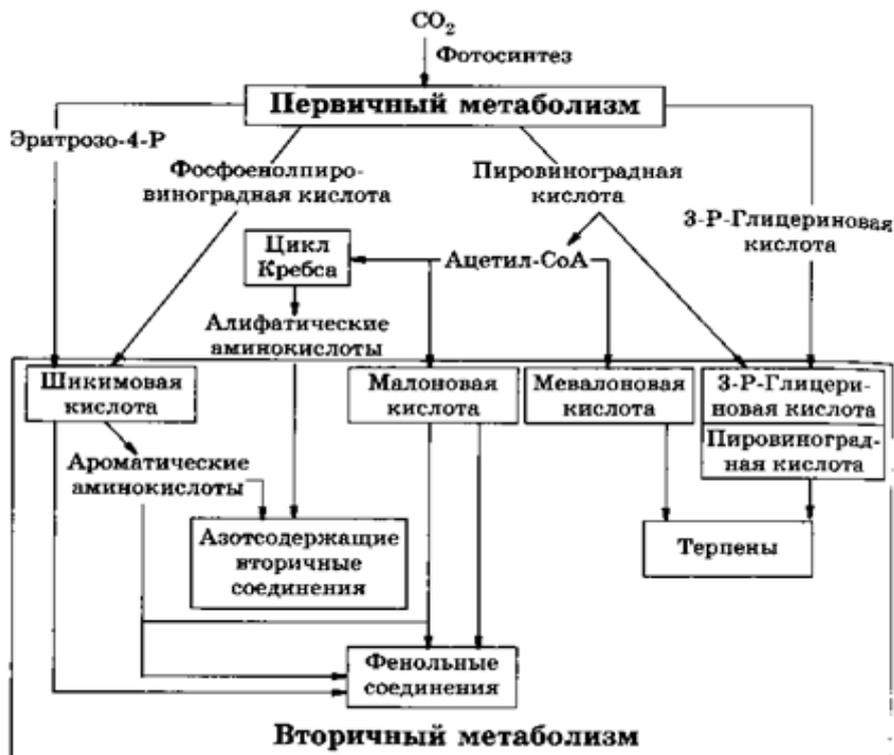
#### 9.1. Первичные и вторичные метаболиты микроорганизмов.

##### Биотехнологические основы культивирования микроорганизмов.

Культивирование микроорганизмов и клеток различных тканей связано с особенностями ассимиляции, диссимиляции, роста и размножения представителей трех царств живой природы: животных, растений и микроорганизмов. Культуры представителей указанных семейств различны по форме и содержанию. При решении ряда вопросов биотехнологии ветеринарных препаратов обычно имеют дело с культурами микроорганизмов (бактерий, грибов, вирусов), а также с культурами тканевых клеток, полученных из органов или тканей животных или человека.

Все живые организмы на нашей планете образуют разные соединения первичного метаболизма, такие, как углеводы, белки, липиды, витамины и другие вещества, необходимые для роста и развития. Их содержание и состав зависят от генетических характеристик объектов, стадии онтогенеза и условий произрастания.

Помимо **первичных метаболитов**, у некоторых организмов (преимущественно растений) осуществляется синтез называемых **вторичных метаболитов**, к которым относятся алкалоиды, терпеноиды, стероиды, фенольные соединения, цианогенные гликозиды и др. Эти низкомолекулярные вещества во многих случаях характерны для отдельных видов растений, а их синтез в значительно меньшей степени видоспецифичен, чем синтез первичных метаболитов.



#### Основные пути синтеза вторичных соединений и их связь с первичным обменом веществ (по С.С. Медведеву, 2004)

Промышленный биотехнологический процесс, в котором производства коммерческих продуктов используют клеточные системы или микроорганизмы, обычно включает три ключевые стадии:

- подготовительную;
- биотехнологическую;
- получения готовой продукции (очистка целевого продукта от компонентов культуральной среды или от клеточной массы).

### **Технологическое оборудование промышленного назначения**

Первая наиболее полноценная среда была приготовлена учеником Л. Пастера Ролэном в 1869 году для грибов рода *Aspergillus*.

Хотя в распоряжении Л. Пастера не было метода чистых культур, но ему с учениками удалось, пользуясь элективными средами, доказать потребность микроорганизмов в главных и второстепенных компонентах среды и в источниках энергии.

В 1870 году Р. Кох ввел в практическую микробиологию метод чистых культур, гарантировавших получение на предложенных им плотных питательных средах чистых культур только определенных видов бактерий.

На первых этапах микробиологических исследований культивирование микроорганизмов осуществляли в пробирках или колбах путем выращивания их на поверхности плотных или жидких сред. Для более объемного промышленного культивирования микроорганизмов с целью получения из них различных биопрепаратов стали переходить на использование стеклянной посуды большой емкости (матрасы, бутыли). Причем, в такой посуде выращивали микроорганизмы главным образом на плотных агаровых средах. **ГЛУБИННЫЙ СПОСОБ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Новым этапом в культивировании микроорганизмов явился примененный в 1933 году Клейвером и Пергиным способ встряхивания колб с жидкой средой на качалках с принудительной подачей стерильного воздуха. На этой основе был разработан так называемый глубинный метод выращивания микроорганизмов. Метод глубинного выращивания микроорганизмов был предложен вначале для культур аэробных грибов, в дальнейшем он стал использоваться для выращивания других микроорганизмов с целью производства антибиотиков, витаминов, ферментов, вакцин, антигенов и других биопрепаратов. Все возрастающее значение получения культур микроорганизмов в больших количествах побудило интерес к созданию промышленных установок большой емкости с принудительной аэрацией культуры микробов и автоматической регуляцией всех технологических процессов. Такие установки или реакторы назывались еще ферментерами, так как в них выращивались микроорганизмы с использованием их ферментативных свойств при получении антибиотиков, ферментов и других веществ микробного синтеза.

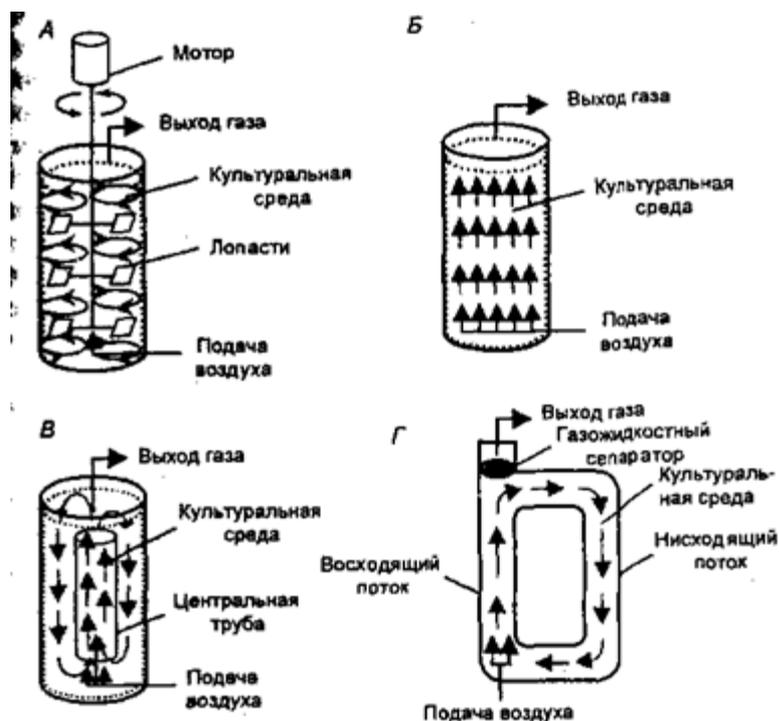
С применением **интенсивной аэрации скорость** размножения микроорганизмов бывает еще выше. Так, на синтетических средах накопление микроорганизмов бактерий кишечной группы за 14 часов культивирования с применением принудительной аэрации составляет 25 млрд/мл, на мясных средах 50—60 млрд/мл, в то время как при культивировании этих же микробов и на тех же средах без аэрации, то есть в стационарных (состоянии покоя) условиях, количество микробов не превышает 1—2 млрд/мл.

Для выращивания микроорганизмов в промышленных условиях в настоящее время применяют реакторы с барбатерами и металлическими мешалками для диспергирования воздуха. Размешиваний питательной среды и ее аэрацию следует рассматривать как единый процесс, так как равномерно аэрировать всю

культуральную жидкость в больших емкостях, не прибегая к размешиванию, невозможно.

Глубинный способ культивирования в биопромышленности является основным при производстве большинства биопрепаратов. Он осуществляется, как правило, в реакторах (ферментерах) большой емкости.

Их подразделяют на две группы: по конструкции и по принципу перемешивания культуральной жидкости



Упрощенные схемы биореакторов различных типов (по Б. Глику и Дж. Пастернаку, 2002):

А — реактор с механическим перемешиванием; Б — барботажная колонна; В — эрлифтный реактор с внутренней циркуляцией; Г — лифтный реактор с внешней циркуляцией. Стрелки указывают направление потока культуральной среды

В биореакторах, относящихся к **первой группе**, перемешивание клеток происходит путем аэрирования воздухом. Это **барботажный** тип биореактора, при котором процесс перемешивания суспензии осуществляется поднимающимися пузырьками воздуха. В случае барботажных биореакторов обычно получают хорошие ростовые характеристики для большого числа клеточных культур. Однако сложность поддержания суспензии в гомогенном состоянии при высоких концентрациях биомассы клеток сужает сферу их применения.

Несколько больших значений максимальной концентрации клеточной биомассы можно достичь при применении **эрлифтных** биореакторов, в которых создаются направленные циркуляционные потоки. В эрлифтных биореакторах перемешивание суспензии осуществляется за счет применения специальной конструкции, создающей градиент плотности (как правило, это конструкция с внутренним цилиндром).

**Вторая группа биореакторов** представляет собой аппараты с применением механических перемешивающих устройств. Биореакторы этого типа позволяют изучать растительные клеточные популяции в очень широком диапазоне

концентраций биомассы клеток. Вместе с тем стрессовое воздействие перемешивающего устройства на клеточную популяцию часто ограничивает их применение.

### **ТЕХНОЛОГИЯ ГЛУБИННОГО СПОСОБА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Технологический процесс глубинного выращивания микроорганизмов в реакторах складывается из следующих этапов:

- 1) подготовка реактора к посеву;
- 2) отбор штаммов микроорганизмов и работа с ними;
- 3) приготовление матровой культуры для засева питательной среды;
- 4) посев матровой культуры в реактор с питательной средой для получения производственной раскладки микроорганизмов;
- 5) выращивание микроорганизмов и контроль за ходом процесса культивирования.

**Периодическое культивирование** — это аналог выращивания клеточных культур в колбах на качалке. Периодическую культуру можно рассматривать как замкнутую систему, которая в своем развитии проходит четыре фазы — *начальную, экспоненциальную, стационарную и отмирания*. Условия существования культуры во всех этих фазах различны.

#### **Преимущества периодических систем:**

- малая стоимость аппарата и системы управления;
- гибкость, т. е. возможность наработки в одном биореакторе разных продуктов;
- время культивирования можно произвольно менять;
- процесс менее подвержен инфицированию, мутациям ток вследствие отсутствия протока и притока из-за относительно малого времени ферментации;
- процесс удобен для получения малых количеств продукта;
- условия культивирования можно поддерживать в оптимуме как в фазе роста биомассы, так и в фазе биосинтеза продукта, причем оптимальные условия для биомассы и продукта могут быть различны;
- процесс удобен для реализации биосинтеза вторичных метаболитов.

#### **Недостатки:**

- необходимость приготовления посевного материала;
- велико непродуктивное время ферментации;
- в связи с частой стерилизацией быстрее изнашиваются измерительные приборы, особенно датчики величины рН.
- производительность по биомассе и продукту часто ниже, чем при непрерывном процессе

**Проточное (непрерывное) культивирование** характеризуется постоянным добавлением в биореактор свежей питательной среды и постоянным отбором либо суспензии (*открытое проточное культивирование*), либо отработанной среды (*закрытое проточное культивирование*).

В практике микробиологических исследований широко применяют две разновидности открытого проточного культивирования: **хемостатный и турбидостатный методы**.

**Хемостатный метод культивирования** клеток базируется на использовании биореактора, в который с постоянной скоростью подается питательная среда и

одновременно же скоростью (например, слив по уровню) отбирается клеточная суспензия. При этом объем выращиваемой суспензии остается постоянным.

Проведение метода непрерывного культивирования микроорганизмов в условиях максимального выхода продукции может быть достигнуто с применением математического эксперимента (МПЭ). Но для этих целей необходимо использовать ЭВМ.

**Турбидостатный** метод предусматривает измерение концентрации клеточной биомассы в биореакторе и ее автоматическое поддержание на постоянном уровне путем изменения скорости протока. Работа турбидостата основана на поддержании постоянной плотности суспензии, или постоянной мутности. Датчик мутности регулирует через управляющую систему поступление питательного раствора. В сосуде для культивирования все питательные вещества содержатся в избытке, и скорость роста культуры приближается к максимальной.

Турбидостат используют при скоростях протока, близких к максимальной удельной скорости роста, тогда как хемостат иногда становится неустойчивым и может произойти полное вымывание культуры из биореактора. Работа с турбидостатами технически сложнее, чем с хемостатами.

## **ПОВЕРХНОСТНЫЙ МЕТОД КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ**

Микроорганизмы поистине являются вездесущими, и они по своей способности заселять объекты внешней среды считаются в экологическом отношении самыми распространенными организмами. На поверхностях различных материалов они образуют скопления, именуемые колониями. Способ выращивания микроорганизмов на поверхности плотных питательных сред называется поверхностным культивированием. Выращивание микробов на плотных питательных средах в бактериологических лабораториях различного направления является одним из основных методов изучения свойств микроорганизмов.

Дело в том, что на плотных питательных средах различные микроорганизмы образуют различные по величине, форме и другим признакам колонии. Колонии представляют собой скопления особей одного вида микроорганизмов, образующихся в результате размножения из одной или нескольких клеток. Колонии бывают плоскими, выпуклыми, куполообразными, вдавленными. Поверхность их бывает гладкой (S-форма, от английского слова smooth — гладкий), шероховатой (R-формой, от английского слова rough — шероховатый). Между S- и R-формами колоний имеются и переходные: O- и M-формы (промежуточные и слизистые). Края колоний могут быть ровными, зубчатыми, волокнистыми, бахромчатыми. По величине колонии подразделяются на крупные (4—5 мм в диаметре), средние (2—4 мм), мелкие (1—2 мм) и карликовые (меньше 1 мм). Колонии отличаются и по консистенции, плотности, окраске. Они бывают прозрачными и непрозрачными, окрашенными и бесцветными, влажными, сухими и слизистыми.

Метод поверхностного культивирования микроорганизмов широко используются в лабораториях и биологической промышленности для следующих целей:

- выделение чистых культур из объектов внешней среды;
- определение контаминации производственных штаммов микроорганизмов, из которых готовят биопрепараты;

— приготовление в лабораторных и промышленных условиях некоторых вакцин и большинства антигенов.

## **9.2. Технологические основы выделения и концентрирования биопрепаратов и продуктов микробного синтеза**

Обычно биотехнологическая стадия завершается выходом одного жидкостного и одного газового потоков, иногда — только одного жидкостного или переработанного твердого продукта, например при созревании сыра или биокомпостировании отходов.

Получение готовой продукции — заключительная стадия технологического процесса биотехнологического производства. Чаще всего целевой продукт находится либо в самой биомассе, либо в жидкости. В зависимости от свойств биомассы и жидкости, для их разделения могут быть использованы различные методы:

— **отстаивание** — разделение под действием гравитационных сил (обычно при очистке сточных вод);

— **фильтрация** — пропускание суспензии через фильтрующий материал, на котором задерживаются частицы твердой фазы — биомасса. Такой способ применяют в производстве антибиотиков, особенно в тех случаях, когда микроорганизм-продуцент имеет мицелиальный характер;

— **сепарация, центрифугирование** — разделение под действием центробежных сил. Наиболее часто используют для отделения дрожжей или бактерий в производстве кормовой биомассы;

— **микрофильтрация, ультрафильтрация** — пропускание суспензии через мембраны с весьма малым размером пор, обеспечивающее удержание клеток микроорганизмов на мембране и получение чистого раствора. При ультрафильтрации отделяются не только клетки, но и крупные молекулы растворенных веществ;

— **коагуляция** — добавление в суспензию реагентов, способствующих образованию и осаждению более крупных клеточных частиц и отделению их от жидкости методом отстаивания;

— **флотация** — захват микроорганизмов пузырьками пены и выделение их из пенной фракции.

Целевые продукты биосинтеза могут быть внеклеточными и внутриклеточными. Для внутриклеточных продуктов сначала необходимо разрушить оболочку клеток. Это можно осуществить дезинтеграцией клеток, разрушив клеточную оболочку физическими методами (путем замораживания и продавливания, воздействием ультразвуком, методом декомпрессии — резкого сброса давления) или химическими и биотехнологическими методами. Используют также **гидролиз** (разрушение клеточных оболочек под действием химических реагентов и температуры), **ферментолиз** (разрушение клеточных оболочек под действием ферментов при повышенной температуре) или **автолиз** (разновидность ферментолиза, когда используют собственные ферменты клетки).

После проведения какой-либо из вышеперечисленных операций дальнейшее выделение целевого продукта осуществляют методами, общими для внеклеточных и внутриклеточных продуктов. Основными из них являются:

— **экстракция** — переход целевого продукта из водной фазы в не смешивающуюся с водой органическую жидкость (экстрагент). Наиболее известно выделение жироподобных веществ жидкими углеводородами (типа бензина). Применяют и многие другие виды экстрагентов (хлороформ, эфир, :ацетат). Иногда экстракцию осуществляют непосредственно из биомассы микроорганизмов;

— **осаждение** — выделение целевого продукта путем добавления к жидкости реагента, взаимодействующего с растворенным продуктом и переводящего его в твердую фазу;

— **адсорбция** — перевод растворенного в жидкости продукта в твердую фазу путем его сорбции на специальных твердых носителях (сорбентах);

— **ионный обмен** — в твердую фазу переходят ионы (катионы или анионы), а не молекула целевого продукта или смеси;

— **отгонка, ректификация** — выделение растворенных культуральной жидкости легкокипящих продуктов, например этилового спирта;

— **ультрафильтрация, нанофильтрация и обратный осмос** — выделение высокомолекулярных соединений (белков, пептидов, полинуклеотидов). Обратный осмос и нанофильтрация позволяют отделять даже небольшие по размерам молекулы;

— **центрифугирование, ультрацентрифугирование** — выделение вирусов, клеточных органелл, высокомолекулярных соединений.

**Очистка** необходима для получения биопродуктов высокой степени чистоты. Основной целью является удаление примесей, что достигается с помощью экстракции, адсорбции, ионного обмена, ультрафильтрации, обратного осмоса, ректификации и ферментализации, которые были рассмотрены ранее. Кроме перечисленных, используют и другие процессы, такие, как:

— **хроматография** — процесс, напоминающий адсорбцию. На твердом сорбенте собираются растворенные вещества, часто близкие по структуре (например, смеси белков, сахаров, антибиотиков). При адсорбции они сорбируются вместе, а вот при хроматографии они выделяются из сорбента как бы по очереди, что позволяет отделить их друг от друга;

— **диализ** — процесс, в котором через полупроницаемую пленку могут проходить низкомолекулярные вещества, а высокомолекулярные остаются. Путем диализа осуществляют очистку вакцин и ферментов от солей и низкомолекулярных растворимых примесей;

— **кристаллизация** — процесс, основанный на различной растворимости веществ при разных температурах. Медленное охлаждение позволяет формировать кристаллы из растворов целевых продуктов, причем чистота их обычно очень высока. Таким образом, например, получают кристаллы пенициллина. Можно даже получить еще более чистый продукт, если кристаллы растворить в воде или растворителе, а потом снова кристаллизовать (т. е. провести процесс перекристаллизации).

**Концентрирование продукта** повышает его выход. Известно, что после биотехнологической стадии содержание продукта обычно составляет примерно 0,1-1 %, после стадии отделения биомассы — 0,1-2 %, после стадии выделения — 1-10 %, после стадии очистки — 50-80 % и, наконец, после стадии концентрирования — 90-100 %. На стадии концентрирования применяют такие процессы, как выпаривание, сушка, осаждение, кристаллизация, фильтрация, ультрафильтрация, гиперфильтрация или нанофильтрация, обеспечивающие как бы отжим растворителя из раствора.

**Получение готовой формы** продукта завершает биотехнологическое производство. Продукт приобретает товарную форму за счет проведения процессов гранулирования (формирование гранул из порошка или прямо из раствора), дражирования, таблетирования (формирование драже, таблеток), розлива или фасовки, ампулирования (затаривания в ампулы).

2. Блинов, В.А. Общая биотехнология. Курс лекций, Ч. 1. / В.А. Блинов. – Саратов, 2003. – 161 с. – ISBN 5-70

*Вопросы для самоконтроля*

1. Назовите первичные и вторичные метаболиты микроорганизмов.
2. Перечислите достоинства и недостатки глубинного и поверхностного методов культивирования. Практическое использование методов.
3. Какие методы разделения биомассы и жидкости Вы знаете?
4. Какими способами производится выделение целевого продукта.
5. Какие способы используются для концентрации целевого продукта.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

а) основная литература (библиотека СГАУ)

21. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс] : учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. - Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с.: ил. - [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>]. <http://znaniium.com/bookread2.php?book=508936> ISBN 978-985-06-2237-2. дата обращения – 20.06.2017 г.
22. Вирусология и биотехнология / Белоусова Р.В., Ярыгина Е.И., Третьякова И.В., Калмыкова М.С. Издательство "Лань", 2016г.- 220 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <https://e.lanbook.com>] <https://e.lanbook.com/reader/book/88026/#1> ISBN: 978-5-8114-2266-1. дата обращения – 20.06.2017 г.
23. Луканин А. В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств/Луканин А.В. - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. - 312 с.: 60х90 1/16. - (Высшее образование) [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=527386> ISBN 978-5-16-011479-8. дата обращения – 20.06.2017г.
24. Молчанов Г. И. Фармацевтические технологии: современные электрофизические биотехнологии в фармации: Уч. пос. / Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Л.М. Кубалова. - 2-е изд. - М.: Альфа-М: ИНФРА-М, 2014. - 336 с.: ил.; 60х90 1/16. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=314485> ISBN 978-5-98281-260-5

б) дополнительная литература

7. Белоусова, Р. В. Ветеринарная вирусология : учебник / Р. В. Белоусова, Э. А. Преображенская, И. В.и Третьякова ; Международная ассоциация "Агрообразование". - М. : КолосС, 2007. - 424 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 978-5-9532-0416-3
8. Инфекционные болезни животных : учебник / А.А. Сидорчук, Н.А. Масимов, В.Л. Крупальник [и др.] ; под ред. А.А. Сидорчука. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : ИНФРА- М, 2017. — 954 с. + Доп. материалы [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>]. <http://znaniium.com/bookread2.php?book=641846> (Высшее образование: Специалитет). дата обращения – 20.06.2016 г.
9. Вирусология и биотехнология: учебное пособие / Фирсов Г.М., Акимова С.А., - 2-е изд., дополненное - Волгоград: Волгоградский ГАУ, 2015. - 232 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=615175>. дата обращения – 20.06.2016 г.

## Лекция №10

### Биотехнологические основы приготовления гипериммунных сывороток и диагностических препаратов

#### 10.1 Основы приготовления гипериммунных сывороток

Гипериммунные или специфические сыворотки, предназначенные для решения указанных задач, представляют собой сыворотки крови животных, систематически иммунизированных бактериальными и вирусными антигенами. Гипериммунные сыворотки содержат антитела, обладающие строго специфическими действиями на бактериальные токсины, патогенные бактерии или вирусы, против которых иммунизировали животных.

Технология производства гипериммунных сывороток объединяет ряд подразделений, главным из которых является сывороточный цех. Структура цеха должна включать в себя карантинное отделение, иммунизационные клиники, антигенные лаборатории и отделения получения, концентрации и очистки сывороток.

Производственные помещения и оборудование структурных подразделений сывороточного цеха зависят от количества ассортимента препаратов. По характеру технологического процесса при производстве гипериммунных сывороток требуется создание стерильных условий работы. Для этого боксовые помещения должны обеспечиваться притоком стерильного воздуха, рабочие места (столы, стулья), стены, потолок и пол подвергаться влажной уборке с применением дезинфицирующих веществ и УФЛ-облучения. Это обеспечивает получение высококачественных препаратов. Остальные рабочие помещения и иммунизационные клиники должны быть оборудованы приточно-вытяжной вентиляцией.

Для приготовления иммунных сывороток чаще всего используют лошадей, крупный рогатый скот (волы), при производстве сыворотки против рожи используют свиней. С целью приготовления диагностических иммунных сывороток чаще всего используют кроликов, птиц, реже овец, коз.

**На получение высокоактивных лечебно-профилактических и диагностических сывороток влияют:** качество применяемых антигенов, в частности их чистота, объем и концентрация; неспецифические раздражители и адьюванты; индивидуальные особенности животных-продуцентов, в частности их способность к иммунобиологической перестройке при создании у них грундиммунитета, для чего необходим тщательный отбор животных-продуцентов; метод и схемы гипериммунизации; содержание и кормление животных в период их подготовки к эксплуатации.

*Первый этап - отбор животных-продуцентов, грундирование*

Животных, применяемых для получения сывороток, завозят из стационарно благополучных по заразным заболеваниям районов. При этом они должны быть клинически здоровыми, средней и выше средней упитанности, свободными от кожных паразитов. Всех завезенных животных выдерживают в карантине 45 суток. За это время их всесторонне обследуют с ежедневным (утром и вечером) двукратным измерением температуры тела и проверяют на пораженность гельминтами и при необходимости дегельминтизируют. Лошадей исследуют на сап, трихомоноз, бруцеллез, туберкулез, пироплазмидозы и инфекционную анемию; крупный рогатый скот — на туберкулез, бруцеллез, лептоспироз; свиней — на туберкулез, бруцеллез;

овец — на бруцеллез, туберкулез, паратуберкулез и другие инфекционные заболевания согласно требованиям нормативно-технической документации.

При отборе животных-продуцентов надо учитывать их физиологические и иммунобиологические показатели.

При использовании лошадей для получения некоторых гипериммунных сывороток, нормальной сыворотки, сыворотки жеребых кобыл (СЖК) и желудочного сока чаще используют помеси донской и казахской пород в возрасте от 3 до 12 лет. От одного донора массой 450—500 кг за год в среднем получают около 360 л желудочного сока и 4000 овцедоз СЖК.

#### *Гипериммунизация животных*

Вторым этапом получения специфических сывороток является проведение гипериммунизации животных. Гипериммунизация — это метод парентерального введения животным нарастающих доз соответствующих антигенов с целью получения наивысшей ответной иммунологической реакции организма, а следовательно, и максимального увеличения в крови животных специфических антител, которое должно обеспечивать лечебный, профилактический и диагностический эффект препаратов.

Для гипериммунизации, как было показано выше, чаще всего используют лошадей. Цикл гипериммунизации обычно длительный и составляет 1—2 и более месяцев. Впрочем, в каждом случае цикл иммунизации во многом зависит от вида гипериммунной сыворотки.

По окончании гипериммунизации, когда в сыворотке крови животного установлен максимальный титр специфических антител, у него берут кровь обычно через 7—10 суток после последней инъекции антигена.

#### *Приготовление сывороточных и глобулиновых препаратов*

Сыворотку получают методом цитрирования крови с последующим сепарированием (рис. 4.13) и дефибрированием плазмы. Сыворотку крови консервируют 0,5%-м раствором фенола и отстаивают в специальных емкостях в течение двух месяцев. Отстоявшуюся сыворотку фильтруют вначале через пластины Ф, а затем через стерилизующие пластины СФ. В последующем сыворотку расфасовывают во флаконы емкостью по 100 мл. Флаконы закрывают пробками и для герметичности их обкатывают алюминиевыми колпачками. На флаконы наносят этикетку и часть продукции сдают на контроль. Контроль сывороток проводят по общепринятым методикам.

В производственных условиях очистку и концентрацию сывороток проводят чаще всего комбинированным способом, включающим стадии ферментативного гидролиза, прогрева ферментированных сывороток в кислой среде, солевого фракционирования и дополнительной очистки от неактивных белков и использования органических растворителей, сорбентов или дополнительного выдерживания сывороток при пониженных температурах.

## **10.2 Биотехнологические принципы приготовления диагностических препаратов**

Одним из важнейших звеньев борьбы с инфекционными и паразитарными заболеваниями сельскохозяйственных животных является специфическая диагностика. От правильности ее проведения зависит выбор необходимых мер борьбы с конкретной инфекцией. Проведение диагностических исследований инфекционных

заболеваний возможно лишь при наличии в лабораториях или у практических ветеринарных врачей диагностикумов, производство которых осуществляется на предприятиях биологической промышленности.

Прежде чем рассматривать основные технологические принципы приготовления диагностических препаратов, следует отметить, что таких препаратов,готавливаемых биологической промышленностью и применяемых в ветеринарной медицине, много. Все они подразделяются на четыре группы: диагностические иммунные (специфические) сыворотки; антигены-диагностикумы; бактериофаги; аллергены.

Каждая из этих групп в свою очередь подразделяется на отдельные подгруппы, типы в зависимости от технологии их получения, технологии, цели и практического применения.

Основным требованием к получению диагностических препаратов является тщательная подготовка и селекция производственных штаммов микроорганизмов с отбором колоний гладкой формы (кроме возбудителя сибирской язвы) и преобладанием необходимого антигена.

*Диагностические сыворотки.* К диагностическим специфическим сывороткам, применяемым для обнаружения в тех или иных материалах антигенов или для определения вида и даже типа микроба или вируса, относятся агглютинирующие, преципитирующие и лизирующие (комплемент-связывающие). Такая классификация основана на функциональной способности специфических гамма-глобулинов склеивать (агглютинировать), осаждать (преципитировать), растворять (лизировать) соответствующие антигены.

#### **Агглютинирующие сыворотки и технология их приготовления**

Агглютинирующие сыворотки готовят путем гипериммунизации животных различными корпускулярными антигенами, введением их парентеральным путем. В качестве антигенов используют живые или убитые различными способами культуры соответствующих микробов. В связи с непостоянным содержанием антигенных компонентов у одного и того же вида бактерий желателно животных иммунизировать несколькими штаммами (2—3) этого вида микроба. Для получения поливалентных агглютинирующих сывороток прибегают к одновременному введению смеси антигенов из нескольких типов бактерий одного и того же вида. В процессе работы необходимо следить за однородностью популяции штамма, используемого для иммунизации. Лучшим способом сохранения агглютиногенных свойств является лиофильное высушивание.

В большинстве случаев для получения полноценных агглютинирующих сывороток используют в качестве антигенов культуры микробов в S-форме. Реже требуются O- или R-варианты. Для получения сывороток лучше использовать в качестве антигенов живые культуры бактерий или вирусов, в ряде случаев для иммунизации животных использовать вновь пересеянные (суточные) культуры микробов. В ряде случаев введение живых культур может вызывать тяжелую реакцию организма иммунизируемых животных и даже их гибель. Поэтому, где это допустимо, животных иммунизируют убитыми взвесями микроорганизмов.

Для получения диагностических агглютинирующих сывороток чаще всего используют кроликов. Иммунизацию в большинстве случаев проводят внутривенным способом в нарастающих дозах и интервалами в 4 суток. Обычно производят 3—4 инъекции антигена.

## **Преципитирующие диагностические сыворотки и технология их приготовления**

Преципитирующие сыворотки предпочтительно готовят для диагностики сибирской язвы. Первыми для этих целей получили преципитирующую сыворотку Асколи и Валенти в 1910 году. Они иммунизировали внутривенным способом лошадей слабовирулентной культурой возбудителя сибирской язвы. В последующие годы методы получения качественных сывороток совершенствовались. В настоящее время в нашей стране преципитирующую сибиреязвенную сыворотку получают путем внутривенной иммунизации лошадей слабовирулентными штаммами 916-1, Ш-15, 94 и штаммом из матрикса второй вакцины Ценковского. Указанные штаммы выращиваются на гороховом агаре в течение 18—20 часов при 36—37° С. Культуры соответствующих штаммов смывают с поверхности горохового агара физиологическим раствором, тщательно шуттелируют, фильтруют и стандартизируют. Лошадей гипериммунизируют поочередным введением каждого из указанных штаммов внутривенно. Всего делают 16—17 инъекций антигена, увеличивая дозу с 5 до 70 мл. В период гипериммунизации делают контрольные исследования на накопление антител. По окончании гипериммунизации кровь от лошадей берут через 9—16 суток после последнего введения антигена из расчета 800 мл на 50 кг массы животного. Из крови получают сыворотку методом ее цитрирования с последующим сепарированием и дефибринизацией плазмы. Сыворотку консервируют 0,5%-м раствором фенола. Затем сыворотку выдерживают в специальных отстойниках в течение двух месяцев, после чего подвергают ее стерилизующей фильтрации, разливают во флаконы емкостью 50—100 см<sup>3</sup>, закрывают их резиновыми пробками и обкатывают алюминиевыми колпачками. После этого препарат подвергается биологическому контролю.

### **Антитоксические диагностические сыворотки**

Чаще всего антитоксические сыворотки готовят с целью диагностики клостридиозов: злокачественного отека, инфекционной энтеротоксемии, ботулизма и других заболеваний, возбудители которых образуют сильные экзотоксины и имеют множество серологических типов. В качестве антигенов при получении таких сывороток используют анатоксины.

Технологическим примером получения таких сывороток является изготовление антитоксических сывороток *Cl. perfringens* типов А, В, С, D, Е и F.

В качестве продуцентов таких диагностических сывороток чаще используют валухов тонкорунных пород в возрасте двух лет. Антигенами являются очищенные и концентрированные анатоксины, полученные с помощью соответствующих типов *Cl. perfringens*. Для каждого типа указанного микроба используют отдельных продуцентов, которых содержат в отдельных боксах. Антигены овцам вводят подкожно в возрастающих дозах с принятым интервалом 4—6 суток между инъекциями. Гипериммунизацию животных прекращают после получения сывороток с активностью, предусмотренной инструкцией по ее изготовлению. Поэтому в процессе эксплуатации у продуцентов берут кровь и в ее сыворотке определяют титры антитоксинов. Активность каждого типа антитоксических сывороток устанавливают в реакции нейтрализации специфических токсинов при введении их смесей белым мышам или крысам и выражают ее количеством антитоксических единиц.

### **Диагностические сыворотки для постановки реакций связывания комплемента**

При ряде инфекционных заболеваний образуются так называемые комплементсвязывающие антитела. При их определении в практике используются специфические диагностические сыворотки, содержащие такие антитела. Чаще они используются для определения типа вируса, вызвавшего то или другое заболевание. Показательным примером является приготовление специфических диагностических ящурных сывороток. Он вызывается одним из вариантов вируса ящура: А, О, С, SAT-1, SAT-2, SAT-3, Asia-1. Идентификацию штамма циркулирующего вируса ящура проводят с помощью реакции связывания комплемента (РСК). Специфическую типовую и вариантную сыворотки получают от морских свинок, которых заражают вирусосодержащей суспензией соответствующего типа, с добавлением к ней сапонины и спустя 30—40 суток дополнительно гипериммунизируют тем же материалом путем двух-четырех внутримышечных инъекций. Через 7—10 суток после последней инъекции морских свинок обескровливают и из крови готовят инактивированную сыворотку. Сыворотку проверяют в РСК на активность и специфичность. В качестве антигена для изготовления сывороток используют штаммы вируса ящура, адаптированные к организму новорожденных крольчат или к культурам клеток.

#### **Моноклональные антитела и технологические приемы их получения**

Антитела строго специфичны и способны выявить минимальные различия в химическом составе и пространственной конфигурации молекул. В результате сложной антигенной структуры многих микроорганизмов при иммунном ответе на них в организме образуются неоднородные антитела, то есть в сыворотке будут содержаться смесь антител. Последние продуцируются разными линиями В-лимфоцитов и направлены к различным детерминантам антигена. Если бы определенную линию лимфоцитов удалось выделить и культивировать вне организма, как культуры клеток, то полученный клон лимфоцитов продуцировал бы однородный тип антител — моноклональные антитела. В иммунологии такая идея возникла давно. Но, к сожалению, антителобразующие лимфоциты плохо растут в культуре и зачастую отмирают. В то же время клетки злокачественной опухоли костного мозга, миеломы, обладая способностью к неограниченному росту, интенсивно продуцируют иммуноглобулины, идентичные между собой по структуре. То есть по сути это моноклональные антитела к неизвестному антигену.

Ученые давно стремились на основании гибридной технологии получить такие клоны гибридных клеток, которые бы сочетали энергию размножения миеломных клеток с высокой продукцией антител- лимфоцитов, то есть, чтобы они постоянно продуцировали моноклональные антитела.

Первые успехи в данном направлении были достигнуты английскими учеными Келлером и Милстейном (1975). Они получили в результате слияния клеток миеломы Р3 и лимфоцитов из селезенки мышей, иммунизированной эритроцитами в присутствии полиэтиленгликоля, гибридные клетки, которые при культивировании в селективной среде продуцировали иммуноглобулины только к эритроцитам. **Такие клетки-химеры или гибридомы**, будучи полученными путем слияния антителобразующих лимфоцитов и опухолевых клеток, наследовали способность к неограниченному росту в культуре клеток и в то же время к продукции антител определенной специфичности (моноклональных антител).

Но следует иметь в виду, что после слияния клеток двух различных линий образуется клон, антитела, которые он образует, необязательно сразу будут моноклональными в иммунологическом смысле, так как в каждой клетке гибридного клона вначале присутствуют хромосомы обеих родительских клеток. Экспрессия этих

хромосом ведет к продукции как селезеночных, так и миеломных иммуноглобулинов. Однако на ранних стадиях размножения гибридных клеток они быстро утрачивают часть хромосом. Важным при этом является выделить клоны клеток, потерявших хромосомы, присущие миеломе, но сохранившие хромосомы иммунных лимфоцитов. То есть выделяют те клоны клеток, которые синтезируют только тяжелые и легкие цепи иммуноглобулинов к заданному антигену.

#### **Антигены-диагностикумы**

Исследования сывороток больных животных на наличие в них антител, а также определение титров антител в специфических сыворотках при их промышленном изготовлении осуществляются с помощью антигенов-диагностикумов. По происхождению такие антигены подразделяются на бактериальные, риккетсиальные, вирусные.

При изготовлении бактериальных антигенов используют или живые культуры или гомогенные стандартизированные взвеси убитых микробов. Антигены из живых культур применяются редко, так как это связано с определенными технологическими трудностями, также возможностью заражения лабораторного персонала. Диагностикумы из убитых культур являются предпочтительными.

Приготовление диагностикумов связано прежде всего с тщательной подготовкой и селекцией штаммов микроорганизмов, из которых они готовятся. Производственные штаммы должны находиться в S-форме. Это обеспечивает им хорошую агглютинабельность, специфичность и образование устойчивой гомогенной взвеси. Чаще всего для получения диагностикумов определенные штаммы микроорганизмов выращивают на агаровых средах. Культуры микробов смывают с поверхности агара, а затем их инактивируют.

Исходя из наших знаний об объективно существующем разнообразии антигенной структуры возбудителей инфекционных заболеваний, в производстве биологических препаратов получают различные диагностикумы. *Антигены бывают корпускулярными и растворимыми.* Корпускулярные антигены представляют собой взвесь убитых, реже живых микробов в физиологическом растворе с определенной концентрацией консерванта. Во всех случаях антигены подвергают высокой степени очистки. Такие антигены используются для постановки РА, РСК, РДСК.

*Растворимые антигены* чаще всего готовят в виде экстрактов из агаровых культур соответствующих микробов. Они используются для постановки серологического диагноза с применением РСК при сальмонеллезе, бруцеллезе, инфекционном эпидидимите баранов и других заболеваниях, а также при постановке диагноза с применением реакций иммунодиффузии (РИД) на бруцеллез, лейкоз и многие другие инфекции.

При некоторых инфекционных заболеваниях (бруцеллез, пуллороз и другие) рекомендуются и производятся промышленным способом эритроцитарные диагностикумы.

Такие антигены представляют собой 5—10%-ю взвесь эритроцитов барана, sensibilizированных полисахаридно-полипептидной фракцией соответствующих возбудителей болезни. Они предназначены для прижизненной диагностики указанных и некоторых вирусных инфекций с применением реакции непрямой гемагглютинации (РИГА).

#### **Бактериофаги**

Бактериофаги, выделенные из патогенных микроорганизмов, могут быть использованы как специфические лечебно-профилактические биопрепараты.

Используя визуальный феномен лизиса культур микроорганизмов специфическим бактериофагом, в необходимых случаях его используют как диагностический тест. Например, в бактериологических лабораториях феномен бактериофагии используется как высокоспецифическая реакция при диагностике сибирской язвы.

Для этой цели биопредприятиями выпускается два сибирезвенных бактериофага: К.ВИЭВ и Гамма МВА. Для их изготовления используют авирулентные штаммы возбудителя сибирской язвы. Такие культуры выращивают в МПБ или дрожжевом бульоне. Непременным условием является то, что при засеве нужно использовать молодые, 5—6-часовые, расплодки производственных штаммов возбудителя. Кроме того, сразу после посева штаммов *B. anthracis* в бутылки вносится бактериофаг. Содержимое бутылей перемешивается, и они ставятся в термостат на 10—18 часов. По истечении указанного срока среду фильтруют через стерилизующие пластины или патроны. В фильтрате остается только бактериофаг. После изготовления бактериофага его разливают в ампулы и подвергают контролю на стерильность, активность и специфичность.

Сибирезвенный бактериофаг используется как диагностикум при дифференциации возбудителя сибирской язвы от антракоидов.

#### **Аллергены, технология их приготовления**

Аллергическая диагностика ряда инфекционных (чаще хронических) заболеваний животных и людей основана на феномене сохранения повышенной чувствительности организма к повторному введению того же антигена. В основе такой повышенной чувствительности лежат реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), которые проявляются спустя несколько часов, иногда суток после введения аллергена чувствительному (больному) организму. Обычно ГЗТ представляют собой клеточный феномен, в котором клетками-эффекторами, вступающими во взаимодействие с антигеном (аллергеном), являются сенсibilизированные Тгзт-лимфоциты лимфатических тканей и органов (лимфатических узлов, селезенки, грудного протока, перитонеальной жидкости, периферической крови и т. д.). Такие реакции выявляются постановкой кожных проб соответствующим аллергеном, и они связаны с клеточными механизмами. Для возникновения ГЗТ, как показывает широкий опыт аллергической диагностики многих хронических инфекционных болезней, необходим длительный контакт организма с антигенами инфекционного агента. Состояние ГЗТ обычно развивается через 2—3 недели после заражения организма и может сохраняться годами. Уровень аллергии непостоянен, может меняться в широких пределах и даже временно исчезать под действием различных факторов, например, при истощении. Животные в состоянии аллергии отвечают на введение аллергенов общей и местной реакцией. Особенно демонстративно протекает реакция при введении аллергенов внутрикожно и нанесение их на конъюнктиву. В толще кожи образуется инфильтрат, внешне проявляющийся припухлостью различной консистенции и болезненности. Инфильтраты возникают через несколько часов после введения аллергенов и достигают наибольшего развития через двое-трое суток. При нанесении аллергенов (туберкулина, маллеина) на конъюнктиву развивается гнойный конъюнктивит. Наибольшая интенсивность реакции наблюдается через 6—9—12 часов после нанесения аллергенов на конъюнктиву.

При подкожном и внутривенном введении аллергенов зараженные животные реагируют повышением температуры тела, учащенным дыханием, пульсом.

Для диагностики туберкулеза отечественной биопромышленностью готовят два аллергена для млекопитающих — сухой очищенный туберкулин PPD — в русской транскрипции ППД (Purified Protein Derivative), и альттуберкулин (АТК). Для диагностики туберкулеза птиц готовят сухой очищенный туберкулин (ППД).

#### *Вопросы для самоконтроля*

1. Назовите этапы производства диагностических и лечебно-профилактических сывороток.
2. Перечислите различия в производстве корпускулярных и растворимых антигенов.
3. Какие диагностикумы готовят при помощи гибридом?
4. В чем различие технологий производства преципитирующих диагностических и антитоксических сывороток
5. Охарактеризуйте основные этапы технологии производства бактериофагов.

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

а) основная литература (библиотека СГАУ)

1. Молчанов Г. И. Фармацевтические технологии: современные электрофизические биотехнологии в фармации: Уч. пос. / Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Л.М. Кубалова. - 2-е изд. - М.: Альфа-М: ИНФРА-М, 2014. - 336 с.: ил.; 60x90 1/16. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=314485> ISBN 978-5-98281-260-5

б) дополнительная литература

2. Белоусова, Р. В. Ветеринарная вирусология : учебник / Р. В. Белоусова, Э. А. Преображенская, И. В.и Третьякова ; Международная ассоциация "Агрообразование". - М. : КолосС, 2007. - 424 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 978-5-9532-0416-3
3. Инфекционные болезни животных : учебник / А.А. Сидорчук, Н.А. Масимов, В.Л. Крупальник [и др.] ; под ред. А.А. Сидорчука. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : ИНФРА- М, 2017. — 954 с. + Доп. материалы [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>]. <http://znaniium.com/bookread2.php?book=641846> (Высшее образование: Специалитет). дата обращения – 20.06.2016 г.
4. Вирусология и биотехнология: учебное пособие / Фирсов Г.М., Акимова С.А., - 2-е изд., дополненное - Волгоград: Волгоградский ГАУ, 2015. - 232 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=615175>. дата обращения – 20.06.2016 г.

## Библиографический список

### а) основная литература (библиотека СГАУ)

1. Павлович, С.А. Микробиология с вирусологией и иммунологией [Электронный ресурс] : учеб. пособие / С.А. Павлович. – 3-е изд., испр. - Минск: Выш. шк., 2013. – 799 с.: ил. - [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>]. <http://znaniium.com/bookread2.php?book=508936> ISBN 978-985-06-2237-2. дата обращения – 20.06.2017 г.
2. Вирусология и биотехнология / Белоусова Р.В., Ярыгина Е.И., Третьякова И.В., Калмыкова М.С. Издательство "Лань", 2016г.- 220 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <https://e.lanbook.com>] <https://e.lanbook.com/reader/book/88026/#1> ISBN: 978-5-8114-2266-1. дата обращения – 20.06.2017 г.
3. Луканин А. В. Инженерная биотехнология: основы технологии микробиологических производств/Луканин А.В. - М.: НИЦ ИНФРА-М, 2016. - 312 с.: 60x90 1/16. - (Высшее образование) [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=527386> ISBN 978-5-16-011479-8. дата обращения – 20.06.2017г.
4. Молчанов Г. И. Фармацевтические технологии: современные электрофизические биотехнологии в фармации: Уч. пос. / Г.И. Молчанов, А.А. Молчанов, Л.М. Кубалова. - 2-е изд. - М.: Альфа-М: ИНФРА-М, 2014. - 336 с.: ил.; 60x90 1/16. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=314485> ISBN 978-5-98281-260-5

### б) дополнительная литература

1. Белоусова, Р. В. Ветеринарная вирусология : учебник / Р. В. Белоусова, Э. А. Преображенская, И. В.и Третьякова ; Международная ассоциация "Агрообразование". - М. : КолосС, 2007. - 424 с. : ил. - (Учебники и учеб. пособия для студентов высш. учеб. заведений). - ISBN 978-5-9532-0416-3
2. Инфекционные болезни животных : учебник / А.А. Сидорчук, Н.А. Масимов, В.Л. Крупальник [и др.] ; под ред. А.А. Сидорчука. — 2-е изд., перераб. и доп. — М. : ИНФРА- М, 2017. — 954 с. + Доп. материалы [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>]. <http://znaniium.com/bookread2.php?book=641846> (Высшее образование: Специалитет). дата обращения – 20.06.2016 г.
3. Вирусология и биотехнология: учебное пособие / Фирсов Г.М., Акимова С.А., - 2-е изд., дополненное - Волгоград: Волгоградский ГАУ, 2015. - 232 с. [Электронный ресурс; Режим доступа <http://www.znaniium.com>] <http://znaniium.com/bookread2.php?book=615175>. дата обращения – 20.06.2016 г.
4. Периодические журналы «Ветеринария», «Ветеринарная патология», «Ветеринарный врач», «Вопросы вирусологии», «Лабораторное дело»; журналы: «Биотехнология» ISSN 1028-9399, «Молекулярная биология» ISSN 0026-8984, «Хранение и переработка сельскохозяйственного сырья» ISSN 2072-9669, «Техника и технология пищевых производств» ISSN 2074-9414. )
5. Базы данных, информационно-справочные и поисковые системы, Агропоиск, полнотекстовая база данных иностранных журналов Doal, поисковые системы Rambler, Yandex, Google:
  - Журнал «Биотехнология» (аннотации статей) (ссылка доступа – <http://www.genetika.ru/journal>)

- Журнал «Вестник биотехнологии и физико-химической биологии» (ссылка доступа – <http://www.biorosinfo.ru/archive/journal>)
- Научная электронная библиотека eLIBRARY.RU: журналы раздела тематического рубрикатора «Биотехнология» (ссылка доступа – [http://elibrary.ru/rubric\\_titles.asp?rcode=620000](http://elibrary.ru/rubric_titles.asp?rcode=620000))
- On-line-журнал «Биотехнология. Теория и практика» (ссылка доступа – <http://www.biotechlink.org>)
- Словари и энциклопедии (ссылка доступа – <http://academic.ru/>)
- Электронная библиотечная система СГАУ (ссылка доступа – <http://library.sgau.ru>)
- Электронно-библиотечная система СГАУ: каталог диссертаций и авторефератов; область поиска – биотехнология, вирусология); ссылка доступа – [http://library.sgau.ru/cgi-bin/irbis64r\\_01/cgiirbis\\_64.exe](http://library.sgau.ru/cgi-bin/irbis64r_01/cgiirbis_64.exe))

<b>Содержание</b>	
<b>Введение</b>	<b>3</b>
<b>Лекция 1. Роль вирусов в инфекционной патологии животных, растений и человека. Ветеринарная вирусология, ее задачи и достижения.</b>	<b>4</b>
1.1 Открытие вирусов, история их изучения	
1.2. Роль вирусов в инфекционной патологии животных, растений и человека. Ветеринарная вирусология, ее задачи.	
Вопросы для самоконтроля	
Список литературы	
<b>Лекция 2. Культивирование вирусов.</b>	<b>10</b>
2.1. Обзор живых систем для культивирования вирусов	
2.2. Культуры клеток: классификация, особенности, преимущества перед другими живыми системами.	
Вопросы для самоконтроля	
Список литературы	
<b>Лекция 3. Общая характеристика вирусов. Структура и химический состав вирионов.</b>	<b>18</b>
3.1. Отличия вирусов от бактерий и хламидий. Особенности принципа организации вирусов (морфология, типы симметрии, размер, простые и сложные вирусы).	
3.2. Характеристика структурных компонентов вириона (геном; белки, структурные и неструктурные; углеводы; липиды) и их функции.	
Вопросы для самоконтроля	
Список литературы	
<b>Лекция №4. Таксономия вирусов</b>	<b>25</b>
4.1. Основные принципы современной таксономии и номенклатуры вирусов, их научное и практическое значение. Прионы и вироиды, их место в таксономии	
4.2 Семейства вирусов позвоночных	
Вопросы для самоконтроля	
Список литературы	
<b>Лекция №5. Репродукция вирусов.</b>	<b>40</b>
5.1. Размножение вирусов. Общие представления.	
5.2. Клеточный геном и реализация генетической информации in vivo. Формы взаимодействия вириона вируса с клеткой. Этапы репродукции вирионов. Внутриклеточные формы вируса. Исходы вирусной инфекции на уровне клетки.	
Вопросы для самоконтроля	
Список литературы	
<b>Лекция №6. Патогенез и иммунитет при вирусных инфекциях.</b>	<b>47</b>
6.1. Патогенез при вирусных инфекциях.	
6.2. Иммунитет при вирусных инфекциях. Виды вирусных вакцин	
Вопросы для самоконтроля	

Список литературы	
<b>Лекция №7. Обзор некоторых вирусов, поражающих животных. Пневмоэнтериты крупного рогатого скота. Бычий аденовирус, вирус инфекционного ринотрахеита, вирус парагриппа третьего серотипа, вирус вирусной диареи и респираторно-синцитиальной вирус крупного рогатого скота: строение вирионов, особенности репродукции и антигенных свойств, характеристика болезней, вызываемых этими вирусами, особенности их диагностики и специфической профилактики</b>	57
7.1. Инфекционный ринотрахеит, вирус парагриппа и респираторно-синцитиальной инфекция крупного рогатого скота	
7.2 . Вирусная диареи и аденовирусная инфекция крупного рогатого скота.	
Вопросы для самоконтроля	
Список литературы	
<b>Лекция №8. Ведение в биотехнологию. Биотехнологическое получение белков, ферментов, антибиотиков витаминов, интерферона.</b>	
8.1. Введение в биотехнологию. Экологическая, сельскохозяйственная, промышленная биотехнология	
8.2. 8. Биотехнологическое получение белков, ферментов, антибиотиков витаминов, интерферона.	
Вопросы для самоконтроля	
Список литературы	
<b>Лекция №9. Биотехнологические основы культивирования микроорганизмов</b>	66
9.1. Первичные и вторичные метаболиты микроорганизмов. Биотехнологические основы культивирования микроорганизмов.	
9.2. Технологические основы выделения и концентрирования биопрепаратов и продуктов микробного синтеза	
Вопросы для самоконтроля	
Список литературы	
<b>Лекция № 10. Биотехнологические основы приготовления гипериммунных сывороток и диагностических препаратов.</b>	81
10.1. Основы приготовления гипериммунных сывороток	
10.2. 10.2 Биотехнологические принципы приготовления диагностических препаратов	
Вопросы для самоконтроля	
Список литературы	
Библиографический список	89
Содержание	97