



Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Башкирский государственный аграрный университет»

Методические указания

Ветеринарная
вирусология и
биотехнология

Кафедра инфекционных болезней,
зоогигиены и ветсанэкспертизы

ВЕТЕРИНАРНАЯ ВИРУСОЛОГИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

**БИОТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ГИПЕРИММУННЫХ
СЫВОРОТОК И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ**

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

к лабораторной работе

Направление подготовки (специальность)

3.36.05.01 Ветеринария

Профиль подготовки

(специализация, магистерская программа, направленность программы)

Болезни сельскохозяйственных и домашних животных

Ветеринарно-санитарная экспертиза

Ветеринарная фармация

Квалификация (степень) выпускника

Ветеринарный врач

Форма обучения

очная, заочная

Уфа 2018

УДК637.12.04/.07:378.147

ББК 36.95+74.58

Н32

Рекомендовано к изданию методической комиссией факультета биотехнологий и ветеринарной медицины (протокол №9 от « 29 » марта 2018 г.)

Составитель: доцент, канд. биол. наук О.Н. Николаева

Рецензент: доцент кафедры морфологии, патологии, фармации и незаразных болезней
Базекин Г.В.

Ответственный за выпуск: зав. кафедрой инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы, д-р биол. наук, профессор Андреева А.В.

г. Уфа, БГАУ, кафедра инфекционных болезней, зоогигиены и ветсанэкспертизы

БИОТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК И ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

1.1 Цель работы

Изучить биотехнологию изготовления, применяемые для профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней сельскохозяйственных животных.

1.2 Материалы и оборудование

Таблица классификации вакцин, вакцины, сыворотки, аллергены, антигены, бактериофаги

1.3 Задание

- 1) Изучить классификацию биопрепаратов по их изготовлению и применению.
- 2) Охарактеризовать гипериммунные сыворотки и иммуноглобулины; указать цель и способ их применения.
- 3) Определить пригодность биопрепаратов для использования.

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Сыворотки и глобулины. Это препараты, содержащие антитела к определенным возбудителям болезней, получаемые от гипериммунизированных или переболевших животных и предназначенные для пассивной иммунизации или лечения, а также диагностики инфекционных болезней. Сыворотки и глобулины в зависимости от способа получения и назначения классифицируют следующим образом.

Классификационный признак Вид сыворотки

Способ получения Сыворотка реконвалесцентов

Гипериммунная Антитоксическая Гаммаглобулины при введении сывороток иммунитет формируется в среднем в течение 1...3 сут и сохраняется до 2...3 нед; при колостральной иммунизации иммунитет сохраняется до 1...3 мес.

Бактериофаги, интерфероны. Их относят к биопрепаратам широкого спектра действия (используют для профилактики, лечения и диагностики).

Бактериофаги – вирусы бактерий, широко распространенные в природе, способные вызывать лизис бактериальной клетки.

Бактериофаги служат для диагностики, лечения и профилактики ИБ бактериальной этиологии. В лечебно-профилактических целях в настоящее время их применяют не широко (против эшерихиоза телят, пуллороза-тифа кур); вводят подкожно, внутримышечно и внутрь.

Интерфероны – гормоноподобные растворимые белки и полипептиды, обладающие противовирусным и противораковым действием.

В организме синтезируются интерфероны трех типов: альфа-интерферон (макрофагами, в меньшей степени – лейкоцитами); бета-интерферон (фибробластами); гамма-интерферон (Т-лимфоцитами). Особенность интерферонов – отсутствие строгой видовой специфичности. В отличие от антител интерфероны не действуют на внеклеточные вирусы; препятствуют проникновению вируса в клетку, а также выходу

созревших вирусных частиц из клетки, ограничивают или прекращают его размножение. Интерферон под действием индуктора начинает вырабатываться быстро – через 1...3 ч после стимуляции, достигает максимальной концентрации в организме через 12 ч, а через 2 сут уже исчезает. В настоящее время во всем мире производят и широко применяют природные и рекомбинантные интерфероны человека всех типов и животных: например человеческий лейкоцитарный интерферон, генноинженерный (рекомбинантный) интерферон – «Реаферон», свиной лейкоцитарный интерферон с индуктором, интерферон лейкоцитарный КРС, миксоферон, кинорон и др.

Иммуномодуляторы (ИМ). Это вещества химической и биологической природы, обладающие специфическим и неспецифическим иммуностимулирующим и иммунокорректирующим действием. Иммуномодуляторы разделяют на гетерологичные (различные по природе) и гомологичные (вырабатываемые самим организмом). В настоящее время ветеринарной наукой разработано для практических целей большое количество препаратов данной группы: гомологичные ИМ – Т- и В-активины, тималин, тимоген, гликопид (ГМДП), интерлейкины и пр; гетерологичные ИМ – левамизол, нуклеинат-натрия, некоторые антибиотики.

Иммуномодуляторы применяют в основном при нарушениях функции иммунной системы (первичные или вторичные иммунодефицита).

Интерфероны. Интерфероны альфа- и бета-типов, природные и рекомбинантные характеризуются противовирусным действием; препараты на их основе (первый из этой группы – человеческий лейкоцитарный интерферон) применяют при комплексном лечении животных от вирусных болезней: генно-инженерный (рекомбинантный) интерферон – «Реаферон»; свиной лейкоцитарный интерферон с индуктором; лейкоцитарный интерферон КРС; «Миксоферон» – смесь генно-инженерных интерферонов, предназначенная для профилактики и лечения вирусных болезней животных; «Кинорон» – смесь генно-инженерных интерферонов и иммуномодуляторов – лимфокинов, получивший широкую известность при лечении вирусных болезней домашних животных – собак и кошек.

Серотерапия. Это широко распространенный метод лечения больных животных, известный еще до открытия эры антибиотиков. По способу получения антител, их составу и свойствам, средства серотерапии подразделяют на гипериммунные; реконвалесцентные; антитоксические, антибактериальные, противовирусные, смешанные; моновалентные, поливалентные.

Наиболее эффективными считают антитоксические сыворотки, содержащие антитоксические антитела (антитоксины), которые используют в основном при болезнях, вызываемых клостридиями (столбняк, ботулизм, энтеротоксемия и другие анаэробные инфекции). Эффективны также антибактериальные сыворотки, если они введены вовремя, при болезнях, сопровождающихся септицемией (сибирская язва, рожа и др.). Обычно мало эффективны сыворотки при хронических инфекциях, особенно если возбудитель – внутриклеточный паразит (микоплазмы, риккетсиозы, некоторые вирусные болезни).

Иммуноглобулины (гаммаглобулины) – концентрированные антитела, выделенные из сывороток различными методами; средство успешно используют при сибирской язве, болезни Ауески, столбняке, ботулизме и др. К преимуществам иммуноглобулинов следует отнести:

высокую концентрацию специфических антител; отсутствие балластных белков; меньшие, чем при использовании сывороток, дозы; сниженное анафилактическое действие.

Лечебно-профилактические иммунные сыворотки, иммуноглобулины

В практике борьбы с инфекционными болезнями животных используются биологические препараты, как с профилактической, так и с лечебной целями. Эта группа препаратов с комплексным назначением представлена иммунными сыворотками - иммунными глобулинами и бактериофагами.

Иммунные сыворотки. Для получения иммунных сывороток в качестве продуцентов используются, как правило, лошади, волы, ослы, свиньи, овцы и реже другие животные. При этом отбирают животных из стационарно благополучной по инфекционным болезням местности. Животные должны быть клинически здоровы и свободны от кожных паразитов и гельминтов. В технологическом процессе получения иммунных сывороток можно выделить следующие основные этапы: отбор и исследование животных продуцентов, вакцинация (создание грундивмунитета), гипериммунизация (многократное парентеральное введение нарастающих доз антигена), взятия крови, сепарирование от фибрина и форменных элементов, консервирование, отстаивание, фильтрование и контроль.

По направленности действия иммунные сыворотки подразделяют на антибактериальные, противовирусные и анатоксические, например, сыворотка против рожи свиней, сыворотка против болезни Ауески сельскохозяйственных животных и пушных зверей, анитоксическая сыворотка против анаэробной дизентерии ягнят и инфекционной энтеротоксемии овец. При введении гетерологичных (чужеродных) сывороток животным следует всегда помнить, что они могут вызвать анафилактический шок или сывороточную болезнь.

Иммунные сыворотки содержат специфические антитела против соответствующих возбудителей. Лечебно-профилактическая эффективность иммунных сывороток зависит от титра антител, способа и кратности введения. При введении иммунной сыворотки больному животному она оказывает выраженное лечебное действие при введении с профилактической - создается пассивный иммунитет через несколько часов после введения, продолжительность которого 10-14 дней. Терапевтические дозы иммунных сывороток в 5-10 раз больше профилактических.

Иммуноглобулины. Иммуноглобулины, используемые для лечебных целей, представляют собой водный раствор глобулиновой фракции белка сыворотки крови животных, который содержит гамма - и бета - глобулины. Иммуноглобулины изготавливают из гипериммунных сывороток, применяют с лечебной и профилактической целью. Биофабрики выпускают глобулин против болезни Ауески, антирабический гамма-глобулин и др.

В настоящее время применяют нормальный неспецифический глобулин, содержащий комплекс гамма - и бета - глобулинов, полученных из белков сыворотки крови здоровых животных. Нормальный глобулин повышает естественную резистентность организма, стимулирует рост и развитие молодых животных и птиц. Препарат молодняку вводят подкожно и внутримышечно, молодняку птиц - аэрозольно.

Биопрепараты. При вирусных болезнях с лечебно-профилактической целью применяют специфические биопрепараты – иммунные сыворотки и глобулины, иммуно- лактон, кровь или сыворотку реконвалесцентов, интерферон и др. Действие этих препаратов начинается после введения и продолжается до 2...3 нед.

Иммунные сыворотки. Предприятия биологической промышленности (биофабрики, биокомбинаты) выпускают *моновалентные* сыворотки, которые содержат большое количество антител против какого-либо одного возбудителя (антирабическая сыворотка, сыворотка против вирусного гепатита утят и др.), и *поливалентные*, содержащие антитела против нескольких возбудителей (сыворотка против чумы, парвовирус- ной инфекции и вирусного гепатита плотоядных и др.). Для получения сыворотки используют гипериммунизированных животных-репродукторов.

В технологии изготовления иммунных сывороток можно выделить следующие основные этапы.

1. Подбор продуцентов – лошади, крупный рогатый скот (волы), реже – свиньи, овцы, еще реже – кролики.

2. Карантирование продуцентов.

3. Иммунизация (вакцинация); создание грунд-иммунитета.

Подготовка животных к гипериммунизации осуществляется путем введения соответствующей вакцины. У животных вырабатываются антитела, количество которых достаточно для защиты самого продуцента от возбудителя, но очень мало для того, чтобы сыворотка продуцента оказала лечебный эффект при введении больному животному;

4. Гипериммунизация (сверхвакцинация). Заключается в многократных парентеральных (подкожных, внутримышечных и внутривенных) введениях нарастающих доз соответствующего возбудителя (антигена) через определенные промежутки времени. В процессе гипериммунизации в организме вырабатывается большое количество специфически активных иммуноглобулинов, выполняющих функцию вируснейтрали- зующих антител, которые накапливаются в крови.

5. Эксплуатация. От продуцентов периодически (2...4 раза в месяц) из вены берут кровь с целью получения иммунной сыворотки. Первое взятие крови обычно проводят через 7...10 сут. после последнего введения антигена. После взятия крови продуцентам вводят очередную дозу антигенов с целью активизации синтеза антител. У животных берут кровь, исходя из живой массы тела; обычно около 15 мг/кг. Если у продуцента происходит снижение титра антител, то проводят полное обескровливание.

6. Обработка крови и получение сыворотки. Взятую от продуцента кровь выдерживают 3 ч при температуре 37°C, затем отстаивают 24...48 ч при 8°C, после чего производят слив сыворотки. Полученную сыворотку консервируют (0,25...0,5%-ные растворы фенола) и выдерживают не менее 20 сут. при 37°C. Далее осуществляют контроль на стерильность, безвредность, специфическую активность.

Специфические глобулины. Представляют собой 10%-ный водный раствор глобулиновой фракции белка, выделенной из соответствующей иммунной сыворотки. Это концентрат специфически активных иммуноглобулинов (антител), освобожденных от балластных белковых фракций. Глобулины оказывают большой лечебный или профилактический эффект.

Глобулины выделяют из иммунных сывороток спиртовым, ри-ваноловым методом. Например, из антирабической сыворотки получают антирабический гамма-глобулин; из сыворотки против болезни Ауески – глобулин против возбудителя болезни Ауески. **Иммунолактон (лактоглобулин, сероколострин).** Препарат, который получают из сыворотки молока коров, подвергнутых внутривымянной гипериммунизации. Иммунолактон используют для профилактики и терапии ящура у телят, поросят, ягнят и козлят.

Бровь и сыворотка реконвалесцентов. Реконвалесцента-ми называют переболевших животных, в организме которых накапливаются вируснейтрализующие антитела. Кровь, а в дальнейшем сыворотку получают непосредственно в хозяйстве от переболевших или вакцинированных животных через 3...4 нед. после переболевания или последней вакцинации.

Глюкозоцитратную кровь реконвалесцентов применяют сразу же после приготовления или в течение 8...10 сут. при условии хранения при 4...8⁰С. Сыворотка пригодна в течение 6 мес. при хранении ее при 2...10⁰С.

Эти препараты применяют для лечебно-профилактических целей в тех хозяйствах, откуда отобраны доноры-реконвалесценты. Препараты проходят контроль на стерильность, безвредность и активность.

Химиотерапия вирусных инфекций. Химиотерапия бактериальных, протозойных и грибных инфекций достигла колоссальных успехов, дав практике сотни эффективных препаратов. Химиотерапия вирусных инфекций имеет более чем скромные успехи, и в будущем не видится ее взлета. Это и понятно, так как метаболизм вирусов тесно связан с обменом веществ поражаемых ими клеток. Таким образом, основной принцип химиотерапии инфекционных болезней – поиск и создание веществ, которые были бы эффективными в отношении вирусов, не повреждая клетку.

Природа создала универсальный противовирусный препарат – *интерферон*, представляющий собой белок, продуцируемый зараженными клетками или всем организмом. Он не действует на внеклеточный вирус, но подавляет его репродукцию, т. е. действует на агент опосредованно через чувствительные клетки, в которых не нарушен синтез клеточной РНК и клеточных белков. Интерферон не обладает видоспецифическим антивирусным действием. Например, будучи индуцирован вирусом Ньюкаслской болезни, он подавляет репродукцию не только этого вируса, но и целого ряда других. Однако ему присуща видотканевая специфичность, т. е. активность в той биологической системе, в которой он репродуцирован.

Использование интерферона для лечения вирусных инфекций ограничивается его способностью защищать только инфицированные клетки, поэтому его следует применять в начале болезни. Антивирусное действие интерферона проявляется на очень ранней стадии вирусной инфекции.

В настоящее время некоторые химические соединения успешно применяют на практике. Так, рекомендован новый препарат *оксолин*; установлена его высокая активность против гриппа А₂. В 1960-1972 гг. были разработаны антивирусные препараты метисазон, идоксуридин, видарабин, амантадин, рибавирин против трех вирусов: оспы, герпеса, гриппа. *Амантадин* оказался довольно активным ингибитором репродукции некоторых РНК-содержащих вирусов. Особенно чувствителен к нему вирус гриппа. Неплохо зарекомендовал себя *ремантадин*, который укорачивает длительность заболевания гриппом и облегчает его течение.

В последние годы ученые обратили внимание на противовирусное действие *нуклеаз* – белковых ферментативных веществ, вызывающих быстрое расщепление нуклеиновых кислот, в результате которого последние быстро теряют свою активность и в конце концов разрушаются.

Таким образом, лечение вирусных болезней до сих пор остается сложнейшей проблемой, несмотря на то что в этом направлении ведутся разносторонние исследования.

ВОПРОСЫ ДЛЯ САМОКОНТРОЛЯ ЗНАНИЙ

1. Возможно ли подавлять начальные стадии взаимодействия вируса с клеткой?
2. Какова роль интерферона при лечении вирусных болезней?
3. Какие препараты существуют для лечения вирусных болезней?
4. Какова перспектива химиотерапии вирусных болезней?

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Барышников, П. И. Ветеринарная вирусология [Текст] : учебное пособие для студ. вузов, обучающихся по спец. 111201 - "Ветеринария" : рек. УМО по образованию / П. И. Барышников. - М. : ФОРУМ, 2009. - 96 с.

2. Госманов, Р.Г. Ветеринарная вирусология: учебник для студ. вузов по спец. 111201 «Ветеринария» / Р.Г. Госманов, Н.М. Колычев. – 2-е изд., перераб. и доп.. – М.: КолосС, 2006. – 304 с.

3. Белоусова, Р.В. Ветеринарная вирусология: учебник для студ. вузов по спец. 111201 «Ветеринария» / Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская, И.В. Третьякова; под ред. Р.В. Белоусовой; Международная ассоциация «Агрообразование». – М.: КолосС, 2007. – 423 с.

4. Белоусова, Р.В. Практикум по ветеринарной вирусологии: учебн. пособие для студ. вузов по спец. 310800 «Ветеринария» / Р.В.Белоусова. - 3-е изд. - М.: КолосС, 2006.- 248 с.

5. Практикум по биотехнологии Тихонов И.В. [и др.]. - М.: Изд-во «Киселева Н.В.», 2010. - 330 с.

6. Кудачева, Н. А. Общая ветеринарная вирусология [Текст] : учебное пособие / Н. А. Кудачева ; МСХ РФ, Самарская ГСХА. - Самара : РИЦ СГСХА, 2010. - 300 с.