

Министерство образования и науки Самарской области  
государственное бюджетное профессиональное образовательное учреждение  
Самарской области «Усольский сельскохозяйственный техникум»

**Учебная практика. ПМ 01 МДК 01.01.р.3. Организация мероприятий по профилактике ликвидации инфекционных болезней.**

**Дата занятия: 15.06.2020**

**Продолжительность занятия: 8 часов.**

**Группа: 21 В.**

**Специальность: 36.02.01 Ветеринария.**

**Тема занятия: Виды биологических препаратов.**

**Цель занятия: Ознакомиться с разновидностями биологических препаратов.**

**Задание 1: Изучить биологические препараты для специфической профилактики.**

**Задание 2: Изучить биопрепараты применяемые для лечения.**

**Задание 3: Изучить биопрепараты для лабораторной и аллергической диагностики.**

***Вакцины.*** Эти биологические препараты содержат в качестве активного начала цельные микробные клетки или их компоненты. Вакцины предназначены для создания искусственного активного иммунитета. Различают несколько основных типов вакцин против инфекционных болезней сельскохозяйственных животных. В ветеринарной практике чаще всего используют вакцины живые, инактивированные, анатоксины и некоторые другие.

*Живые вакцины* готовят из штаммов микроорганизмов с ослабленной вирулентностью (аттенуированных). Главное требование, предъявляемое к вакцинным штаммам, — наличие стойкой наследственно передающейся остаточной вирулентности. При введении таких штаммов микроорганизмов в организм культура должна приживаться и размножаться, но не вызывать клинических проявлений

болезни, что приводит к созданию иммунитета высокой напряженности и длительности. Для приготовления вакцин аттенуированные штаммы возбудителей культивируют на специальных питательных средах в реакторах, куриных эмбрионах или культурах клеток и тканей. Полученную биомассу очищают от балластов и после проверки на безвредность, микробную загрязненность и активность в соответствии с общепринятыми методами используют для иммунизации животных и птиц.

Живые вакцины имеют ряд преимуществ перед вакцинами других типов: главное из них — высокая иммуногенность, т. е. создание иммунитета высокой напряженности и длительности, приближающегося к постинфекционному; однократная иммунизация; возможность введения естественными путями и др. Среди недостатков живых вакцин следует отметить: необходимость соблюдения мер предосторожности при их транспортировке и хранение при температуре 4...10°C; поствакцинальные реакции и осложнения; реверсия вирулентности; после вакцинации бактериальными вакцинами нельзя применять в течение 7 суток антибактериальные препараты. В настоящее время биопромышленность выпускает живые вакцины против сальмонеллеза, пастереллеза, бруцеллеза, туляремии, листериоза, рожи свиней, сибирской язвы и др.

Для приготовления *инактивированных вакцин* в качестве вакцинного штамма используют высоковирулентные и иммуногенные штаммы микроорганизмов, выращенные в жидких питательных средах в котлах-реакторах; выход бактериальной массы с плотных питательных сред незначительный. По истечении срока культивирования бактериальную массу собирают и инактивируют. Для инактивации микроорганизмов сочетают различные физические факторы (нагревание) и химические вещества (формалин, фенол и др.), в основном формалин. Для повышения эффективности инактивированных вакцин применяют депонирующие средства, на которых микробные тела адсорбируются (алюминиевые квасцы, гидроксид алюминия), или их эмульгируют в минеральных маслах. Добавление депонирующих веществ к инактивированным культурам необходимо для создания «депо» на месте введения препарата, что способствует длительному воздействию микробного антигена на организм животного и обуславливает более высокий уровень образования антител.

*Химические вакцины* применяют для профилактики инфекционных болезней. Представляют собой антигены и антигенные комплексы, извлеченные из микробных культур тем или иным способом и в той или иной степени очищенные от балластных иммунизирующих веществ.

*Анатоксин* (от греч. «ана» — обратное, противоположное действие и токсин — яд) — токсин, утративший свою токсичность под действием химических или физических факторов, но сохранивший антигенные и иммуногенные свойства. Анатоксины — аналоги инактивированных вакцин — препараты обезвреженного токсина, очищенного от балластных веществ, сконцентрированного и адсорбированного (чаще на алюмокалиевых квасцах). Введение в анатоксин адсорбента имеет цель повысить его иммуногенные свойства. Основной метод перевода экзотоксина в состояние анатоксина был удачно разработан французским иммунологом Г. Районом (1923), который установил, что прибавление к токсину формалина в небольших количествах и выдерживание при 37 °С в течение месяца лишает его токсичности с сохранением иммунизирующей активности. Примером служит столбнячный анатоксин.

*Поливалентные* вакцины готовят из нескольких типов одного вида микроорганизмов. *Ассоциированные* вакцины содержат антигены разных видов возбудителей.

Контроль вакцин. Вакцины всех типов после приготовления проверяют в основном по трем параметрам.

*Стерильность* (инактивированные) или *чистоту роста* (живые) контролируют посевом на питательные среды.

*Безвредность* проверяют введением вакцины тем или иным лабораторным животным. Вакцина не должна вызывать заболевание и гибель животных.

*Активность (иммуногенность)* обычно контролируют следующим образом. Вакцину вводят лабораторным животным, и через промежуток времени, достаточный для выработки активного иммунитета (15...20сут), эту группу вместе с контрольной группой непривитых животных заражают летальной дозой возбудителя. 80 % и более контрольных животных должны погибнуть, вакцинированные должны выжить. В некоторых случаях об иммуногенности препарата судят по косвенным показателям: количеству агглютининов у привитых животных (лептоспирозная вакцина), анитоксинов в РН (вакцина против ботулизма).

***Иммунные сыворотки и иммуноглобулины.*** Изготовление лечебно-профилактических иммунных сывороток и иммуноглобулинов производит биологическая промышленность. В качестве продуцентов иммуносывороток используют лошадей, мулов, ослов, волов и реже другие виды животных. Гипериммунизацию осуществляют нарастающими дозами антигенов по утвержденным производственным схемам, отличающимся продолжительностью иммунизации,

интервалами между циклами иммунизации, дозами для каждого цикла введения и реакцией продуцента на введение антигена. По окончании цикла иммунизации, когда в сыворотке крови продуцентов находится максимальное количество специфических антител, у животных берут кровь. Чаще это делают на 10...14-е сутки после введения продуценту последней дозы антигена. Из крови выделяют сыворотку общепринятыми методами и стерилизуют ее через бактериальные фильтры или методом тинда-лизации. В качестве консервантов используют 0,25...0,5%-е растворы фенола, 0,01...0,03%-е растворы тиомерсала (мертиолята) или другие вещества.

*Сыворотка реконвалесцентов.* Это сыворотка крови переболевших животных, содержащая специфические антитела. Сыворотка реконвалесцентов применяется с лечебной и профилактической целями. Ее рекомендуется получать и применять животным в одном и том же хозяйстве. Кровь от животных-доноров берут непосредственно в хозяйстве или во время убоя их на мясокомбинате.

Диагностические иммунные сыворотки и иммуноглобулины. Получают путем гипериммунизации животных соответствующим антигеном (возбудителем). В большинстве случаев продуцентами сывороток являются лабораторные животные (кролики, морские свинки), петухи и реже лошади. Готовые сыворотки проверяют на стерильность, активность и специфичность. Все диагностические сыворотки содержат специфические антитела к определенному антигену.

Диагностические сыворотки применяют в серологических реакциях в следующих целях:

- для определения возбудителя болезни в патологическом материале (сибирская язва и др.);
- при определении вида (серогруппы, серовара) возбудителей инфекции, выделенных в чистой культуре (сальмонеллез, бруцеллез, листериоз и др.);
- в качестве заведомо положительного контроля при постановке любой серологической реакции.

*Иммуноглобулины.* Важнейшей составной частью сыворотки крови являются белки, основная масса которых представлена альбуминами и глобулинами. Активность антител установлена только у глобулиновой фракции сыворотки. Таким образом, антитела, синтезирующиеся в организме, неоднородны; с целью удаления неактивных, балластных белков, повышения эффективности и получения препаратов с высоким содержанием специфических антител применяют методы очистки и концентрирования последних.

Принципы очистки сывороток основаны на выделении из них активных белковых фракций — иммуноглобулинов — и удалении

балластных фракций, не являющихся носителями антител. Препараты иммуноглобулинов намного превосходят по своей профилактической и лечебной эффективности препараты, состоящие из нативной сыворотки. В настоящее время выпускают специфические иммуноглобулины против бешенства, столбняка, сибирской язвы и др.

*Антитоксические сыворотки.* Сыворотки, в состав которых входят антитела (иммуноглобулины), способные специфически связывать и нейтрализовать токсины микробного, растительного и животного происхождения. В целом же данным термином называют гипериммунные сыворотки, содержащие эти антитела.

Антитоксины применяют для профилактики и лечения столбняка, ботулизма, злокачественного отека. Сыворотки вводят на ранних сроках заболевания. Антитоксинотерапия не эффективна, если клинические признаки болезни уже четко выражены, так как антитоксины не оказывают лечебного действия и могут лишь предотвратить развитие интоксикации. Как и у всех иммуноглобулинов, их действие не превышает 2...3 недели.

*Контроль сывороточных препаратов.* Включает в себя проверку на стерильность, безвредность и специфическую активность.

*Стерильность* препаратов определяют посевом на питательные среды (МПА, МПБ, МППБ, агар Сабуро или Чапека).

*Безвредность* каждой серии обычно контролируют введением сыворотки морским свинкам.

*Специфическую активность* сыворотки проверяют в зависимости от направленности ее действия. Определение превентивных (защитных) свойств на естественно-восприимчивых или лабораторных животных заключается и в том, что животным вводят подкожно, внутримышечно или внутрибрюшинно сыворотку, а через 20...24 ч иммунизированным и контрольным животным вводят подтитрованную дозу гомологичного вирулентного микроорганизма. Иммунизированные животные должны остаться здоровыми. Контрольные переболевают с проявлением характерных признаков заболевания.

Активность антитоксических и ряда противовирусных сывороток определяют в реакциях нейтрализации (РН). Количество антител в сыворотках устанавливают при помощи серологических реакций (РСК, РА, РИГА, РДП и др.).

***Диагностические антигены и аллергены.*** Принцип и методика приготовления антигена аналогичны приготовлению инактивированных вакцин.

Антигены, как и другие диагностические препараты, готовят на биофабриках (биокомбинатах). Антигены в своем составе содержат

убитые целые микробные клетки или экстракты, полученные из соответствующих микроорганизмов.

Аллергены в качестве диагностических препаратов представляют собой экстракты из бактериальной массы. Их выпускают биофабрики (биокомбинаты). Аллергены используют при аллергической диагностике туберкулеза (туберкулин), паратуберкулеза (паратуберкулин), бруцеллеза (бруцеллин), сапа (маллеин), туляремии (тулярин), сибирской язвы (антраксин) и др.

Туберкулин готовят путем выращивания культур микобактерий туберкулеза бычьего и человеческого вида на мясопептонном глицериновом бульоне (в течение 6...8 нед). Затем культуру стерилизуют в автоклаве, упаривают до 1/10 объема, отслаивают, фильтруют через бактериальные фильтры (Зейтца) и добавляют 50%-й раствор глицерина. Контроль качества аллергена включает в себя установление стерильности и специфической активности. Специфическую активность проверяют на здоровых и реагирующих на аллерген животных параллельно со стандартным аллергеном.

**Диагностические антитела.** Принцип получения диагностических иммунных сывороток такой же, как и при получении лечебно-профилактических сывороток. Диагностические сыворотки должны обладать не только высокой активностью в серологических реакциях, но и специфичностью. С помощью диагностических сывороток обнаруживают микробные антигены в тканевых материалах и идентифицируют выделенные микроорганизмы. В зависимости от целевого назначения различают видовые сыворотки (предназначены для идентификации микроорганизмов на уровне вида), групповые (идентификация на уровне серологической группы), серовариантные (на уровне серовара). Иммунные сыворотки готовят для использования в различных серологических реакциях (РА, РП, РДП, РСК, РН). При получении антител, меченных флуорохромом и ферментами, из иммунных сывороток предварительно выделяют и очищают иммуноглобулиновую фракцию. В основном диагностические сыворотки (диагностикумы) контролируют на стерильность, активность и специфичность.

**Моноклональные антитела.** Обычные диагностические сыворотки — поликлональные, поскольку содержат антитела, синтезированные разными линиями (клонами) В-лимфоцитов к различным антигенным детерминантам. Моноклональные антитела представляют собой иммуноглобулины, продуцируемые одним клоном клеток и реагирующие с определенным антигенным эпитопом микроорганизма.

Чтобы получить моноклональные антитела, изолируют и поддерживают линию лимфоцитов, синтезирующих антитела определенной специфической направленности. Клетки-продуценты антител не способны расти *in vitro*. Злокачественная опухоль (миелома) синтезирует в больших количествах аномальные иммуноглобулины и способна к неограниченному росту *in vitro*. Была разработана методика слияния клеток миеломы с лимфоцитами, при этом гибридная клетка (гибридома), как и опухолевая, способна к неограниченному росту и одновременно синтезирует антитела, как лимфоидная клетка. Необходимо обнаружить клон клеток, продуцирующих антитела необходимой специфической направленности. Получение моноклональных антител включает в себя несколько этапов.

Известным антигеном иммунизируют животных. Затем из селезенки выделяют В-лимфоциты.

Проводят слияние (гибридизацию) В-лимфоцитов и миеломных клеток. Получают смесь лимфоцитов гибридных и миеломных клеток.

Смесь клеток культивируют в среде, содержащей ГАТ (гипоксантин-аминоптерин-тимидин), что приводит к гибели лимфоцитов и миеломных клеток, так как на этой среде растут только гибридомы.

Гибридомные клетки рассеивают (клонировуют) таким образом, чтобы в лунке панели для микрокультивирования оказалась только одна клетка, дающая начало клону. После размножения клеток оценивают их способность синтезировать нужные антитела (проводят скрининг). Клонирование повторяют. В конечном итоге выбирают стабильный клон, продуцирующий антитела заданной специфичности.

Клетки гибридомы можно длительно хранить в замороженном состоянии (в жидком азоте). Моноклональные антитела выделяют либо из культуральной жидкости (клетки гибридомы выращивают *in vitro*), либо из асцитической (выращивание *in vivo*).

Моноклональные антитела используют для диагностики инфекционных болезней в иммуноферментном, радиоиммунном и иммунофлуоресцентном анализах.

**Лиофилизация микроорганизмов (биологических препаратов).** Используют с целью длительного хранения микроорганизмов и биопрепаратов.

Этот метод заключается в обезвоживании биологических объектов при низких температурах под вакуумом, т. е. вода удаляется из замороженного материала путем испарения льда, минуя жидкую фазу. Лиофилизированные биопрепараты сохраняют длительное время свои первоначальные свойства и легко растворяются в воде.

Лиофильная сушка биопрепаратов включает в себя следующие этапы:

Жидкие биопрепараты, разлитые по ампулам или флаконам, замораживают при температуре  $-40\dots-60$  °С.

Замороженные препараты переносят в сушильную камеру и создают глубокий вакуум.

Ампулы или флаконы быстро запаивают или закупоривают, предварительно создавая в них вакуум, или заполняют инертным газом.

*Законспектировать материал и отправить на эл.почту преподавателя : [torhova1958@yandex.ru](mailto:torhova1958@yandex.ru)*