

Міністерство освіти і науки України  
Чернівецький національний університет  
імені Юрія Федьковича

# **Основи вірусології**

**Навчально-методичний посібник з  
лабораторного практикуму**

*Видання друге, перероблене*

**Укладачі: І. О. Шмараков, О. В. Кеца**

Харків-Мачулін  
2015

**УДК 578(076.5)**  
**ББК 28.3я7**  
**О-751**

Друкується за ухвалою редакційно-видавничої ради  
Чернівецького національного університету  
імені Юрія Федьковича

**Основи вірусології** : навч.-метод. посібник з лаб.  
О-751 практикуму / уклад. І.О. Шмараков, О.В. Кеца. – 2-е видання,  
перероблене. – Харків : Мачулін, 2015. – 160 с.

У навчальному посібнику викладено загальні відомості про методи роботи з вірусами людини, тварин, рослин і бактерій, представлені сучасні методи діагностики вірусних інфекцій.

Для студентів вищих навчальних закладів, аспірантів, наукових працівників і спеціалістів у галузі біології, біохімії та біотехнології.

**УДК 578 (076.5)**  
**ББК 28.3я7**

© І. О. Шмараков, 2015  
© О. В. Кеца, 2015

## ПЕРЕДМОВА

Навчальний посібник підготовлений згідно з програмою нормативного курсу «Вірусологія» для студентів денної та заочної форм навчання біологічних спеціальностей університетів і має за мету допомогти студентам опанувати базові засади молекулярно-генетичної організації вірусів, способів взаємодії вірусів між собою та клітинами, методів діагностики вірусних інфекцій та особливостей противірусної хіміотерапії.

Для полегшення сприйняття та опрацювання значного обсягу фактичного матеріалу в навчальному посібнику вся інформація поділена на розділи. Кожний розділ містить теоретичний матеріал, та завдання лабораторних занять зі схемами та електронними мікрофотографіями, виконуючи які студент самостійно набуває власного елементарного наукового досвіду, підтверджує та закріплює отриманні теоретичні засади. Посібник допоможе краще засвоїти як лекційний матеріал, так і матеріал, який вони отримують при самостійному вивченні з додаткової літератури. В цьому і полягає оригінальність та цінність даного видання, оскільки отримання теоретичних знань нерозривно пов'язано з практикою.

Структурованість теоретичного та практичного матеріалу передбачає поетапну роботу студента, дає змогу перевірити свої знання з вірусології та зробити об'єктивний висновок про їх загальний рівень.

Опрацювання навчального посібника полегшить засвоєння програми з курсу «Вірусологія».

## ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У ВІРУСОЛОГІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЯХ

*Основні правила організації вірусологічної лабораторії* базуються на загальних біологічних властивостях вірусів як неклітинної форми життя.

Віруси є автономними генетичними структурами, які можуть функціонувати та репродукуватися в сприйнятливих до них клітинах; мають субмікроскопічні розміри, облігатні внутрішньоклітинні паразити.

Ці визначення відображають дві суттєві властивості вірусів: по-перше, наявність у вірусу свого генетичного матеріалу, який використовує біохімічний апарат клітини-господаря, та, по-друге, існування у вірусів позаклітинної інфекційної фази, яка представлена спеціалізованими частками, або *віріонами*, які репродукуються під генетичним контролем даного вірусу і слугують для введення геному вірусу в інші клітини. Перша властивість наголошує внутрішньоклітинний паразитизм вірусу, однак він властивий не лише вірусам. У визначенні вірусів підкреслюється особлива природа паразитизму, який можна назвати паразитизмом на генетичному рівні. Виходячи з цього, по-перше, робота з вірусами має проводитись у стерильних умовах, а по-друге, улаштування сучасної вірусологічної лабораторії має максимально забезпечувати ефективні заходи щодо запобігання виходу вірусів в оточуюче середовище і зараження персоналу та населення вірусними інфекціями.

При роботі у вірусологічній лабораторії треба суворо дотримуватися правил *асептики* та *антисептики*.

*Асептика* – система профілактичних заходів та прийомів, які попереджають попадання мікроорганізмів та вірусів з оточуючого середовища в організм людини і досліджуваний матеріал, і спрямовані на створення безмікробних умов для запобігання зараженню. Вона передбачає використання стерильних інструментів та матеріалів, обробку рук, дотримання особливих санітарно-гігієнічних правил та прийомів роботи.

*Антисептика* – комплекс заходів, спрямованих на хімічне та біологічне знешкодження хвороботворних та інших мікроорганізмів та вірусів, щоб запобігти зараженню при

попаданні на ушкоджені і неушкоджені ділянки шкіри та слизових оболонок.

При роботі з вірусомісним матеріалом необхідно забезпечити виконання таких вимог:

- не допускати виходу вірусів у зовнішнє середовище;
- запобігати контамінації вірусів сторонньою мікрофлорою;
- забезпечити особисту безпеку роботи.

Розподіл вірусів на групи за ступенем їхньої небезпеки для людини дозволяє розділити лабораторії на категорії в залежності від того, з якою групою (чи групами) вірусів ведеться робота в тій чи іншій лабораторії.

Для забезпечення можливості роботи з вірусами, що належать за ступенем небезпеки до різних груп, необхідні універсальні багатопрофільні лабораторії.

Всесвітня Організація Охорони Здоров'я запропонувала розділити вірусологічні лабораторії на 3 категорії:

1) базові лабораторії (основні або загального типу); у зв'язку з конкретними особливостями роботи вони можуть бути обладнаними різними захисними засобами та устаткуванням. Це – лабораторії учбові, служби охорони здоров'я, лікарень, діагностичні лабораторії, університетські лабораторії. В них працюють зі збудниками інфекції III (віруси лімфоцитарного хориомеїнігиту, грипу, поліомієліту, вісповакцини, енцефаломіокардиту) та IV груп (ентеровіруси, риновіруси, аденовіруси, коронавіруси, реовіруси, віруси парагрипу, епідемічного паротиту, кору, червоної висипки, везикулярного стоматиту, герпесу, вітряної віспи, цитомегалії людини), вірусами рослин та бактерій.

2) Режимні лабораторії (ізольовані) або лабораторії утримання. Це спеціальні діагностичні лабораторії, де працюють зі збудниками інфекцій II групи, а саме арбовірусами, аренавірусами, які не увійшли в I групу, вірусами сказу (дикий штам) та натуральної віспи, вірусами гепатитів B та C, ВІЛ.

3) Лабораторії особливого режиму (максимально ізольовані) або лабораторії максимального утримання. Це лабораторії для роботи з особливо небезпечними патогенними вірусами I групи, такими як: віруси геморагічних лихоманок Ебола та Марбург

(родина філовірусів), Ласса, Хунін та Мачупо (родина аренавірусів).

Незалежно від того, до якої категорії відноситься та чи інша лабораторія, проводиться зонування приміщень з метою групування їх в самостійні зони з однаковими рівнями реально присутніх або потенційно можливих професійних ризиків для розподілення цих зон між собою та ізоляції їх від зовнішнього середовища необхідними бар'єрами. Розподіл приміщень за зонами дозволяє найбільш доцільно проводити їх знезараження, цільову санітарну обробку персоналу, обробку використаного спецодягу та інших засобів індивідуального захисту, матеріалів та предметів, що передаються між зонами.

Структура вірусологічної лабораторії визначається завданнями та особливостями її діяльності. Проте існує загальний для всіх лабораторій мінімум вимог, без яких неможливе проведення вірусологічних досліджень.

Вірусологічну лабораторію треба розташовувати в місцях, де відсутня вібрація будинку, яка може призвести до неспроможності працювати з мікроскопами, оптичними та аналітичними приладами. Не можна розміщувати лабораторію поблизу димових труб, котелень, місць, де можливе забруднення повітря пилом або хімічно активними газами. Це може руйнувати точні прилади, утруднюючи при цьому проведення досліджень.

Вірусологічну лабораторію слід розташовувати у світлому ізольованому приміщенні з окремими входом та виходом.

Площа лабораторії повинна відповідати санітарній нормі – 14м<sup>2</sup> в середньому на одного працівника. Приміщення повинні бути достатньо просторими для безпечного проведення лабораторних досліджень з шириною проходів до робочих місць 1,5 м.

В структурі базової вірусологічної лабораторії обов'язковими є такі підрозділи: мийна, стерилізаційна та препаратурська кімнати, кімнати для вирощування культур клітин, для серологічних досліджень, віварій. В залежності від умов роботи вірусологічної лабораторії, доцільно мати термальні та морозильні кімнати. Мийна кімната площею біля 10 м<sup>2</sup>, з розрахунку 5 м<sup>2</sup> на одного працівника, повинна мати прилади

для миття посуду та прання білизни, раковини з гарячою та холодною водою, столи газові та електричні плити, сушильні шафи. Посуд та інструментарій, забруднені інфекційним матеріалом, миють після знезараження дезінфекційними речовинами.



***Ламінарний бокс для проведення маніпуляцій з дотриманням стерильності***

В стерилізаційній кімнаті розташовані дистиллятор, автоклав, парові стерилізатори, сушильні шафи та інша апаратура для сушіння та стерилізації посуду, інструментарію, одягу, живильних середовищ, води, буферних розчинів. Для кожного парового стерилізатора за правилами техніки безпеки треба відводити площу 7,5 м<sup>2</sup>.

Препараторська кімната призначена для зберігання посуду, діагностичних препаратів, хімічних реактивів.

Віварій (приміщення для утримання тварин) повинен мати карантинний відділ, кімнати (ізольовані одна від одної з окремими виходами) для здорових та інфікованих тварин з витяжними шафами, для миття та дезінфекції кліток, інвентарю та спецодягу, приготування кормів, кладову, кремаційну та інші.

Кімнати, призначені для роботи з вірусами, повинні мати добре природне і штучне освітлення. Вікна повинні виходити на північ або бути зробленими з матового або молочного скла, оскільки віруси інактивуються прямим сонячним світлом. Ці кімнати повинні складатися з двох відділень – боксу площею не менше 9 м<sup>2</sup> та передбокснику площею біля 4 м<sup>2</sup>, розділених скляною перегородкою з розсувними, а не на петлях, дверима, для економії площі та для того, щоб уникнути коливань повітря та запобігти зайвому попаданню повітря в бокс.

### ***Обладнання вірусологічних лабораторій***

Крім устаткування та посуду, який використовується в бактеріологічній та хімічній роботі, у вірусологічних лабораторіях обов'язкова наявність спеціального обладнання.

Для тривалого зберігання в незмінному стані вірусовмісного матеріалу, розчинів, сироваток, вакцин, антигенів тощо, необхідно мати холодильні установки з інтервалом температури від +4°C до -170°C. Це камери глибокого та надглибокого заморожування (-30°C, -170°C), холодильні камери (-20°C), холодильники (+4°C), холодильні кімнати з внутрішньою температурою до +4°C. Для інкубування курячих ембріонів та культур клітин необхідні термостати (сухоповітряні та водяні). Вірусологічній лабораторії необхідні центрифуги на 1500 – 3000 об/хв для осадження великих часток подрібненого вірусологічного патологічного матеріалу та трипсинізації тканин. Повна очистка вірусів від баластних речовин та їх концентрація здійснюється за допомогою високошвидкісних центрифуг на 30 000 об/хв і більше з пристроями для охолодження та створення вакууму в робочій камері.

Для зараження та розтину лабораторних тварин та курячих ембріонів і для відбору вірусовмісного матеріалу потрібний



набір різних спеціальних інструментів – шприци різних розмірів (туберкулінові на 1 мл, Люера на 2, 5, 10, 20 мл), голки, шпатель, скальпелі, пінцети анатомічні та хірургічні, ножиці, корнцанги тощо.

Для подрібнення патологічного матеріалу використовують гомогенізатор тканин, фарфорові ступки з товчачиками.

У вірусологічній лабораторії в достатній кількості повинні бути емальовані відра, тази, металеві бокси, бактеріальні фільтри, скляний посуд (бажано з боросилікатного скла), матраси, чашки Карреля, пробірки Лейтона та інший скляний та пластмасовий посуд для вирощування культур клітин, флакони, склянки, колби різного об'єму зі шліфами та без них, круглодонні та плоскодонні, конічні (Ерленмейєра), круглі (Кольрауша), з патрубками (Бунзена – для відсмоктування, Вюрца – для дистиляції), мензурки, бюретки, фарфорові тиглі, чашки Петрі, градуйовані піпетки різного об'єму (1, 2, 5, 10 мл), піпетки Мора, Пастера, мікропіпетки, флакони з пробками, що загвинчуються та притираються, пробірки хімічні, біологічні, серологічні, бактеріологічні, центрифужні, автоматичні (смплери), ампули різних розмірів, ексікатори, воронки, мірні циліндри.

Для постановки серологічних реакцій необхідні полістиролові планшети. В лабораторіях такого типу повинні бути різні терези: хімічні, аналітичні, торсійні, центрифужні для зрівноваження пробірок. Необхідним обладнанням є мікроскопи різних типів: біологічний світловий, біологічний інвертований, біологічний біокулярний, біологічний стереоскопічний, люмінесцентний, електронний.

В лабораторії у достатній кількості мають бути різні металеві та пластмасові штативи для пробірок, гумові пробки з силіконової та звичайної гуми різних розмірів (№№ 11,12,14), олівці або чорнила для скла, фільтрувальний папір, лейкопластир, тощо.

Значна кількість всього описаного обладнання використовується у стерильному вигляді. Для цього, згідно різних методів обробки інструментарію та посуду, піддають чистці, миттю, дезінфекції та стерилізації.

Сучасні вірусологічні лабораторії мають необхідні прилади

та устаткування для проведення експрес-діагностики вірусних інфекцій, а саме імуноферментного аналізу, імунофлуоресцентного аналізу, імуноелектроблотингу, електронної мікроскопії, імуноелектронної мікроскопії, полімеразної ланцюгової реакції.

### ***Правила роботи в учбових вірусологічних лабораторіях***

1. Вхід у вірусологічну лабораторію дозволяється лише особам, які пройшли інструктаж по техніці безпеки.
2. Працювати дозволяється лише у спецодязі.
3. Не дозволяється ходити і розмовляти під час роботи з вірусним матеріалом.
4. Категорично забороняється приносити особисті речі, палити, приймати їжу та зберігати продукти і воду, користуватися косметикою.
5. Проводити відсмоктування інфекційного матеріалу тільки за допомогою автоматичних та напіваавтоматичних піпеток чи гумових балонів. Категорично забороняється всмоктувати в піпетку досліджуваний матеріал ротом.
6. Для виключення випадкових уколів вміло та обережно користуватися шприцами та голками під час зараження курячих ембріонів та лабораторних тварин.
7. Після закінчення роботи використані предмети, (піпетки, шпателі, предметні та накривні скельця тощо) помістити в дезінфікуючий розчин на 1 добу, після чого промити та прокип'ятити.
8. Посуд з використаними живильними середовищами, кров'ю, мокротинням та іншим інфікованим матеріалом зібрати в банки і продезінфікувати в автоклаві (30 хв при 1,5 атм) або обробити дезінфікуючим розчином, прокип'ятити чи спалити.
9. Після заняття обов'язково помити руки та при необхідності продезінфікувати їх спиртом.
10. Забороняється викидати та виливати відходи у каналізаційну мережу.
11. При аварії під час роботи з вірусовмісним матеріалом обов'язково попередити викладача або лаборанта.

## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1

### Тема: Структурний аналіз віріонів різних систематичних груп

**Мета:** ознайомитися з особливостями молекулярно-генетичної структури вірусів, основними принципами класифікації та номенклатури вірусів.

**Компетенції:** розуміти особливості типів упакування вірусних капсидів та молекулярну архітектуру віріонів; знати типи симетрії віріонів та вміти визначати систематичну належність вірусу за морфологічними характеристиками віріону.

### I. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Основа таксономії вірусів – *віріон*, який являє собою кінцеву фазу розвитку вірусу. Його можна розглядати як систему доставки вірусних генів, яка забезпечує захист вірусного геному та його проникнення у клітину, де він реплікується й упаковується в нові віріони. Вірусний геном упакований у білкову структуру, яка називається *капсид* (від гр. *capsa* – ящик). Для багатьох вірусів капсид і геном, що міститься у ньому, складають віріон. Такі віруси належать до групи простих вірусів. У інших вірусів можлива наявність ліпідної оболонки та іноді додаткового шару білка, які разом оточують структуру, яка позначається як *нуклеокапсид*. Більшість вірусів тварин оболонкові, у тому числі всі віруси зі спіральною симетрією (наприклад, вірус грипу) та значну частину вірусів із кубічною (наприклад, герпесвіруси). Оболонкові віріони менш поширені серед вірусів, які інфікують рослини, й вони надзвичайно рідкісні серед вірусів, які інфікують прокаріот. Віріони більшості оболонкових вірусів сферичні за формою. Наприклад, ортоміксовіруси, параміксовіруси та коронавіруси організовані так, що їхній віріон із паличкоподібним спіральним нуклеокапсидом завдяки ліпопротеїновій оболонці має сферичну форму.

Самозбирання віріонів відбувається з використанням

*спіральної та кубічної симетрії*. При кубічній симетрії внаслідок того, що білкові молекули мають неправильну (нерівну) форму і самі по собі не є рівносторонніми трикутниками, найпростіший ікосаедричний капсид повинен бути побудований з трьох типів ідентичних субодиниць, які б формували трикутні поверхні. Це означає, що необхідно 60 ідентичних субодиниць для побудови повного капсиду. Водночас у багатьох випадках аналіз показав, що вірусні капсиди містять більш, ніж 60 субодиниць, що вказує на складнішу систему побудови віріону, ніж подано вище. Ікосаедр, побудований з 60 ідентичних субодиниць, дуже стабільний, оскільки всі субодиниці еквівалентно зв'язані між собою (вони мають однакову відстань один щодо іншого, й кожна субодиниця знаходиться у стані з мінімальною вільною енергією). У 1962 році Каспар і Клуг запропонували ідею *квазі-еквівалентності*, яка полягає в тому, що субодиниці у практично однаковому локальному оточенні формують майже еквівалентні зв'язки зі своїм оточенням, забезпечуючи самозборку ікосаедричних капсидів з багатокомпонентних (багатогранних) субодиниць. Вони визначали усі можливі багатогранники як структурні одиниці. Ікосаедр має 20 еквілатеральних трикутних поверхонь, і тому кількість структурних одиниць завжди буде  $20T$ , де  $T$  – *триангуляційне число*, яке визначається за формулою:

$$T = Pf^2, \text{ де}$$

$P$  ( $= h^2 + hk + k^2$ , де  $h$  та  $k$  – будь-які цілі невід'ємні числа) може бути будь-яке число з ряду 1,3,7,13,19,21,31;

$f$  – будь-яке ціле число.

З цього випливає, що  $T$  може бути 3, 4, 7, 9, 12, 13, 16, 19, 21, 25, 27, 28 і так далі. При  $P=1$  або 3 утворюються правильні ікосаедри, а всі інші величини  $P$  будуть характерні для «викривлених» ікосаедрів.

До складу будь-яких ікосаедрів будуть входити 12 пентамерів та  $10(T-1)$  гексамерів.

**II. ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ  
РОБОТИ**

*Дайте визначення основним поняттям і термінам:*

*Вірус.....*

*Віріон.....*

*Капсид.....*

*Нуклеокапсид.....*

*Капсомер.....*

*Пентамер.....*

*Гексамер.....*

*Спіральна симетрія.....*

*Кубічна симетрія.....*

*Триангуляційне число.....*

*Вірусна оболонка.....*

*Штам.....*

*Серотип.....*

*Віроїд.....*

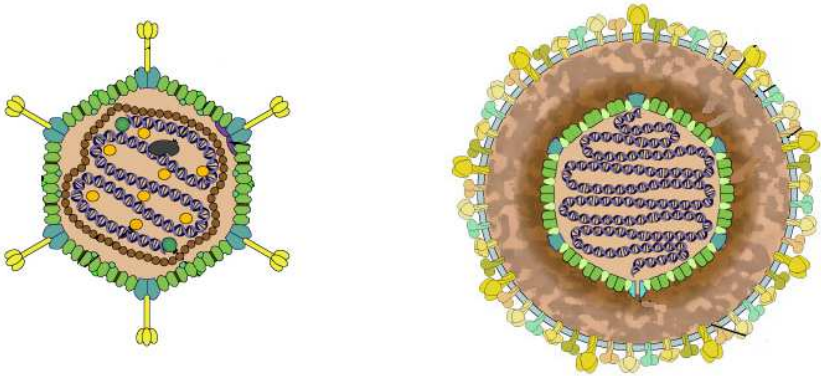
*Сателіт.....*

*Пріон.....*

### III. ПРАКТИЧНА ЧАСТИНА

**Завдання 1. За хімічним складом та за структурою віріону віруси поділяються на прості і складні.**

1.1. Розгляньте схематичні зображення віріонів простих і складних вірусів. Зазначте відомі вам структури віріонів та наведіть їх назви.



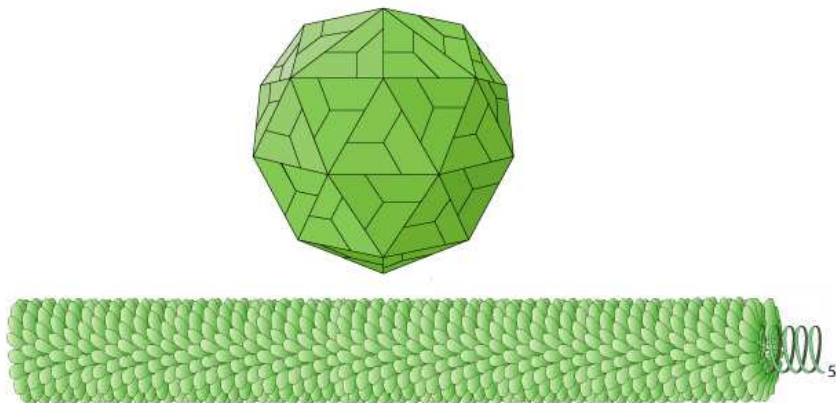
1. \_\_\_\_\_
2. \_\_\_\_\_
3. \_\_\_\_\_
4. \_\_\_\_\_
5. \_\_\_\_\_
6. \_\_\_\_\_
7. \_\_\_\_\_
8. \_\_\_\_\_
9. \_\_\_\_\_
10. \_\_\_\_\_

1.2. Заповніть таблицю, зазначаючи родину і типового представника простого чи складного вірусу:

<i>Прості віруси</i>		<i>Складні віруси</i>	
<i>Родина</i>	<i>Типовий представник</i>	<i>Родина</i>	<i>Типовий представник</i>

**Завдання 2. За типом упакування білкових субодиниць капсиду розрізняють віруси зі спіральною та кубічною симетрією.**

2.1. Розгляньте схематичні зображення віріонів з кубічною та спіральною симетріями.



Заповніть таблицю, даючи порівняльну характеристику вірусів зі спіральною та кубічною симетрією:

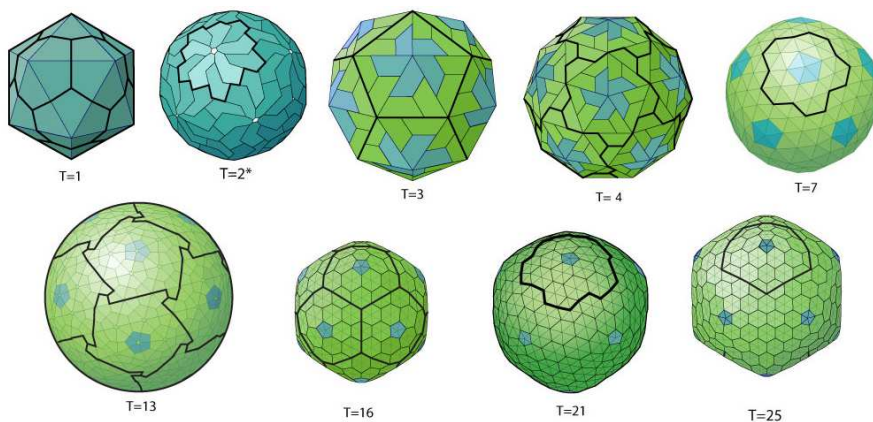
<i>Ознака</i>	<i>Спіральний тип симетрії</i>	<i>Кубічний тип симетрії</i>
Кількість варіантів самозбирання		
Взаємодія між білком та нуклеїновою кислотою		
Площа поверхні віріону		
Звільнення геномної нуклеїнової кислоти		

2.2. Заповніть таблицю, зазначаючи родину і типового представника вірусів зі спіральною та кубічною симетрією:

<i>Віруси зі спіральною симетрією</i>		<i>Віруси з кубічною симетрією</i>	
<i>Родина</i>	<i>Типовий представник</i>	<i>Родина</i>	<i>Типовий представник</i>

**Завдання 3. Кількісною характеристикою ікосаедричних капсидів є триангуляційне число.**

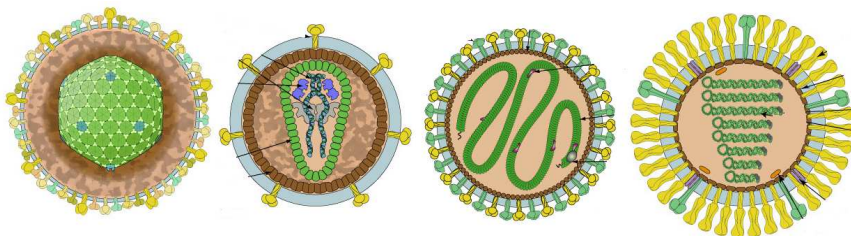
3.1. Розгляньте схематичні зображення ікосаедричних віріонів з різними триангуляційними числами.







таблицю, зазначаючи родину, типового представника, тип симетрії та форму віріона відповідних вірусів:



<i>Родина</i>	<i>Типовий представник</i>	<i>Тип симетрії</i>	<i>Форма віріону</i>

**Завдання 5. Структурні форми віріонів поділяють на п'ять основних груп.**

Наведіть назви груп структурних форм віріонів, зазначаючи родини і типових представників вірусів, які належать до вказаних груп.

	<i>Структурна форма</i>	<i>Родина</i>	<i>Типовий представник</i>
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			



## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2

### Тема: Методи дослідження вірусів. Використання лабораторних тварин у вірусології

**Мета:** ознайомитися з основними методами дослідження вірусів, способами культивування вірусів, детекції їх основних компонентів та інфекційності.

**Компетенції:** знати і вміти визначити характер цитопатичної дії вірусів, ідентифікувати тип вірусної інфекції, обирати метод культивування та ідентифікації вірусу.

**Матеріальне забезпечення:** Лабораторні тварини (лабораторні миші), разові гумові рукавички, барвники для кольорового маркування тварин (водні розчини пікринової кислоти та фуксину), ефір, вата, ексикатори, пінопластові або парафінові дошки та голки для фіксації тварин, 2% спиртовий розчин йоду, скляні палички, 75% етанол, стерильні шприци на 2 мл з голками, фізрозчин, вата, піпетки Пастера, стерильні інструменти (ножиці, пінцети, корнцанги, скальпелі), склянки для інструментів з дезрозчином, стерильні чашки Петрі для секційного патологічного матеріалу, пакети для сміття (бажано такі, що герметично закриваються), мило, рушник.

### I. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Не зважаючи на велике різноманіття експериментальних об'єктів, головними серед них у вірусології залишаються лабораторні тварини, курячі ембріони, культури тваринних та рослинних клітин, рослини-індикатори та бактеріальні культури. Відповідно, при дослідженні вірусів людини та тварин найчастіше застосовуються модельні системи із залученням лабораторних тварин, курячих ембріонів та культур тваринних клітин.

**Модельними об'єктами** (експериментальними або тест-об'єктами) називаються макроорганізми або культури клітин (в тому числі, мікроорганізмів), чії властивості є достеменно відомими і постійними для представників одного виду (у випадку культури клітин - штаму, популяції або лінії), що

дозволяє їх використовувати для дослідження особливостей патогенів невідомої природи.

### **Використання лабораторних тварин**

В організмі експериментально уражених тварин зазвичай вірус накопичується, що може бути використано в подальшому для його дослідження. Для виділення вірусів придатні лише ті тварини, в яких зараження призвело до чітких клінічних проявів інфекції, патоморфологічних змін або її загибелі. Таких тварин добирають емпіричним шляхом у ході вивчення кожної вірусної інфекції.

Здавна лабораторних тварин використовують для індикації вірусів у патологічному матеріалі, тобто для постановки **біопроби**. З цією метою суспензією патологічного матеріалу уражують лабораторних тварин та враховують реакцію на ураження. Часто ознаки присутності вірусу в організмі бувають малоспецифічними, тобто помітно, що вірус є (можна провести **індикацію** вірусу), але не можна зробити висновок про те, який саме це вірус (не можна провести **ідентифікацію** збудника). Прикладом можуть слугувати типові симптоми ураження верхніх дихальних шляхів дослідних тварин, які можуть індукуватися як аденовірусами, так і ортоміксо-, параміксо-, герпес-, риновірусами. Однак бувають випадки, коли біопроба супроводжується характерними клінічними проявами, які є специфічними для конкретного захворювання. В такому випадку можна зробити висновок не лише про наявність вірусу, але й про його видову приналежність.

Лабораторних тварин також застосовують в якості індикатора вільного вірусу при постановці реакції **біологічної нейтралізації**.

У лабораторіях часто є потрібним підтримання вірусів протягом багатьох років в активному стані. По суті, підтримання вірусу є чергуванням пасажів вірусу на живих системах, в тому числі на лабораторних тваринах, та його збереженні в законсервованому стані. При будь-якому способі консервації віруси з тою чи іншою швидкістю втрачають свою активність. Новий пасаж дозволяє її відновити. Під **пасажем** розуміють зараження чутливої тварини з метою отримання від

неї нової популяції вірусу. Такий вірус в подальшому знову зберігають у консервуючих умовах.

При роботі з вірусом потрібно також знати його *інфекційний титр*, тобто його відносну концентрацію у матеріалі (під титром також розуміють таку мінімальну концентрацію вірусу, яка ще здатна викликати позитивну реакцію у 50% тест-об'єктів). Титр можна визначити за допомогою ураження чутливих модельних об'єктів різними розведеннями вірусомісного матеріалу. Іншими способами вираження відносної концентрації вірусу є інфекційна доза-50 ( $ID_{50}$ ), летальна доза-50 ( $LD_{50}$ ) та деякі інші. Відповідно до визначення титру,  $ID_{50}$  є такою дозою вірусу, яка викликає специфічні прояви інфекційного захворювання у 50% інфікованих дослідних тварин. Аналогічно,  $LD_{50}$  є такою дозою вірусу, що індукує загибель 50% інфікованих дослідних тварин.

### **Маркування лабораторних тварин**

При виконанні вірусологічних досліджень виникає необхідність мітити тварин для їх подальшого впізнання протягом експерименту. Запропоновано цілий ряд методичних прийомів мічення, а саме: татуювання, використання радіопередавачів, мічених атомів, різнокольорових фарб, тощо.

1) Татуювання вух у злегка наркотизованих тварин, що мають достатньо великі непігментовані вушні раковини (кролики, собаки, тхорі) голландською сажею чи китайською тушшю з допомогою спеціальних татуювальних щипців або голок. Татуювання використовують також для мічення мавп на внутрішньому боці верхньої третини стегна.

2) Татуювання шляхом нанесення надрізів та насічок на достатньо великих вушних раковинах з допомогою ножиць та проколів компостерними щипцями (кролі, мурчаки, свині).

3) Вистригання шерсті на спині та стегнах у мавп, кроликів, тхорів, хом'яків, кішок. Цей спосіб непрактичний, тому що може використовуватись тільки при короткочасному досліді (шерсть через тиждень відростає).

4) Мітка описом характерних природних плям на поверхні тіла, коли за забарвленням шерсті одна тварина відрізняється від іншої того ж виду (мурчаки).

5) Клеймування тварин з використанням металевих жетонів, бляшок, кілець з м'якої білої жерсті зі штампованими номерами, які наносяться штампом, чи спеціальними чорнилами (до 10 мл насиченого розчину мідного купоросу додається 2 мл концентрованої сірчаної кислоти). Бляшки надягають кроликам на корінь вуха та вставляють мурчакам, як сережку, у вушну раковину. Курям прикріплюють кільце на лапу або бірку на крило. Великим твариною одягають нашійник з номерами на металевих жетонах. При використанні цього методу клеймування потрібно слідкувати за поведінкою тварин. Якщо предмет, застосований для мітки, дратує тварину, і протягом тривалого часу вона намагається його зняти, то це необхідно зробити експериментатору, а надалі використовувати інший спосіб маркування. У іншому разі ці тварини відгризають лапку разом з бляшкою чи кільцем.

6) Для маркування ембріонів багатоплідних тварин (мишей, пацюків) використовують введення під шкіру спеціальної забарвленої маркувальної маси (до 10 г безводного ланоліну додається 3 г чорної туші та 0,5 мл розчину антибіотику (пеніцилін або інший 5000 ОД)), яка шприцом з гострою голкою та жорстким мандреном (для штовхання маси через голку) вводять під шкіру ембріону на спині. Мітка після народження дитинчати добре помітна у вигляді плями чи смуги.

7) Кольорове маркування здійснюють шляхом нанесення різнокольорових плям на ділянки тіла тварини (альбіноси мишей, пацюків та кролів) за певними схемами. Використовують анілінові барвники: 0,5% розчин карболового фуксину (червоний колір означає одиниці), насичений розчин пікринової кислоти (жовтий колір означає десятки), 0,5% розчин малахітового зеленого (зелений колір означає сотні), 0,5% розчин генціану фіолетового (фіолетовий колір означає тисячі). Однією фарбою можна помітити 9 тварин, двома - до 100, трьома - до 1 000, чотирма - до 10 000. Фарби наносять на непігментовану шерсть у вигляді крапель, кружечків чи смуг на спину та по боках тварини.

Для кольорового маркування за *методом Тойффеля* потрібний тільки один барвник для позначки 1 000 тварин. Подумки треба уявити спину тварини, розділену на 9 рівних

частин, утворених трьома поздовжніми та трьома поперечними смугами. Ліва смуга використовується для позначення сотень, середня - для позначки десятків, а права - одиниць. Позначки у вигляді плям та смуг наносяться за певною схемою.

Загальним недоліком методів кольорового позначення є нестійкість барвників під час тривалих дослідів - вони знебарвлюються. Найкращим є пікринова кислота, що тримається на шерсті тварин протягом 2-3 місяців.

### **Наркоз тварин**

Перед зараженням тварин застосовують загальний наркоз або місцеве знеболювання. Для наркозу мишей, хом'яків, мурчаків, тхорів, курей, кроликів та собак використовують ефір та хлороформ, для пацюків та котів - ефір (внаслідок того, що вони погано переносять хлороформ). Техніка введення наркотизуючих речовин полягає в інгаляції в замкненому просторі, або ж безпосередньо змоченим ватно-марльовим тампоном поблизу носової чи ротової порожнини.

Перед ефірним наркозом собакам та іншим великим тваринам необхідно заздалегідь ввести анальгетик для зняття переднаркотичного збудження, наприклад, 1%-й розчин пропафеніну в дозі 0,2 мл на 1 кг живої ваги інтрамускулярно. Через 30 хв інтравенозно вводять тіопентал в кількості 20 мг на 1 кг живої ваги. Для більш тривалого наркозу (30-45 хв) можна використовувати 10%-й розчин хлоралгідрату. Метод введення для мурчаків інтраперітонеальний у дозі 0,5 - 0,75 мл, для курей, котів та кроликів - інтравенозний в дозах 0,2-0,4 мл та 3 мл, відповідно. Мавп наркотизують тіопенталом у вигляді 5%-го розчину інтрамускулярно в дозі 1-2 мл на тварину або у вигляді 2,5%-го розчину в кількості 1,5-2 мл на тварину.

Місцеву анестезію проводять 1%-м розчином кокаїну, 5%-м розчином новокаїну по 0,5 г. Для збільшення тривалості анестезії до розчину новокаїну чи кокаїну додають 2-5 крапель розчину адреналіну у концентрації 1:1000. Для анестезії слизових оболонок носа, очей, порожнини рота чи прямої кишки використовують 5%-й розчин кокаїну.

Потрібно пам'ятати, що щури погано переносять хлороформ; тхорі – надто чутливі до ефіру, і незначне передозування веде до



їхньої загибелі. При використанні наркотизуючих речовин треба дотримуватися обережності: у дрібних лабораторних тварин після наркозу часто спостерігається набряк легень і загибель.

### **Зараження лабораторних тварин. Методи.**

Вибір методу ураження визначається тропізмом вірусу. Під **тропізмом** розуміють здатність вірусу реплікуватися в певних типах клітин організму. Віруси, що репродукуються у нервових клітинах, називають *нейротропними* (наприклад, вірус сказу), у клітинах шкіри - *дерматропними* (вірус віспи), в клітинах легень та дихальних шляхів - *пневмотропними* (вірус грипу), в клітинах шлунково-кишкового тракту - *ентеротропними* (вірус гепатиту А). Віруси, які здатні реплікуватися в декількох типах клітин, називають *політропними* (вірус інфекційного ринотрахеїту великої рогатої худоби - клітини органів дихання та розмноження), а в усіх типах клітин - *пантропними* (вірус чуми собак). Така класифікація вірусів за тропізмом називається класифікацією вірусів людини та тварин за Хюбнером.

Знаючи тропізм вірусу, матеріал вводять в органи, які містять чутливі до даного вірусу клітини (табл.). Наприклад, вірус грипу вводять в дихальні шляхи інтраназально (через ніс), вірус віспи у шкіру - субкутанно, кутанно або перкутанно (підшкірно, внутрішньошкірно та на шкірно, відповідно), вірус сказу у мозок - інтрацеребрально. Пантропні віруси швидше поширюються по організму при їх введенні внутрішньовенно або внутрішньочеревинно. Якщо тропізм вірусу невідомий, то використовують декілька груп тварин для ураження різними методами. При цьому в залежності від способу зараження тварини одним і тим самим вірусом використовується різний об'єм вірусомісної суспензії.

Для зниження природної резистентності тварин перед зараженням можна опромінювати рентгенівськими променями (мишей - 300 Р, мурчаків - 250-300 Р, білих щурів - 120 Р, кроликів - 600 Р) або обробляти кортизоном (5-10 мг/кг). Ці прийоми прискорюють репродукцію вірусів в організмі тварин та полегшують їх виділення та типування.

**Зв'язок тропізму вірусу зі способом ураження чутливого організму  
та видом патологічного матеріалу**

<b>Група вірусів за тропізмом (класифікація за Хюбнером)</b>	<b>Приклад вірусу</b>	<b>Метод ураження</b>	<b>Вид патологічного матеріалу</b>
<b>Пневмотропні</b>	Віруси грипу, парагрипу, аденовіруси, риновіруси	Інтраназальний (аспіраційний)	Носоглоткові змиви, шматочки легенів та бронхів*
<b>Нейротропні</b>	Вірус сказу, віруси герпесу	Інтраспінальний Інтрацеребральний Субокципітальний	Кров, спинномозкова рідина, шматочки головного та спинного мозку і периферичних нервів*
<b>Дерматропні</b>	Віруси віспи, вісповакцини, герпесу	Перкутанний Кутанний Інтракутанний Субкутанний Інтравенозний Інтрамускулярний	Ділянки шкіри та слизової оболонки, кров, вміст пустул та везикул
<b>Ентеротропні</b>	Ентеровіруси, вірус гепатиту А	Оральний Ректальний Безпосередньо у шлунок Інтраперіто-неальний	Фекалії, сеча, блювотні маси, шлунково-кишковий тракт з печінкою, селезінкою, жовчним міхуром та підшлунковою залозою*
<b>Пантропні</b>	Вірус чуми собак, вірус поліомієліту	Інтравенозний Інтракардіальний Інтрамускулярний Оральний Інтраназальний Інтраперіто-неальний Субкутанний	Кров, лімфа, змиви носоглотки, спинномозкова рідина, екскрети, секрети, всі органи*

Вірусовмісний матеріал перед введенням лабораторним тваринам підлягає спеціальній обробці для очистки його від грубих часток. Шматочки органів попередньо подрібнюють в гомогенізаторах, в банках зі скляним намистом, в фарфорових чи скляних ступках, потім емульгують, а в ряді випадків і екстрагують. Із розтертих органів готують 10%-ну (чи іншої концентрації) суспензію на фізіологічному розчині з додаванням 10%-ї нормальної сироватки (або без неї), бульйону чи буферного розчину. Приготовану суспензію тканин центрифугують протягом 10-15 хв при 3000-4000 об/хв, і надосадову рідину використовують для зараження лабораторних тварин.

При забрудненні досліджуваного матеріалу бактеріальною мікрофлорою його фільтрують через бактеріальні фільтри, що затримують бактерії, чи додають антибіотики: пеніцилін та стрептоміцин у співвідношенні 1000 ОД на 1 мл інфекційної рідини. Можна додавати і антисептичні речовини (0,25-0,3%-й розчин фенолу, мертиолят натрію 1:10 000, тощо). Слід мати на увазі, що оскільки фільтрація матеріалу через бактеріальні фільтри знижує кількість вірусів внаслідок сорбційних властивостей фільтрів, її здійснюють тільки за достатньої кількості вірусовмісного матеріалу.

Потрібно зауважити, що ураження тварин може здійснюватися з різною метою (накопичення вірусів, пасування, титрування, одержання вакцин, тощо). У всіх вищевказаних випадках введення вірусовмісного матеріалу називається **ураженням лабораторних тварин**, при цьому найчастіше вірусний матеріал вводиться тварині **одноразово**.

Якщо ж метою експерименту є отримання специфічної антисироватки до відповідного вірусу, то в цьому випадку введення вірусовмісного матеріалу називають **імунізацією лабораторних тварин**, при цьому вірус вводиться багаторазово (для отримання кращої імунної відповіді тварини) і обов'язково за певною схемою. Найчастіше, незалежно від тропізму вірусу, перше введення вірусного матеріалу проводиться внутрішньом'язево або ж підшкірно у декілька ділянок (наприклад, з внутрішнього боку всіх кінцівок тварини), а надалі - внутрішньовенно. Перше введення матеріалу робиться внутрішньом'язево та багатоточково з тієї причини, що це

призводить до тривалішого депонування вірусу у місці введення, яке активно стимулює периферичні лімфатичні вузли для вироблення первинної імунної відповіді.

Крім цього, імунізація тварин вірусомісним матеріалом часто здійснюється з додаванням до суспензії вірусу так званих **ад'ювантів** - речовин (або їх сумішей), які додатково стимулюють імунну відповідь тварини. У вірусологічній практиці найбільш широко використовуються **ад'юванти Фрейнда** - повний і неповний. Повний ад'ювант Фрейнда містить різні мінеральні олії та завис інактивованих клітин бактерій *Mycobacterium bovis*. Його можна вводити лише один раз при першому введенні вірусомісного матеріалу (так званій першій імунізації). Повний ад'ювант Фрейнда ні в якому разі не можна вводити тварині внутрішньовенно, оскільки це призведе до ураження крові (сепсису) та загибелі тварини. При наступних імунізаціях використовують неповний ад'ювант Фрейнда, який не містить бактеріальних клітин, а тому може вводитися внутрішньовенно.

Головною вимогою при експериментальному зараженні (імунізації) є виконання його в умовах повної асептики. Для цього використовують стерильний інструментарій, а місце введення інфекційного матеріалу звільняють від волосяного покриву (піддають депіляції) і знезаражують 3%-м розчином йоду. Винятком є два природних методи зараження, а саме інтраназальне та оральне. При кожному методі інфікування з порушенням цілісності шкіри рекомендується після зараження повторно дезинфікувати місце ін'єкції.

#### **Інтраназальне (аспіраційне) зараження**

Цей метод зараження в ніс здійснюється різними шляхами. Найчастіше використовують методику закапування інфекційного матеріалу шприцом чи піпеткою Пастера в кожную ніздру сонній тварині, яка знаходиться під наркозом. При правильно розрахованій дозі наркотичної речовини тварина глибоко втягує (аспірує) матеріал, який попадає в легені. При слабкому наркозі у тварини виникає чхальний рефлекс, тварина поштовхами намагається вивести матеріал з дихальних шляхів, він розбризкується і може інфікувати експериментатора та зовнішнє середовище. При надто глибокому наркозі дихання

тварини стає поверхневим, і матеріал погано втягується в ніздрі. У таких тварин може швидко розвинути набряк легенів, що призведе до їхньої загибелі в першу добу після зараження. Матеріал слід використовувати в малих концентраціях для запобігання виникнення токсичних явищ у тварин.

Друга методика здійснення інтраназального зараження - це введення спеціального зонду з вірусомісним матеріалом в дихальні шляхи, трахею, бронхи. Інша різновидність методу зараження в ніс - це інгаляція матеріалу. Дрібних тварин інфікують в спеціальних герметичних камерах, де створюють в повітрі певну концентрацію вірусу. Великих тварин заражають інгаляційно, використовуючи спеціальні герметичні маски. Розмір часток інфекційного матеріалу не перевищує 2 мкм, через це вони проникають в нижні дихальні шляхи, аж до самих альвеол. Остання методика не дуже зручна внаслідок того, що потрібно багато вірусомісного матеріалу.

#### **Методи зараження через травний тракт**

Зараження лабораторних тварин через травний тракт здійснюється трьома шляхами:

1) **Оральний** спосіб. Досліджуваний матеріал додають до сухого корму чи розчиняють у питній воді, або дають тварині у вигляді пігулок чи желатинових капсул, до складу яких вводять вірусомісний матеріал і харчові продукти. При цьому методі тварин утримують в окремих клітках чи банках і за добу до введення не дають їжі.

2) Матеріал у вигляді водних сумішей можна вводити безпосередньо в шлунок з допомогою різних засобів. Це може бути канюля – скляна трубка з відтягнутим кінцем або шприц з голкою, на якій напаяна на кінці голівка з



***Оральне зараження***

олова, т.зв «олива» Так інфікують, в основному, мишей та пацюків. Для зараження мурчаків та кроликів використовують катетери, а для інфікування мишей, хом'яків, тхорів, пацюків, курей тонкі гумові або металеві зонди діаметром 2-3 мм. Перед введенням гумовий зонд змочують гліцерином або рідким вазеліном. Металевий зонд виготовляють з трохи зігнутої голки для шприца з оливою на кінці. Зонд повинен проходити над язиком ближче до щік по задній стінці глотки по ходу стравоходу.

3) Ректальне зараження лабораторних тварин вірусомісним матеріалом здійснюють через пряму кишку шляхом введення клізми, яка повинна мати температуру тіла тварини. Анальний отвір заклеюють лейкопластирем, завдяки чому прискорюється проникнення матеріалу в організм.

Крім цих методів інфікування лабораторних тварин вірусомісним матеріалом існує значна група методів експериментального зараження, коли введення матеріалу в організм здійснюють, обминаючи шлунково-кишковий тракт.

У вірусологічній практиці існує декілька методів зараження лабораторних тварин, при здійсненні яких об'єктом інфікування є шкіра тварин.

#### **Інтраплевральне зараження**

Метод інфікування лабораторних тварин в плевру. Для цього тварину фіксують в положенні на боці для того, щоб використати простір, який утворився, для введення голки, не побоюючись поранити легеню. Затуплюючи голкою роблять прокол у міжреберний простір.

#### **Перкутанне (нашкірне) зараження**

Цей метод інфікування лабораторних тварин вірусомісним матеріалом, так зване нашкірне зараження, проводять на неушкодженій шкірі тварин. Матеріал втирається в неушкоджену депільовану шкіру стерильним інструментом (кінець стерильної пробірки, фарфоровий товчачик). За даними багатьох дослідників цей метод майже не дає позитивних результатів.

#### **Кутанне (шкірне) зараження**

Це так зване шкірне зараження лабораторних тварин на ушкоджену шкіру, яке здійснюється методом скарифікації. Для

цього вибирають ділянку шкіри, яку тварина не може дістати лапами чи кігтями. Для різних тварин вона різна: спина (миші, мурчаки, пацюки, собаки), плантарна поверхня ступні (миші, хом'яки, мурчаки), бік (кролики), живіт (кролики), груди (кури) та сім'яники (кролики).

На вибраній ділянці шкіри роблять депіляцію та оброблюють її 3%-м розчином йоду. Потім роблять подряпини пером Дженнера чи хірургічною голкою до появи крапель лімфи, але щоб вони не кровоточили. На ушкоджену таким чином ділянку шкіри наносять матеріал краплями і втирають скляною паличкою, лопаткою, шпателем або обстриженою зубною щіткою.

### **Субкутанне (підшкірне) зараження**

Це метод підшкірного інфікування лабораторних тварин. Вибір місця зараження залежить від можливості сформувати складку шкіри на тілі тварини: спина (миші, пацюки, мурчаки, хом'яки, тхорі, кролики), бік (пацюки, хом'яки, мурчаки, кролики), шия (кури), живіт (пацюки, мурчаки, кролики, мавпи), плече (мурчаки, кролики), колінна складка (мурчаки), колінний згин (мурчаки).



### **Субкутанне зараження**

Вибрану ділянку шкіри депілюють, оброблюють 3%-м розчином йоду і трохи піднімають пінцетом або двома пальцями. В основу утвореної складки вколують голку шприца й повільно вводять матеріал. Щоб введений матеріал не вилився назад, потрібно відхилити голку від первинного напрямку трохи вбік під кутом 45°.

### **Інтракутанне (внутрішньошкірне) зараження**

Для інтракутанного (внутрішньошкірного) інфікування місце для ін'єкції готують таким же чином, як і при субкутанному. Дуже тонку гостру голку вводять в товщу депільованої шкіри майже паралельно її поверхні так, щоб голка просвічувалася через епідерміс. При введенні матеріалу поверхневий шар епідермісу трохи піднімається у вигляді пухирця, утворюючи т.зв. «лимонну кірку».



### *Інтракутанне зараження*

### **Інтравенозне (внутрішньовенне) та інтракардіальне (внутрішньосерцеве) зараження**

В залежності від виду та розміру тварини існують різні способи інтравенозного інфікування. Матеріал вводять у хвостову бічну (миші, пацюки), гомілкову внутрішню (мурчаки), вушну крайову (кролики, мурчаки), стегнову, ліктьову, яремну (собаки, поросята, вівці, телята, лошаки), підкрильцеву (птахи) вени. Остання знаходиться на внутрішній поверхні крила птахів, і вона рельєфно виступає при вискубуванні пір'я. Наповнення кров'ю цих судин здійснюється затисненням їх рукою, джгутом або затискачем.



Мишам і пацюкам матеріал найчастіше вводять у бічні вени хвоста, розташовані по обидві сторони хвоста, використовуючи для цього голки з гострим кінцем. Для розширення вен хвіст занурюють на декілька хвилин у гарячу воду (+50-55°C) або протирають ксилолом чи бензолом. Голку шприца скосом назовні вводять під гострим кутом у вену нижньої третини хвоста, де шкіра тонша, у напрямку кореня хвоста (рис.). При попаданні голки у вену матеріал легко, без опору виходить із шприца, в місці знаходження кінчика голки під шкірою не з'являється здуття, і вена біліє.

Для проведення інтравенозного зараження мурчаків в голмішкову внутрішню вену тварину фіксують спиною догори, ножицями зрізають шкіру за ходом вени вище суглоба і відпрепаровують її від оточуючої тканини. Вище відпрепарованої ділянки вену здавлюють джгутом, вона стає чітко помітною. У білих мурчаків вена добре видима і без зрізання шкіри.

Кроликів заражають інтравенозно в крайову вушну вену, яка проходить по тонкому краю вуха на зовнішній поверхні. Шерсть вздовж краю вуха за ходом вени вищипують, шкіру дезинфікують. Для набухання вени вухо масажують чи натирають ксилолом і передавлюють у основи. Голку шприца вводять у вену майже паралельно поверхні вуха. Після закінчення ін'єкції вену придавлюють нижче місця уколу і витягують з неї голку. Місце уколу притискують сухою ватою. Зараження проводиться якнайдалі від кореня вуха, тому що при повторних введеннях можлива облітерація судини в місці уколу.

У хом'яка, мурчака та тхора яремні вени майже недоступні для уколів, і необхідне їх хірургічне оголення. Це - складний процес, і тому для таких тварин найчастіше застосовують інтракардіальне зараження - введення матеріалу в серце. Для цього тварину фіксують під наркозом на спині, курей - на боці, намагаються серцевий поштовх та визначають місце ін'єкції, яке у різних тварин різне: у миші - 0,5 см над верхівковим поштовхом серця, безпосередньо поблизу краю грудної кістки; у пацюка - 1 см над верхівковим поштовхом серця, в 1-2 мм від краю грудної кістки; у хом'яка - 4-5-й міжреберний простір, в 2-3 мм від краю грудної кістки; у мурчака - 2-й міжреберний простір, в 2 мм від

краю грудної кістки; у тхора - межа 3/4 верхньої та 1/4 нижньої частин довжини грудної кістки, в 3 мм від краю грудної кістки; у кроликів - 3-й міжреберний простір, в 3 мм від краю грудної кістки; у курки - 3-4 міжреберний простір на лінії плечелопаткового суглобу та каудального кінця грудної кістки.

Голку вводять перпендикулярно поверхні тіла крізь шкіру, проколюючи грудну стінку та серцевий м'яз. На цьому етапі повинна відчуватися пульсація серця, а в голці з'явиться кров. Матеріал повільно вводять голкою безпосередньо в серце. Показником проколу серцевого м'язу є поява крові в шприці при легкому відтягуванні поршня.

Матеріал для інтравенозного та інтракардіального заражень не повинен містити значних за розміром часток та пухирчиків повітря, які можуть викликати емболію судин та раптову загибель тварини.

#### **Інтрамускулярне (внутрішньом'язеве) зараження**

При цьому методі зараження матеріал вводять голкою майже перпендикулярно поверхні тіла, проколюючи шкіру, підшкірну клітковину та товщу м'язів (мускулатуру) в області шиї, грудей, сідниць або стегна. Легким натиском на поршень інюкують необхідну кількість матеріалу (рис.). Місцем ін'єкції у курей є великий грудний м'яз.



***Інтрамускулярне зараження***

#### **Інтраперітонеальне (внутрішньочеревинне) зараження**

Цей метод проводиться шляхом вприскування матеріалу в черевну порожнину. Спочатку тварину спеціально фіксують (тримають або підвішують) головою вниз для того, щоб внутрішні органи та кишечник опустилися до діафрагми. Місце

ін'єкції визначають в нижній третині живота вище симфізу, трохи відступаючи від серединної лінії живота. Рукою злегка відтягують лапу тварини, створюючи натяг шкіри та м'язів черевної стінки. В місці проколу стінку живота захоплюють у складку, в основу якої вводять голку на глибину не більше 0,3-0,5 см. Для попередження поранення кишечника та внутрішніх органів кінець голки повинен бути тупим (сточеним).



#### ***Інтраперітонеальне зараження.***

Спочатку проколюють шкіру та м'язи живота, а потім, натискаючи на голку шприца, очеревину. Проникнення у черевну порожнину відчувається за характерним тріскучим звуком та за зникненням опору черевної стінки. Після витягування голки шкіра зсовується на старе місце, закриваючи отвір в черевну порожнину (рис.). У великих тварин при інтраперітонеальному зараженні роблять невеликий (1-1,5 см) розріз шкіри, в який вводять голку шприца і проколюють очеревину. Застосовуючи даний метод зараження тварин, треба пам'ятати, що протягом доби до інфікування їх не годують.

#### **Субоципітальне (каркове) зараження**

Цей метод використовують лише при роботі з великими тваринами: кроликами, собаками, тощо. У дрібних тварин він не застосовується за анатомічними показниками: простір між оболонками та мозком надто малий. Тварину під наркозом при

цій операції фіксують таким чином. Голову тримають так, щоб між площиною тулуба та шиєю утворився прямий кут, тобто максимально нахилиючи її до грудної клітки. При такому положенні відстань між першим, шийним хребцем та черепом збільшується, а зв'язка між ними натягується. На ділянці голови між карковим горбком та остистим відростком першого шийного хребця шерсть депілюють, шкіру дезинфікують. Прокол роблять на середині відстані між карковим горбком та остистим відростком, точно по середній лінії, тому що відхилення голки в бік може пошкодити венозні синуси.

Для ін'єкції у велику цистерну використовують гостру голку з не дуже скошеним кінцем, тому що зріз голки повинен поміститися між твердою мозковою оболонкою та мозком (відстань між ними 1-2 мм). Щоб під час проходження м'яких тканин отвір голки залишався вільним, в нього встромляють мандрен. Голку вводять на глибину до 0,5 см дуже обережно, щоб не зачепити твердої мозкової оболонки, до відчуження проколу цієї оболонки. Якщо при проходженні голки чутний тріск, введення матеріалу потрібно негайно припинити.

При правильному введенні голки в цистерну в її отворі з'являється спинномозкова рідина. Тоді на голку надівають сухий стерильний шприц. За рахунок правильного руху поршня, щоб не знизити різко внутрішньочерепний тиск, в порожнині шприца створюється від'ємний тиск, і в шприц надходить спинномозкова рідина в кількості 0,3-0,8 мл в залежності від виду тварини. Після цього на голку надівають інший шприц з матеріалом для введення, який випускають в тому ж об'ємі.

#### **Інтраспінальне (внутрішньоспинномозкове, люмбо-сакральне, крижово-поперекове) зараження**

Наркотизовану тварину фіксують у положенні з сильно зігнутих хребтом у крижово-поперековій області. Тонкою голкою роблять прокол під кутом 45° в області останнього поперекового та першого крижового хребців трохи справа від середньої лінії.

#### **Інтрацеребральне (внутрішньомозкове) зараження**

При цьому методі зараження тварин матеріал вводять або під тверду мозкову оболонку, або безпосередньо в головний мозок, найчастіше в тім'яну область, яка відрізняється тонким

кістковим покривом, невеликою кількістю м'язів та відсутністю значних судин.

Великим тваринам (мавпам, собакам, вівцям, свиням, лошкакам, тощо) зараження у мозок роблять під наркозом через трепанаційний отвір або проколом кістки черепа, фіксуючи тварину спиною догори. Трепанацию черепа роблять бормашиною, буравчиком, трепаном або свердлом. Шкіру натягають і розрізають скальпелем на 1-2 см паралельно поздовжній осі черепа. Розріз повинен проходити трохи вище лінії, яка з'єднує задні кути очей і на 1-2 мм вбік від середньої лінії черепа, щоб не ушкодити поздовжній венозний синус. Потім розсікають надкісницю і трепанують кістку.

Через утворений отвір (у мурчаків та кроликів близько 2 мм, а у великих тварин трохи більший) під тверду мозкову оболонку вводять голку на глибину від 2 мм (мишам) до 10 мм (мавпам) і, злегка натискуючи на поршень, вприскують матеріал малими порціями, щоб запобігти підвищенню мозкового тиску. Отвір в кістці після ін'єкції закривається зсунутою на місце шкірою, а на розрізи надкісниці та шкіри над трепанаційним отвором накладають шви, стягуючи декількома стібками шовкових ниток.

Кроликам, мурчакам та великим пацюкам при інтрацеребральному зараженні трепанацию черепа можна не робити. Після розсікання шкіри та надкісниці їх відсувають в обидві сторони і стерильною канцелярською кнопкою проколюють черепну стінку. В утворений отвір голкою з шприца вводять матеріал безпосередньо в мозок або під тверду мозкову оболонку.

Мишам та невеликим пацюкам черепну коробку проколюють голкою шприца. У більшості тварин ін'єкцію роблять збоку від середньої лінії на половині між верхнім краєм западини ока та зовнішнім слуховим проходом, щоб не пошкодити поздовжній венозний синус. У курей прокол роблять на лінії, яка з'єднує передні краї вušних отворів, в 1-2 мм збоку від середньої лінії. Зразу ж після ін'єкції у тварин можуть з'явитися шокові явища, які через деякий час зникають.

Кроликів можна заражати без трепанації черепа через орбіту ока, де тонка кістка. Голка повинна бути тонкою, завдовжки 4-5

см із заточеним гострим кінцем. При цьому способі зараження потрібно зафіксувати тулуб кролика і притискувати голову тварини до столу. При проколі шкіру біля місця ін'єкції зсувають, щоб після неї отвір в черепі заклався шкірою, яка повертається на місце. Голку тримають косо по відношенню до середньої лінії, щоб не попасти в орбіту. Такий спосіб менше травмує тварину, і вона переносить цю операцію без наркозу.

### **Зараження в периферичний нерв**

Цей спосіб зараження великих тварин використовується рідко. Інфікування проводять в сідничний нерв, фіксуючи наркотизовану тварину на верстаті чи операційному столі спиною догори. Наркоз може бути загальним або місцевим. Тильну поверхню стегна депілюють та дезинфікують

Скальпелем роблять розріз шкіри завдовжки 3-4 см. тупим інструментом розсувають м'язи стегна та оголюють нерв. Під нього підводять тонкі марльові турунди і піднімають нерв з глибини рани, щоб виключити можливість попадання матеріалу, що вводиться тварині, на оточуючі тканини. Тонкою голкою шприца в нерв вводять невелику кількість матеріалу під дуже гострим кутом. Щоб матеріал не вилився з нерву, голку виймають дуже обережно. Після введення матеріалу турунди витягають, розріз шкіри зашивають шовковими нитками або накладають скобки

### **Інтрастимулярне (внутрішньосім'яникове) зараження**

Головним чином метод зараження усередину сім'яників застосовують на кроликах. Тварину фіксують на спині, її задні кінцівки розставляють якнайширше одну від одної. Сім'яник зсувають трохи вперед і фіксують між великим та вказівним пальцями.

### **Інтраокулярне зараження**

До даної групи методів інфікування тварин (інфікування в око) відносяться корнеальне, інтракорнеальне, кон'юнктивальне та інтраокулярне зараження. При всіх цих методах матеріал вводять тільки в одне око.

Метод інфікування в передню камеру ока (інтраокулярне зараження) використовують головним чином для великих тварин: собак, кроликів, мурчаків, тощо. Наркотизовану під легким наркозом тварину фіксують спиною догори, на око

наносять 2-3 краплі 10%-го розчину новокаїну чи вводять в орбіту шприцом 1-2 мл 2%-го розчину новокаїну на 10-15 хв для анестезії. Після її настання тупим інструментом виводять око з орбіти, тонким очним пінцетом захоплюють кон'юнктиву, щоб іммобілізувати очне яблуко. Голку мінімального діаметру вводять в рогівку ока біля лімбу, не ушкоджуючи райдужну оболонку, і просувають у центральному напрямі до тих пір, поки в отворі голки не з'явиться рідина. Шприцом відсмоктують близько 0,03 мл рідини з передньої камери. Потім, не виймаючи голки з камери ока, насаджують інший шприц з матеріалом для інфікування і вводять його в тому ж об'ємі.

#### **Корнеальне зараження**

Анестезію ока проводять як і при зараженні в передню камеру ока. Очне яблуко фіксують великим та вказівним пальцями, виводячи його назовні. Обережно скарифікують рогівку гострою голкою або вакциностілом у вигляді вертикальних та горизонтальних насічок. Матеріал наносять на рогівку і втирають його спочатку стерильним тампоном, а потім повіками.

#### **Інтракорнеальне зараження**

Зараження в рогівку проводиться на тваринах, підготовка яких здійснюється аналогічно корнеальному зараженню. Матеріал для інфікування вводять обережно, дуже тонкою голкою в 2-3 ділянки рогівки.

#### **Кон'юнктивальне зараження**

Цей метод інфікування тварин в сполучну оболонку ока здійснюється шляхом закапування матеріалу на неушкоджену рогівку.

### **Одержання патологічного матеріалу від заражених лабораторних тварин**

Правильний відбір та обробка патологічного матеріалу мають дуже велике значення для успішного виявлення вірусу.

Матеріалом для виділення вірусів з інфікованого організму людей та тварин є ті біологічні рідини та тканини органів, де віруси містяться у найбільшій кількості, тобто при цьому треба керуватися тропізмом вірусів. Таким чином, простежується логічний взаємозв'язок між тропізмом вірусу (типом клітин, де

він успішно реплікується), методом ураження тварини (введенням вірусомісного матеріалу саме туди, де є клітини необхідного типу), та патологічним матеріалом, який відбирають від тварини (органами, рідинами і т.п., де накопичився введений вірус) .

Патологічний матеріал може бути *прижиттєвим* - одержаним від живої тварини (протягом незавершеного експерименту), та *секційним* - одержаним після розтину лабораторної тварини (по завершенню експерименту або ж при передчасній загибелі тварини).

Секрети - це специфічні біологічні рідини, що виділяються залозами людини та тварин. Якщо виділення відбувається назовні, це - залози зовнішньої секреції з такими секретами: піт, молоко, слина, жир (сальні залози), шлунковий сік, сім'яна рідина, сперма, жовч, спинномозкова рідина, синовіальна рідина суглобових сумок, плевральна та асцитна рідини. Залози внутрішньої секреції виділяють секрети в кров та лімфу, це - гормони.

Екскрети - це кінцеві продукти обміну речовин, які виділяються організмом назовні за участю нирок, легенів, шкіри, кишечника. Екскретами є: сеча, фекалії, піт, надлишок води, солі, вміст трахей та бронхів (при кашлі), чужорідні речовини та біологічно активні речовини, що утворилися в організмі.

Мазок із глотки беруть стерильним ватним тампоном, торкаючись ним до задньої стінки глотки й шпателем натискаючи на корінь язика. Тампон вміщують у 2-3 мл фізіологічного розчину, сполоскують і віджимають. Одержану суспензію центрифугують при 3000 об/хв протягом 10 хв і деконтамінують. Матеріал зберігають замороженим.

Серозну рідину з пустул не треба додатково обробляти й деконтамінувати. Для виділення вірусів її використовують відразу або зберігають замороженою.

Перед взяттям матеріалу з везикул їх поверхню обробляють ефіром або ацетоном. Вміст везикул відсмоктують, шприцом з тонкою голкою та переносять у фізіологічний розчин. Іноді везикули розтинають і збирають їхній вміст ватним тампоном, який потім вміщують у фізіологічний розчин.



Збирання сечі та калу у тварин здійснюють при проведенні балансових досліджень протягом експерименту, застосовуючи або катетер, або спеціальний прилад, який дає можливість роздільного збирання екскрементів. Сечу катетером збирають у стерильну закриту посудину. За необхідністю сечу освітлюють центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 20 хв і деконтамінують, тобто звільняють від домішок супровідної мікрофлори. Для цього додають антибіотики з розрахунку 1000 ОД пеніциліну та 1000 мг стрептоміцину на 1 мл. Зберігають проби сечі замороженими. Кал після відбору поміщають у стерильні флакони з гумовими пробками для щільного закупорювання. Готують 10%-ну суспензію на фізіологічному розчині чи розчині Хенкса. Флакон з пробєю калу старанно струшують протягом 3-5 хв, загорнувши його серветкою, змоченою 70%-м етиловим спиртом. Далі матеріал центрифугують (3000 об/хв протягом 20 хв) для звільнення від великих часток. Відбирають надосадову рідину і деконтамінують її. За неможливістю одержати проби калу роблять мазки з прямої кишки. Ректальні тампони змочують фізіологічним розчином і вводять у пряму кишку обертальним рухом, після чого вміщують їх у флакони з фізіологічним розчином. Тампони віджимають, а з одержаної суспензії роблять 10%-ну, як описано вище. Проби калу зберігаються замороженими.

Прижиттєве одержання кісткового мозку методом пункції можливе у всіх видів тварин та птахів. Кістковий мозок у коней одержують з грудини чи клубової кістки шляхом проколу спеціальною голкою, у кроликів - з грудини чи стегнової кістки, у птахів - з колінного суглобу чи верхньої третини плісочної кістки.

Спинномозкову рідину одержують шляхом люмбальної (спинномозкової) пункції. Відбирають певну кількість рідини у стерильний скляний посуд. Якщо немає бактеріальної контамінації, спинномозкову рідину можна використовувати для виділення вірусів без додаткової обробки. Домішки еритроцитів та інших клітинних елементів видаляють центрифугуванням при 1500 об/хв протягом 10 хв.

### **Забір крові**

Взяття крові проводиться з обов'язковим дотриманням правил асептики. Це стосується обробки поверхні шкіри тварини дезінфектантами, використання стерильного посуду та інструментарію, спецодягу експериментатора. Потрібно пам'ятати, що шприц повинен бути сухим, щоб запобігти розчиненню еритроцитів взятої крові (гемоліз).

Спосіб взяття крові залежить від необхідності її кількості: невеликої чи великої. Кров у лабораторних тварин беруть з різних вен, пункцією серця та з сонної артерії шляхом кровопускання.

Невелику кількість крові відбирають з зовнішньої крайової вушної та з хвостової бічної вен у кроликів, пацюків та мурчаків; з кінчиків пальців передньої кінцівки у мишей, пацюків, хом'яків та мурчаків; з гребня та підкрильцевої вени у птахів.

У кроликів, мурчаків, тхорів кров з зовнішньої крайової вушної вени беруть після фіксації тварини. Місце розташування вени змочують спиртом, потім ксилолом, щоб викликати прилив крові у вену. Проте треба слідкувати за тим, щоб залишки ксилолу не попали в кров, яка від цієї речовини гемолізується. Судину здавлюють у основи вуха і роблять надріз або пункцію в залежності від розміру тварини. Голку вводять під гострим кутом майже паралельно вені і обережно просувають у порожнину судини. Якщо кров не витікає, то голку слід повернути навколо поздовжньої вісі і знову просунути вперед чи назад. Місце взяття крові сильно стискати не рекомендується, щоб запобігти попаданню у витікаючу кров тканинної рідини, це може змінити результати досліджень. Також не рекомендується брати повторно кров з однієї й тієї ж судини.

У мишей, пацюків невелику кількість крові беруть з хвостової бічної вени. Операцію виконують під наркозом. Хвіст оброблюють спиртом та ксилолом або занурюють його на 1-3 хв в підігріту до +45°C воду. Потім відрізають кінчик хвоста ножицями чи надрізають судину скальпелем або бритвою. Кров збирають у пробірку або відсмоктують піпеткою Пастера. Після цього рану припікають на вогні або хромовою кислотою з тієї

причини, що пацюки гризуть ушкоджений хвіст.

У мавп невелику кількість крові беруть з кінчиків пальців передньої кінцівки шляхом уколу пером Дженнера, скальпелем чи голкою Франка. Скарифікатори для цього не використовуються через їх ускладнену очистку.

У курей кров у незначній кількості беруть з підкрильцевої вени. Для цього птаха фіксують на спині, розпрямляють крило і здавлюють вену. Після обробки шкіри спиртом вену проколюють скальпелем (голку в цю вену важко вводити) і збирають кров. Крім того, кров можна брати також з гребеня, проколюючи його або відрізаючи зубець. Для запобігання кровотечі рану після взяття крові припікають або оброблюють хлоридом заліза.

Одержання великої кількості крові здійснюють пункцією серця або беручи з зовнішньої яремної, стегнової, ліктьової, підкрильцевої вен.

Пункцію серця роблять на анестезованих мишах, пацюках, хом'яках, тхорах, мурчаках, кроликах, собаках, мавпах і курях після відповідної підготовки місця пункції як при інтракардіальній ін'єкції.

У мурчаків та кроликів кров беруть з серця у другому та третьому міжребер'ї, відповідно на 1,5 см та 3 см від лівого краю грудини, де відчувається серцевий поштовх. У мишей та пацюків він чутний з лівого краю грудини. Ділянку на грудях депілюють та дезинфікують. Кінчиком пальця знаходять серцевий поштовх. В це місце з лівого краю грудини вколюють голку і спрямовують її перпендикулярно серцю до середньої лінії на глибину 1,5-2 см. Голка повинна подолати опір плеври, перикарду та серцевого м'яза. Якщо голка попала в лівий шлуночок, кров почне поступати в шприц поштовхами. Без загрози для життя тварини у мурчаків можна брати 10-15 мл крові, у кроликів - 25-40 мл, у миші - до 0,5 мл, у пацюка - 2-3 мл. Зразу ж після взяття крові для поповнення кровообігу необхідно ввести інтрамускулярно стерильний підігрітий до +36-38°C фізіологічний розчин (0,85% хлорид натрію) кролику - 20-25 мл, мурчаку - 10-15 мл, миші - 0,5-1 мл, пацюку - 3-5 мл.

Потрібно мати на увазі, що при використанні цього методу взяття крові бувають летальні випадки, особливо у мишей,

пацюків, хом'яків та мурчаків.

З зовнішньої яремної вени кров беруть у мурчаків, тхорів, хом'яків, кроликів, овець, собак, кішок та курей. Тварини повинні знаходитися під наркозом (крім курей), вену треба перед взяттям крові оголити. У великих тварин (вівця, кінь, корова) вену не оголюють, а використовують для зупинки кровообігу джгут, над яким і роблять пункцію. Для цього в області нижньої третини шиї в яремному жолобі вистригають шерсть, шкіру дезинфікують. Вище місця уколу накладають гумовий джгут, вводять голку по ходу добре видимої вени. Потім джгут знімають, і кров стікає у підставлену стерильну посудину.

Взяття крові з стегнової вени роблять у мишей, пацюків, тхорів, овець, собак, кішок, мавп при фіксації тварини на спині під наркозом. Після відповідної підготовки операційного поля розрізають шкіру на внутрішньому боці стегна і оголюють судину. У дрібних лабораторних тварин пункція вени неможлива, тому її надрізають, і кров збирають у шкіряний карман. Після тампонади рану закривають.

Кровопускання через шийну артерію можна здійснити у крупних наркотизованих тварин: кроликів, кіз, баранів, тощо. В області шийного судинного пучка вистригають шерсть, дезинфікують шкіру. Збоку від гортані розрізають шкіру, остерігаючись пошкодити яремну вену. Обережно відводять вбік грудинно-ключично-сосковий м'яз, під ним знаходять нервово-судинний пучок, який розділяють і піднімають пінцетом шийну артерію. Стискають її зажимом, надрізають ножицями і вставляють канюлю.

В дослідженнях використовують нерозведену кров, плазму, сироватку, еритроцити, лейкоцити. При необхідності, щоб запобігти зсіданню крові, в абсолютно суху посудину наливають 1/4 частину об'єму 25% розчину сульфату магнію чи 1/2 частину об'єму напівнасиченого розчину сульфату натрію і додають свіжоотриману кров у кількості 3/4 та 1/2 частини відповідно. Використовуються також водні розчини: 20% розчин цитрату натрію чи калію, 10% розчин фториду чи оксалату натрію. З цією ж метою використовують речовини тваринного походження: гепарин, пептон, гірудин, синантрин, тощо. В

пробірки, градуйовані на 10 мл, наливають 0,3-0,5 мл одного з вищевказаних антикоагулянтів (консервантів) і доливають свіжу кров до мітки. Їх закривають й ретельно перемішують. Треба пам'ятати, що кров з консервантами необхідно досліджувати якнайшвидше.

### **Одержання сироватки крові**

Для одержання сироватки кров збирають в пробірку, не допускаючи її спінювання. Для цього струмок крові, що витікає з судини, слід спрямовувати по стінці пробірки. Зібрану кров залишають на 1 год при кімнатній температурі або в термостаті при +37°C на 20-30 хв. Утворений згусток крові відділяють від стінки пробірки тонкою скляною або металевою паличкою, піпеткою Пастера чи металевим дротиком, обережно обводючи ними по стінці пробірки навколо згустку, і залишають на ніч в холодильнику. Одержану сироватку відсмоктують піпеткою чи шприцом з голкою в стерильний флакон, центрифугують 10-15 хв. при 2000 об/хв, фільтрують через бактеріальні фільтри чи додають антибіотики (по 100-200 ОД пеніциліну та стрептоміцину на 1 мл).

Строки зберігання сироватки визначаються умовами досліду. Звичайно сироватку зберігають на холоді або при температурі від 0 до +4°C в холодильнику, чи заморожуючи (-10-20°C). Для попередження розвитку мікрофлори при тривалому зберіганні сироватки її слід законсервувати, додаючи фторид натрію, тимол (на 10 мл сироватки 5 мг чи 3 мг відповідно), мертиолят натрію, азид натрію, тощо.

### **Одержання еритроцитів**

Для одержання еритроцитів необхідно запобігти зсіданню крові, що здійснюється шляхом використання антикоагулянтів або дефібринуванням з допомогою гладеньких скляних намистин.

Свіжоотриману кров зливають в стерильну колбу з притертою пробкою та скляним намистом, що вкривають дно посудини в два шари. Кількість крові не повинна перебільшувати 1/4 об'єму колби. При взятті крові флакон з намистом необхідно безперервно струшувати з моменту заповнення посудини до повного остигання крові. Приблизно через 20 хв нитки фібрину (білку, що утворюється з білку

плазми крові фібриногену під дією ферменту тромбіну) осаджуються на намисті, а вільну від нього кров переливають в іншу посудину. Остигла дефібринована кров втрачає здатність зсідати. Її фільтрують через стерильну марлю, і еритроцити 3-4 рази відмивають центрифугуванням в ізотонічному розчині хлориду натрію, кожен раз осаджуючи еритроцити по 10-15 хв. при 2000-3000 об/хв. Після останнього відмивання надосадова рідина повинна бути безбарвною і прозорою. З осаду еритроцитів, який приймають за 100%-ну суспензію, готують суспензію відповідної концентрації на 0,85%-му розчині хлориду натрію чи фосфатно-буферному розчині. В такому вигляді еритроцити зберігаються протягом 3-4 днів при +4°C.

Кров у однієї й тієї ж тварини можна брати не частіше двох разів на місяць. Кількість крові, необхідну для приготування 1%-ї суспензії еритроцитів, можна обчислити за формулою:

$$V_4 = ((V_1 \times 1) / 100) \times 2^x$$

де  $V_4$  - об'єм крові, мл;

$V_1$  - об'єм потрібної кількості 1%-ї суспензії еритроцитів, мл;

$2^x$  - середній показник вмісту еритроцитів в крові (коефіцієнт);

$1$  - відсоток потрібної суспензії.

### Одержання плазми

За звичайних умов рідка частина крові - *плазма* - швидко зсїдає, що обумовлено наявністю в ній білка фібриногену. Запобігти зсіданню крові для одержання плазми можливо за допомогою додавання до неї антикоагулянтів. З цією ж метою поверхню пробірки, в яку в подальшому збиратимуть плазму, покривають шаром парафіну. Для цього в чисті центрифужні пробірки наливають по 0,5 мл розплавленого парафіну, закривають ватними пробками і автоклавують у вертикальному положенні (0,5 атм 20 хв.). Перед використанням пробірки підігрівають і охолоджують при уповільненому обертанні таким чином, щоб парафін не потрапляв на пробки, а рівномірно розподілявся по внутрішній поверхні пробірок.

Для одержання плазми кров у тварин беруть натщесерце під

наркозом і поміщають у парафіновані центрифужні пробірки, які центрифугують протягом 15 хв при 2500 об/хв. Надосадова рідина і є плазмою крові.

### Одержання лейкоцитів

Суспензію лейкоцитів можна одержати двома способами. В обох застосовуються *антикоагулянти*. Один із них - за методом Робіно. До 30 мл крові додають гепарин з розрахунку 0,0001 мг на 1 мл крові. Суміш інкубують в похилому положенні під кутом 45° при +37°C до повного осадження еритроцитів. Для підсилення цього процесу додають 3%-ну суспензію полівінілпірролідону з розрахунку 20-40% від об'єму крові.

Повністю еритроцити осаджуються протягом 30-40 хв. Надосадову рідину центрифугують при 1500 об/хв протягом 2 хв, при цьому лейкоцити випадають в осад. Після видалення надосадової рідини осад розводять 5 мл фізіологічного розчину (рН 7.0), який додають краплями. Лейкоцити осаджують протягом 30 хв. Осад двічі відмивають фізіологічним розчином. Одержують гомогенну масу лейкоцитів.

Метод одержання лейкоцитів за Ванцетті та Каудіаном заключається в наступному. До 6 мл крові в градуйованій пробірці додають 1,5 мл 3%-ї суспензії гумміарабіку та 1,5 мл 3%-го цитрату натрію нейтральної реакції. Суміш збовтують і залишають на 30-40 хв для осадження еритроцитів. Поверхневий шар знімають і центрифугують при 1000 об/хв протягом 3 хв. Осад одержаних лейкоцитів суспендують у фізіологічному розчині.

### **Евтаназія**

Після закінчення досліду тварин, що залишилися живими, піддають евтаназії, або умертвляють. *Евтаназія* - це гуманне безболісне умертвіння тварин, що вийшли з експерименту.

Умертвіння тварин здійснюється в спеціальній секційній кімнаті у відсутності інших тварин. Проводити евтаназію потрібно з максимально можливою швидкістю. Тварину умертвляють своєчасно до настання хворобливого стану і до припинення дії наркозу.

Оптимальним методом умертвіння є введення наркотичної

речовини в летальній дозі. Так, собак можна умертвити, вводючи їм інтравенозно хлоралгідрат в дозі не менше 0,5 г на 1 кг живої ваги тварини або сульфат магнію 20-40 мл насиченого розчину. Треба пам'ятати, що останній може викликати збудження. Мавпам для умертвіння роблять наркоз 5% розчином тіопенталу, вводючи його або інтрамускулярно в кількості 1-2 мл на тварину (в залежності від її розміру), або інтравенозно в стегнову вену в дозі 1,5-2 мл на тварину (в залежності від ваги тіла). Потім тварину знекровлюють через шийні кровоносні судини.

Дрібних тварин (миші, пацюки, тхорі, кролики, хом'яки, мурчаки, птахи, жаби) допускається піддавати евтаназії шляхом розриву спинного мозку. Для цього тіло тварини утримують однією рукою за потилицю, а другою - за хвіст і швидким коротким рухом розтягують до відчуття обриву нитки. Менш гуманний спосіб - **декапітація** (відрізання голови). Найпоширеніший метод евтаназії таких тварин з допомогою інгаляційного наркозу ефіром, хлороформом, який здійснюють або в скляній посудині, або в спеціальній камері з кімнатною температурою. Курям відрізають голову або оглушають ударом по голові та перерізають шийні судини. Кроликів слід забивати шляхом повітряної емболії, великих тварин (дорослих собак, свиней, тощо) - за допомогою електричного струму, вводючи електроди в довгастий мозок та крижі. За необхідністю вивчати мозок тварину піддають миттєвому заморожуванню шляхом занурення тварини в рідкий азот.

Для тотального знекровлювання таких тварин, як мурчаки, кролики, собаки, мавпи перерізають сонну артерію. Роблять поздовжній розріз шкіри на шиї, трохи відступаючи від середньої лінії, і оголюють сонну артерію. Відпрепарувавши її від нерва, накладають на неї дві лігатури, тобто перев'язують у двох місцях на невеликій відстані одну від одної. Перерізують артерію між лігатурами. Кінець судини, що йде до серця, оголюють, направляють в стерильну пробірку і знімають лігатуру. Кров повинна струменем поступати в пробірку. Щоб струмінь крові не слабшав, масажують область серця, печінки, селезінки. Для знекровлювання дрібніших тварин (мишей, пацюків, хом'яків) роблять звичайний розріз шиї та шийних



судин і збирають витікаючу з рани кров. Курей знекровлюють шляхом відрізання голови.

### **Розтин лабораторних тварин - порядок та техніка**

Перед початком розтину збирають докладний анамнез (вивчають історію хвороби), що дозволяє в процесі розтину виділити головні зміни в організмі тварини, точніше визначити хворобу і вивчити її наслідки.

Труп, призначений для розтину, спочатку піддають зовнішньому огляду, визначаючи вік, масу, будову тіла, угодованість, трупні зміни, стан шкіри та видимих слизових оболонок, поверхневих лімфатичних вузлів, скелетних м'язів, кісток, суглобів. Після цього роблять внутрішній огляд - розтин грудної та черевної порожнин, дослідження вилучених органів, розтин носової та придаткової порожнин, шиї, розтин черепа та хребта, вилучення та дослідження головного та спинного мозку.

Зовнішній огляд трупа починають з визначення віку (за станом зубів), виду, статі, масті, породи, маси, розмірів (довжини та висоти) тіла. Будова тіла буває міцною, пропорційною, та слабкою, непропорційною. При виявленні відхилень в будові тіла відмічають, в чому вони проявляються (викривлення хребта чи кінцівок, тощо). Звертають увагу на форму та розмір живота (збільшений, підтягнутий). Угодованість визначається після зняття шкіри за станом підшкірного жиру та мускулатури. У виснажених тварин жир під шкірою відсутній, чітко виступають ребра, хребет. При ожирінні велика кількість жиру накопичується під шкірою, між м'язами та біля нирок.

При описі трупних змін спочатку звертають увагу на охолодження трупа, яке в значній мірі залежить від пори року: холод прискорює, а тепло уповільнює цей процес. При трупному задубінні відмічають нерухомість та затвердіння скелетної мускулатури, що визначається за рухомістю щелеп та кінцівок в суглобах. При трупному розкладі характерне сіро-зелене забарвлення тканин в області черевних стінок і поява запаху.

Трупні плями (гіпостазі, імбібіція) помітні після зняття шкіри на внутрішній її поверхні, в підшкірній клітковині, в тих частинах трупа, що знаходяться під нею. На відміну від

крововиливів плями мають нечіткі межі, бліднуть при натискуванні пальцем.

При огляді шкіри відмічають стан волосяного, шерстяного чи пір'яного (у птахів) покриву: блиск чи тьмяність, скуйовдженість, наявність та характер ділянок без волосся, тощо. Потім звертають увагу на колір, еластичність, цілісність шкіри, наявність на ній ерозій, виразок, рубців, пустул, папул, афт, крововиливів: Далі досліджують шкірні утворення: роги, копита, кігті, гребінь, сережки (у птахів). Вони можуть бути деформованими, різної консистенції, відділятися важко або легко.

Після зовнішнього огляду трупа досліджують природні отвори: рот, очі, анус, клоака, які бувають закриті чи відкриті. Встановлюють стан слизових оболонок - колір, блиск, характер уражень та виділень (кров'янисте, гнійне, пінисте).

При огляді зовнішніх лімфатичних вузлів (підщелепних, заглоткових, поверхневих шийних, пахових) відмічають їхній розмір, консистенцію, колір з поверхні (а подалі й у розрізі), ступінь кровонаповнення.

Внутрішній огляд здійснюють в процесі розтину трупа тварини. Перед розтином трупу надають певного положення. Трупи великих тварин розтинають в боковому лівому (велика рогата худоба) чи правому (коні) положенні, а середніх та дрібних тварин (мавпи, свині, собаки, кішки, кролики, мурчаки, миші, пацюки, кури, тощо) - в спинному положенні.

Розтинати тварин треба якнайшвидше після їхньої загибелі, тому що в трупному матеріалі віруси швидко гинуть через протеоліз. Для вірусологічних досліджень лабораторних тварин розтинають відповідно до методики патологоанатомічного розтину з суворим дотриманням правил **асептики**, **антисептики** та техніки безпеки.

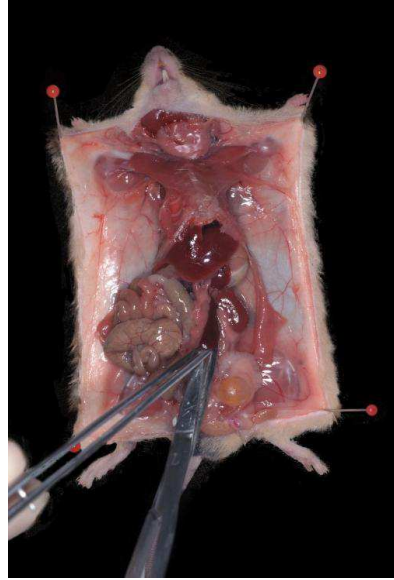
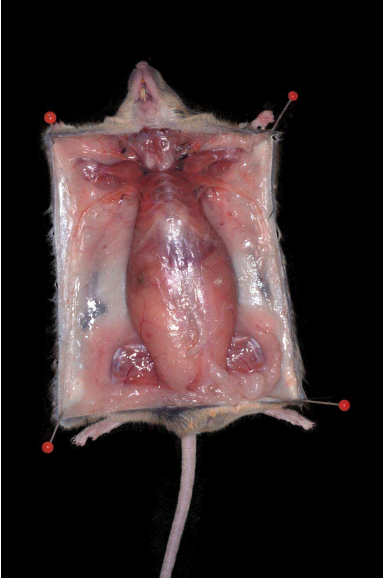
Для того, щоб більш точно визначити забарвлення тканин та органів тварин, трупи розтинають при денному світлі. В приміщенні для розтину (секційний зал чи спеціальна кімната) необхідно мати дезинфікуючі засоби: для обробки місця розтину - хлорне вапно чи 10%-й розчин їдкого натрію, а для дезинфекції трупів дрібних тварин та рук дослідника - 2-3%-й розчин фенолу та хлораміну, відповідно, чи 70%-й етиловий

спирт. Набір інструментів для розтину буває мінімальним (секційний ніж, ножі для кісток, прямі та зігнуті ножиці, скальпель, хірургічний та анатомічний пінцети, пила та молоток-сокирка) та повним. Розтин виконують стерильними інструментами.

Перед розтином труп дезинфікують: дрібних тварин занурюють в 2-3% розчин фенолу, тримаючи за хвіст, крупних - змочують шерсть по лінії розрізу 70% етиловим спиртом чи дезинфікуючим розчином. Курей на 20-30 сек. занурюють у 2% розчин карболової кислоти.

Трупи крупних лабораторних тварин фіксують на спеціальних секційних столах, кюветах, пластинах чи дошках, де є пристосування для перешкоджання витоку рідини та фіксації кінцівок і голови. Трупи дрібних тварин фіксують животом догори, приколюючи ін'єкційними чи одностержньовими (кравецькими) голками кінцівки до дошки (дерев'яної чи з пенопласту) або до кювети з парафіном. Можна використовувати спеціальну дошку з прибитими по кутах цвяхами, до яких прив'язують кінцівки тварини. Робочі поверхні всіх секційних приладів повинні бути покритими папером, насиченим дезинфікуючим розчином.

Основне правило розтину: до трупа можна доторкатися тільки інструментами чи руками в гумових рукавичках. Розтин середніх та дрібних тварин здійснюють за певними схемами, одна з яких – *схема Вагенера*. Розріз шкіри роблять по білій лінії живота від лобкової кістки (симфізу) до шиї. Щоб при цьому не перерізати черевну стінку, пінцетом підіймають шкіру і роблять спочатку поперечний надріз складки шкіри поблизу симфіза, а потім, встромивши одну браншу ножиць в утворений отвір, розрізують шкіру до шиї тварини. Потім лінію розрізу продовжують у напрямі всіх чотирьох кінцівок до пахової ямки та колінної складки, які треба оголити для досліджень лімфатичних вузлів. Тупим інструментом відпрепаровують шкіру від підшкірної клітковини та мускулатури, відкриваючи клапті шкіри вправо та вліво і приколюючи їх голками за верхні та нижні кути. Щоб уникнути **контамінації** секційного матеріалу вмістом травного каналу, спочатку роблять розтин грудної порожнини і беруть секційний матеріал перед розтином черевної порожнини.



### *Етапи розтину лабораторної миші*

При розтині грудної порожнини в наддіафрагмальній області роблять поперечний розріз м'язів, пінцетом підхоплюють мечовидний відросток, а ножицями вздовж грудної кістки з двох сторін від неї перерізують ребра. Вирізану грудину разом з ребрами підіймають догори, при цьому утворюється отвір для огляду грудної порожнини. Спочатку досліджують об'єм та консистенцію легень, стан плеври (колір, блиск, тьмяність), наявність крововиливів, вузлів, еластичність, тощо. Далі відмічають форму серця, стан передсердь, шлуночків, епікарду, жирової клітковини, наявність крововиливів. При розрізі порожнини серця досліджують ендокард, міокард, клапани, кількість крові, її колір та ступінь зсідання. Органи та тканини грудної порожнини беруть перед розтином черевної порожнини і поміщають в стерильні флакони.

Розтин черевної порожнини роблять після заміни інструментів на стерильні. Ножицями роблять розріз від мечоподібного відростку під лінією діафрагми по білій лінії живота до лобкової кістки, відкриваючи піддіафрагмальну

область і відділяючи стінку живота з обох сторін від реберної дуги. Утворені трикутники черевної стінки відводять в боки і фіксують. Кишечник відтягують пінцетом вліво до тих пір, поки не відкриються селезінка, печінка та нирки. Змінивши інструмент, видаляють органи. Огляд починають з селезінки. Визначають її розміри, краї (гострі чи округлі), колір, форму, консистенцію (щільна, м'яка, пухка), встановлюють наявність некрозів, інфарктів, крововиливів, тощо. При огляді печінки визначають розміри, вид її країв (гострі, тупі), консистенцію (щільна, пухка), колір (коричневий, жовтий, сіруватий), характер поверхні (гладка, зерниста, вузлувата). При обстеженні нирок звертають увагу на їхні розміри, форму, консистенцію, стан капсули, колір. У сечового міхура визначають об'єм, стан серозної оболонки, кількість та колір сечі.

При необхідності видаляють шлунок та кишечник і досліджують їхні відділи, колір, кількість та запах вмісту.

За умов досліду розтинають ротову (роблячи розріз щік між обома щелепами) та носову порожнини, вивчаючи язик, мигдалики, їхню величину, стан слизових оболонок, наявність гнійників. Розрізують глотку та стравохід, визначаючи стан слизових оболонок. Потім розрізують стінку гортані, трахеї та крупних бронхів, відмічаючи характер вмісту (кров'яниста чи піниста рідина, слиз, гній, тощо), стан слизових оболонок. Оглядають щитовидну, парашитовидну та зобну залози.

За необхідністю дослідження центральної нервової системи, а саме головного та спинного мозку, спочатку розтинають черепну коробку, закріпивши тварину в черевному положенні шляхом фіксації передніх кінцівок та голови, шкіру голови та шиї обробляють дезинфікуючим розчином. Розріз шкіри роблять перпендикулярно до вісі тіла за вухами, на потилиці і продовжують зліва та справа уперед до орбіт (рис.).

Шкіру разом з вухами відпрепаровують і відкидають вперед, оголюючи черепну коробку. Одну браншу ножиць вставляють у великий черепний отвір (чи у вушний отвір) і розрізують кістки черепа зліва та справа в напрямку до орбіт. Потім розрізують кістки черепа між орбітами і видаляють всю вирізану ділянку. Якщо кістки черепа товсті, їх розпилюють в тих же напрямках. Можна розрізи черепа вести від орбіт назад. Головний мозок

тварин, який має м'яку консистенцію, видаляють з основи черепа, піднявши його злегка розкритими браншами ножиць і підрізавши черепно-мозкові нерви. Його досліджують з поверхні, потім поздовжнім розрізом розсікають на дві частини. Розтинають і оглядають бокові шлуночки, довгасти мозок, мозочок, амонові роги, смугасте тіло, епіфіз. Враховуючи, що специфічні для деяких вірусів зміни можуть бути локалізованими в різних відділах головного мозку, роблять відбитки його таким чином. Мозок тварини з розтятої черепної коробки, не ушкоджуючи структури, переносять на аркуш фільтрувального паперу розміром 10x10 см, де він достатньо міцно фіксується. Браншами ножиць відрізають по вертикальній площині невеликий шматочок його і кладуть поряд на папір. Потім відрізають наступний шар мозку, який також кладуть поруч і т.д. Взявши в одну руку аркуш паперу з фіксованими на ньому шматочками мозку, другою рукою прикладають зверху до кожного по черзі предметне знежирене скельце, і отримують відбитки.

Для взяття шматочків спинного мозку випилують окремі ділянки хребта і стерильним металевим стержнем з ватним тампоном виштовхують ділянки спинного мозку в стерильний посуд. Забирати спинний мозок необхідно з шийного, грудного та поперекового відділів. Після зняття твердої мозкової оболонки вивчають спинний мозок з поверхні і на поперечному зрізі. Відмічають чіткість меж сірої та білої речовин, колір, вологість, кровонаповнення, консистенцію, стан міжхребцевих вузлів.

При дослідженні скелетної мускулатури відмічають ступінь її розвитку (атрофія, гіпертрофія), колір, консистенцію, малюнок волокон на поздовжньому розрізі, стан міжм'язевої сполучної тканини. Оглядаючи кістки, відмічають їхню цілісність, розмір, консистенцію (тверда, м'яка), вид надкісничі, кісткової тканини, кісткового мозку, форму суглобів, характер вмісту суглобової сумки.

Шматочки відібраного секційного матеріалу та органи зберігаються або в законсервованому вигляді у стерильному 50%-му гліцерині на ізотонічному розчині хлориду натрію (рН 7.4-7.6), або в замороженому при -20-70°C стані. Після розтину тварин і взяття патологічного матеріалу всі інструменти дезинфікують та стерилізують. Труп тварин, залишки корму та води, підстилку

знищують в спеціальних лабораторних крематоріях чи кремаційних печах або піддають автоклавуванню. Металеві клітки та годівниці знезаражують вогнем паяльної лампи чи обливають бензином та обпалюють. Дерев'яні предмети оброблюють гарячими дезинфікуючими розчинами.

### **Застережні заходи при роботі з інфікованими лабораторними тваринами**

Для догляду за лабораторними тваринами допускаються особи, що мають необхідну кваліфікацію і одержали спеціальний інструктаж по техніці безпеки роботи з інфекційним матеріалом. Осіб віком менше 18 років не слід допускати до роботи з інфікованими лабораторними тваринами. Особи що мають захворювання шкіри чи відкриті рани, можуть бути допущеними до роботи з лабораторними тваринами тільки з дозволу лікаря і за умовою дотримання санітарно-гігієнічних заходів (щільні захисні пов'язки, гумове взуття, тощо).

Особливу увагу слід приділяти заходам особистого захисту від небезпеки зараження. Під час роботи з лабораторними тваринами обслуговуючий персонал повинен бути одягненим згідно існуючим вимогам в спеціальний одяг та непроникне взуття, що легко дезинфікуються. Спецодяг та взуття повинні бути чистими, їх необхідно міняти не рідше одного разу на тиждень. Після використання гумовий одяг та взуття (фартухи, чоботи, рукавички) необхідно зразу ж вимити водою і продезінфікувати. Спецодяг слід використовувати тільки під час догляду за тваринами та їхнього обстеження, зберігати в спеціальних шафах в роздягальні окремо від повсякденного одягу.

Для осіб, що доглядають за лабораторними тваринами, необхідно створити умови для додержання особистої гігієни. В усіх душових кімнатах, а також в боксах, де утримуються тварини, необхідно мати посудини з дезинфікуючими засобами, гарячу та холодну воду, мило, рушник.

Під час роботи з лабораторними тваринами, особливо з птахами, необхідно стежити, щоб в приміщенні не було пилу.

Витягати тварин з кліток, брати їх в руки, проводити фіксацію, зараження, обстеження та умертвіння можуть тільки працівники, що мають досвід роботи в цій галузі. В залежності

від виду тварин необхідно застосовувати відповідні допоміжні засоби (пінцети, корнцанги, зажими, тощо) і використовувати певні захисні пристосування (гумові, шкіряні, металеві рукавички, тощо).

До дрібних тварин по можливості не слід доторкатися незахищеними руками. Під час досліджень з лабораторними тваринами, інфікованими патогенними для людини вірусами, роботу проводять під захисним ковпаком, за захисним екраном, в масці, захисних окулярах, рукавичках, використовуючи дихальні апарати з подачею повітря.

Інструменти, обладнання та прилади, що знаходяться в приміщенні для тварин і можуть бути заражені інфекційними збудниками, небезпечними для людини, слід дезинфікувати, якщо їх за якимись причинами виносять з приміщень для тварин.

Особливу увагу слід приділяти техніці безпеки при розтині трупів інфікованих лабораторних тварин. Щоб застерегти себе та оточуючих від зараження, трупи розтинають в спецодязі - халат темного кольору, прогумований, гумовий чи синтетичний фартух та нарукавники, гумові чоботи чи калоші, гумові рукавички, полотняна шапочка чи марлева косинка.

Перед розтином руки миють з милом, а при наявності на шкірі рук подряпин, тріщин чи задирок їх дезинфікують спиртовим розчином йоду і закривають колодієм чи пластиром. По закінченні розтину руки миють водою та дезинфікують 3%-м розчином фенолу чи хлораміну. Для знищення трупного запаху їх можна обробити 5%-м розчином хлоралгідрату або марганцевокислим калієм в розведенні 1:1000, а потім насиченим розчином щавлевої кислоти.

Спецодяг та інструменти обмивають водою та дезинфікують 3%-м розчином фенолу, хлораміну або креоліну. Приміщення чи робочий стіл після розтину трупів очищують водою і дезинфікують 3-4%-м розчином їдкого натрію. Трупи складають в спеціальну непроникну для рідини тару і піддають біотермічній утилізації.



## II. ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

*Дайте визначення основним поняттям і термінам:*

*Модельний об'єкт.....*

*.....*

*Інфекційний титр.....*

*.....*

*Тропізм.....*

*.....*

*Пасаж.....*

*.....*

*Ураження лабораторних тварин.....*

*.....*

*Імунізація лабораторних тварин.....*

*.....*

*Ад'ювант.....*

*.....*

*Евтаназія.....*

*.....*

*Індикація вірусу.....*

*.....*

*Ідентифікація вірусу.....*

*.....*

*Асептика.....*

*.....*

*Антисептика.....*

*.....*

*Контамінація.....*

*.....*

*Сироватка.....*

*.....*

*Плазма.....*

*.....*

### **III. ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ**

#### ***Задання 1. Демонстрація викладачем:***

а) огляду тварини перед експериментом; б) прийомів роботи зі стерильними інструментами, підготовки шприца та його наповнення інфекційним матеріалом; в) маркування, наркотизації, фіксації, депіляції та експериментального ураження тварин; г) евтаназії лабораторних тварин та розтину за Вагеном; д) відбору секційного патологічного матеріалу (мозку, легень, серця, печінки, селезінки та нирок).

#### ***Завдання 2. Відпрацювання прийомів маркування, наркотизації, фіксації та експериментального ураження тварин інтраназальним, інтравенозним, інтрамускулярним та інтраперитонеальним методами.***

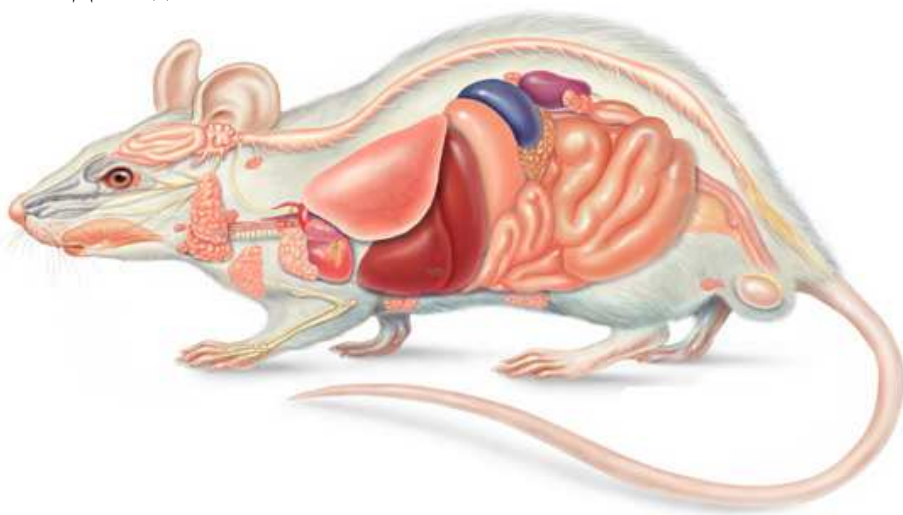
2.1. Проведіть маркування лабораторних тварин водними розчинами фуксину та пікринової кислоти. Наркотизуйте тварину шляхом інгаляції парами ефіру в ексикаторі чи шляхом ін'єкції. Зафіксуйте тварину на дошці для фіксації. Підготуйте стерильний шприц та наповніть його стерильним фізрозчином для відпрацювання експериментального інфікування лабораторних тварин. Проведіть експериментальне зараження лабораторних тварин інтраназальним, інтрамускулярним, інтравенозним та інтраперитонеальним методами.

2.2. Зазначте на малюнку типи введення вірусомісного матеріалу та його кількість.

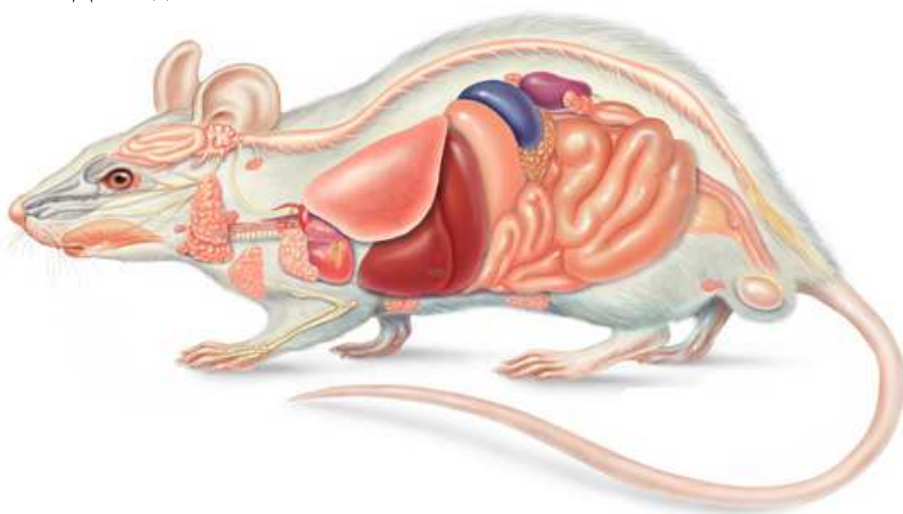
#### ***Завдання 3. Відпрацювання евтаназії тварин інгаляцією у замкненому просторі та наступного розтину за Вагеном, відбір секційного патологічного матеріалу від лабораторних тварин у стерильні чашки Петрі.***

3.1. Встановіть у заражених лабораторних тварин наявність чи відсутність візуальних симптомів хвороби. Відпрацюйте метод евтаназії заражених лабораторних тварин шляхом інгаляції парами ефіру в ексикаторі чи шляхом ін'єкції.

До завдання 2.2.:



До завдання 3.3.:





## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3

### Тема: Методи дослідження вірусів. Курячі ембріони та їх використання у вірусології

**Мета:** ознайомитися з основними методами дослідження вірусів, способами культивування вірусів, детекції їх основних компонентів та інфекційності.

**Компетенції:** знати і вміти визначити характер цитопатичної дії вірусів, ідентифікувати тип вірусної інфекції, обирати метод культивування та ідентифікації вірусу.

**Матеріальне забезпечення:** 9- та 11 -денні курячі ембріони, овоскоп, непатогенний для людини вірус грипу, штативи для фіксації ембріонів, спирт йодований, пробірки, чашки Петрі, піпетки на 2-5 мл, стерилізатори із стерильними інструментами, (шприци на 1 мл, пінцети анатомічні, голки ін'єкційні, ножиці), фізіологічний розчин, дезинфікуючий розчин, маркери, таблиці зі схемою курячого ембріону та методами його ураження. пакети для сміття (бажано такі, що герметично закриваються), мило, рушник.

### I. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Метод культивування вірусів на курячих ембріонах стали широко застосовувати після того, як Вудруфф та Гудпасчур в 1931р. описали зараження хоріоналантаїсної оболонки курячого ембріону вірусом курячої віспи. В 40-х роках з'явилося багато робіт по культивуванню різноманітних вірусів – віспи, вісповакцини, простого герпесу, лихоманки долини Ріфт, весняно-літнього енцефаліту, Омської геморагічної лихоманки та інших. Було відмічено, що існує деяка вибірковість у вірусів до тої чи іншої тканини. Віруси натуральної віспи добре розмножувались на хоріоналантаїсній оболонці, вірус паротиту – в амніоні, вірус грипу – в амніоні та в алантаїсній порожнині. Сьогодні майже в усіх вірусологічних лабораторіях проводять роботу на курячих ембріонах, тому що цю експериментальну модель зручно використовувати для:

- виявлення вірусу в патологічному матеріалі;

- первинного виділення вірусу;
- культивування, зберігання та накопичення вірусу в лабораторних умовах;
- титрування вірусів;
- як тест-об'єкт для реакції нейтралізації;
- визначення ефективності противірусних препаратів

### **Будова курячого ембріону**

Куряче яйце знаходиться в шкаралупі, через пори якої здійснюється газообмін. Під шкаралупою лежить підшкаралупна оболонка. У результаті запліднення в ході дробіння яйцеклітини утворюється три зародкових шари: ектодерма, мезодерма та ентодерма, з яких розвиваються тканини та органи ембріону. Разом з розвитком плоду утворюються екстраембріональні оболонки: амніон та хоріон (або серозна оболонка).

Амніон знаходиться безпосередньо біля зародку. Це мішок з рідиною, в якому розташоване тіло ембріону. Амніотична рідина на початку розвитку являє собою фізіологічний розчин солей, який надалі збагачується білком. Кількість амніотичної рідини на 10-11 день розвитку ембріону становить приблизно 1 мл.

Хоріон знаходиться безпосередньо під підшкаралупною оболонкою. На ранній стадії розвитку ембріону з нього утворюється виріст – алантоїс, що є порожнинним органом. У процесі розвитку алантоїс проходить між амніоном та хоріоном і оточує зародок разом з жовтком. Алантоїс розвивається дуже швидко, його максимальний ріст відбувається з 4-го по 13-й день розвитку. Оболонка алантоїсу частково зрощується з хоріоном, утворюючи хоріоналантаїсну оболонку. Це орган дихання зародку, тут розміщені кровоносні та лімфатичні судини. В останні дні розвитку ембріону хоріоналантаїсна оболонка атрофується, повітря поступає через пори шкаралупи і курча починає дихати легеньми.

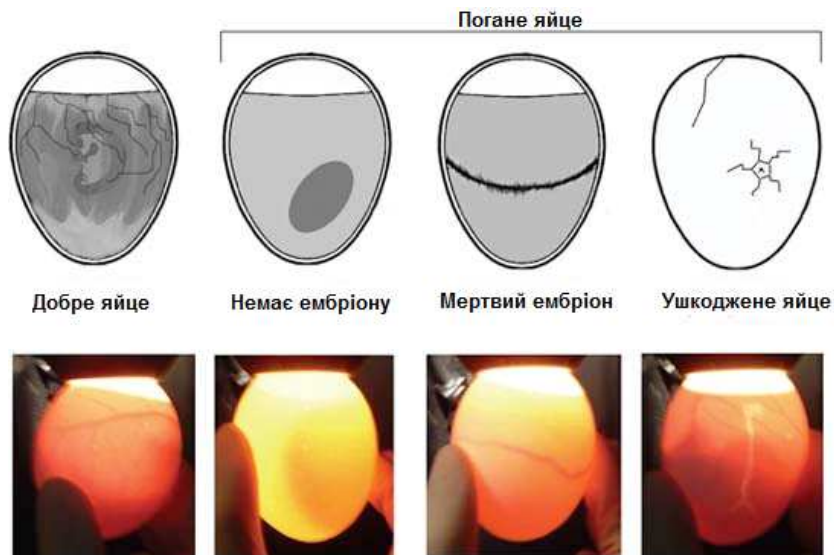
Алантаїсна порожнина – це орган виділення. На початку розвитку він заповнений прозорим фізіологічним розчином, а надалі збагачується уратами та речовинами, які містять азот та фосфор. З 12-13 дня розвитку рідина стає каламутною, а при охолодженні з неї випадає осад сечової кислоти. Кількість

алантоїсної рідини досягає 6-8 мл на 11-13 день розвитку і поступово зменшується.

Ембріональні тканини з великою кількістю клітин, що швидко діляться, з високим обміном речовин є дуже сприятливим середовищем для культивування вірусів. Особливо це стосується оболонок ембріону, які багаті клітинами зародкового епітелію. Суттєву роль для розмноження вірусів відіграє жовткова оболонка, що оточує жовток. Він є органом живлення і під час розвитку поступово зменшується. У період з 5-го по 12-й день інкубації курячі ембріони можуть бути використані для ураження вірусами. Ураження в ту чи іншу частини ембріону проводяться в період її максимального розвитку, коли кількість чутливих клітин найбільша.

### Підготовка курячих ембріонів до ураження

Ембріони доставляють із інкубатора. У лабораторії ембріони інкубуються в термостаті при температурі 37°C і вологості 60-70%. Ембріони розміщують повітряними камерами вверх у штативі.



*Овоскопування курячих яєць перед їх використанням*

Підготовка курячих ембріонів до ураження включає овоскопування та дезінфекцію шкарлупи, а також відповідну підготовку робочого місця. При овоскопуванні на шкарлупі олівцем помічають: межі повітряної камери, місце розміщення зародка та ділянку безсудинної зони розміром 0,5x0,5 см. Ці відмітки служать орієнтиром при виборі місця введення вірусомісного матеріалу. Місця ін'єкції обробляють йодованим спиртом.

### **Методи експериментального ураження курячих ембріонів**

Існує кілька методів ураження ембріонів. Найбільш часто використовують ураження в алантоїсну порожнину та в хоріоалантоїсну оболонку, рідше - в амніотичну порожнину та жовтковий мішок і зовсім рідко - в тіло зародка та кровonosні судини хоріоалантоїсної оболонки. Вибір методу залежить від тропізму вірусу, а також мети ураження. При будь-якому методі ураження вводять 0,1-0,2 мл інфекційного матеріалу.

#### *Ураження в алантоїсну порожнину.*

При ураженні цим методом добре розмножуються віруси грипу, хвороби Ньюкасла, ринопневмонії коней, везикулярного стоматиту та інші. Існує кілька варіантів методу.

Ембріон фіксують вертикально тупим кінцем вверху. У шкарлупі на 5-6 мм вище межі повітряної камери роблять отвір діаметром 1 мм. Голку вводять паралельно повздовжній вісі на глибину 10-12 мм. Після ін'єкції вірусомісного матеріалу голку виймають, а отвір в шкарлупі закривають краплею розплавленого стерильного парафіну.

Інший варіант методу полягає в тому, що зроблений у шкарлупі отвір над повітряною камерою використовують лише для виходу частини повітря. Отвір для самого



*Ураження в алантоїсну порожнину*



ураження роблять на ділянці безсудинної зони хоріоналантаїсної оболонки з боку зародка. Голку вводять на глибину 2-3 мм. Вводять вірусовмісну рідину об'ємом 0,1-0,2 мл і закривають отвір парафіном.

*Ураження в хоріоналантаїсну оболонку.*

Цей метод ураження курячих ембріонів використовують частіше для культивування епітеліотропних та пантропних вірусів: віспи, інфекційного ларинготрахеїту птахів, катаральної лихоманки вівці та ін. Ураження може бути виконано через природну або через штучну повітряну камеру.

Для ураження через природну повітряну камеру ембріон розміщують в штативі вверх повітряною камерою і в шкаралупі проти неї вирізають віконце діаметром 15-20 мм. Через нього пінцетом знімають підшкорлупну оболонку, а на оголену ділянку хоріоналантаїсної оболонки (ХАО) наносять 0,2 мл вірусовмісної суспензії, отвір закривають лейкопластирем або покривним склом, закріплюючи його парафіном.



*Ураження в хоріоналантаїсну оболонку*

Ураження через штучну повітряну камеру застосовують частіше, ніж через природну, тому що таке ураження забезпечує контакт вірусовмісного матеріалу з більшою поверхнею ХАО і як наслідок веде до утворення більшої кількості вірусу. Для

ураження ембріону цим методом його поміщають у штатив горизонтально зародком вверх. У шкаралупі роблять два отвори: один невеликий над центром повітряної камери (необхідний для відсмоктування повітря), а інший діаметром 0,2-0,5см збоку, зі сторони зародку. Складність методу полягає в тому, що роблячи другий отвір, необхідно спочатку зняти шматочок шкаралупи, потім, не ушкоджуючи ХАО, зсунути підшкаралупну оболонку в сторону так, щоб через утворений отвір могло пройти повітря. Після цього гумовою грушею через перший отвір відсмоктують повітря з природної повітряної камери. У результаті через боковий отвір повітря заходить в середину, утворюючи штучну повітряну камеру, дном якої є ХАО.

Через боковий отвір на поверхню ХАО наносять інфекційну рідину і отвір закривають лейкопластирем. Перший отвір немає необхідності закривати, так як внутрішній листок підшкаралупової оболонки при цьому методі ураження не порушується і продовжує виконувати роль бар'єру для мікрофлори оточуючого середовища. Подальша інкубація ембріонів, уражених цим методом, проводиться в горизонтальному положенні боковим отвором вверх.

#### *Ураження в жовточний мішок.*

Цим методом користуються найчастіше при роботі з вірусами хвороби Марека, ринопневмонії коней, катаральної лихоманки вівці. Уражають ембріони 5-7- денного, а інколи і 2-3 денного віку (вірус лихоманки долини Риф). Використовують два варіанти ураження. У першому варіанті ембріони поміщають у штатив вверх повітряною камерою, в шкаралупі над нею роблять розріз і вводять голку на глибину 3,5 - 4 см під кутом 45°С до вертикальної осі в напрямку, протилежному місцю знаходження зародку. Згідно другого варіанту ураження здійснюють на горизонтально закріпленому ембріоні, при цьому зародок знаходиться внизу, а жовток над ним. Отвір у шкаралупі закривають краплею розплавленого парафіну.

#### *Ураження в амніотичну порожнину.*

Для цього методу ураження використовують ембріони 6-10 денного віку. Метод використовується при культивуванні вірусів грипу, н'юкаслської хвороби, ринопневмонії коней та ін. Є два способи ураження:

- Закритий спосіб – яйце поміщають на овоскоп в горизонтальному положенні зародком вверху. Через отвір в шкаралупі над повітряною камерою вводять голку з тупим кінцем в напрямку до зародку. Доказом того, що голка проникла в амніон, є рух тіла зародка в напрямку руху голки.
- Відкритий спосіб – шкаралупу над повітряною камерою зрізують так, щоб утворився отвір діаметром 1,5-2,5 см. Через нього пінцетом знімають підшкаралупну оболонку. Потім анатомічним пінцетом захоплюють ХАО і підтягують до отвору. Притримуючи лівою рукою пінцет з фіксованою в ньому оболонкою амніону, вводять вірусомісний матеріал. Потім оболонки відпускають, отвір закривають лейкопластирем і ембріон інкубують у вертикальному положенні.

Описані методи найбільш часто використовують в лабораторній практиці. Ураження в тіло зародку та сосуди ХАО застосовують рідко.

*Ураження в тіло зародка.*

Для ураження використовують ембріони 7-12 денного віку.

Відомо два варіанти:

- Перший варіант – уражують так, як і в амніон закритим способом, з тією різницею, що беруть гостру голку і на овоскопі показником попадання голки в тіло вважають підпорядкування зародка руху голки.
- Другий варіант – уражують так, як і в амніон відкритим способом: через отвір в шкаралупі підтягують пінцетом тіло зародка. Матеріал вводять в головний мозок чи певні частини тіла. При таких методах ураженнях буває значний процент загибелі ембріонів.

Описані технічні прийоми експериментального ураження курячих ембріонів мають різні варіанти.

Уражені курячі ембріони поміщають до термостату для подальшої інкубації, в процесі якої проходить репродукція внесених вірусів та їх накопичення у відповідних структурах. Температура інкубації ембріонів варіює від 33 до 38 °С в залежності від властивостей вірусу, яким було проведено ураження. За ембріонами ведуть постійне спостереження, переглядають на овоскопі. Загибель ембріонів в перші 24 год

після ураження частіше зумовлена розмноженням грибів, бактеріальної мікрофлори, внесених в ембріон разом з інокулятом, або травмами при ураженні Ця загибель вважається неспецифічною. У більш пізні строки ембріони гинуть у результаті, як правило, розмноження вірусів.

При роботі з вірусом грипу слід пам'ятати, що найбільше накопичення досягається при зараженні розведеним вірусом. Масовані дози дають малий вихід вірусу за рахунок утворення дефектних інтерферуючих часток (феномен фон Магнуса) та іноді призводять до загибелі ембріону. Тому при серійних пасажах вірусу грипу, щоб отримати культуру з високим титром, використовують його розведення в межах  $10^{-3}$ - $10^{-4}$ .

Ембріони інкубують до моменту максимального накопичення вірусу. Для кожного вірусу і навіть для штаму цей строк є визначеним і варіює в межах від 2 до 7-8 діб. Потім ембріони охолоджують при  $4^{\circ}\text{C}$  протягом 3-4 годин і розтинають.

### **Ознаки розмноження вірусу в курячому ембріоні**

Показником ураження ембріона вірусом є його загибель у характерні для даного вірусу строки. Друга ознака розмноження вірусу – патологоанатомічні зміни, що з'являються у різних структурах ембріону. Наприклад, ХАО може мати набряк, крововиливи, вузли. Такі зміни спостерігаються при ураженні курячих ембріонів вірусами віспи птахів, інфекційного ларинготрахеїту птахів, хвороби Ауески та іншими.



*Поява бляшок на хоріонлантоїсній мембрані*

Сам зародок при цьому може відставати у рості і розвитку, тобто з'являється феномен карликовості.



### ***Нормальний та уражений вірусами зародок***

Внутрішні органи також можуть мати ознаки розмноження вірусу. Наприклад, набрякла жовто-зеленого або темно-зеленого кольору печінка курячого ембріону є ознакою розмноження в ньому вірусу гепатиту гусей.

Зустрічаються такі віруси (наприклад, штам В1 вірусу ньюкаслської хвороби), які, розмножуючись у курячих ембріонах, не викликають ні їх загибелі, ні патологоанатомічних змін. Виявити такий вірус можливо за рахунок реакції гемаглютинації або імуноферментного аналізу.

Іноколи при розтині ембріону не вдається виявити ознаки розмноження вірусу, хоча він і знаходиться у досліджуваному матеріалі. Такий пасаж називають «сліпим».

## **Розтин курячого ембріону та отримання вірусовмісного препарату**

Розтин курячих ембріонів здійснюють із дотриманням правил асептики. У залежності від тропізму вірусу, яким проводили ураження, вірусовмісним матеріалом можуть бути ХАО, тканини зародку, жовтковий мішок, а також алантоїсна та амніотична рідини. Екстраембріональні (алантоїсна, амніотична) рідини є готовою суспензією вірусів.

Перед розтином шкаралупу ембріону обробляють йодованим спиртом. Розтин роблять стерильними інструментами в боксі. Шкаралупу зрізують над повітряною камерою (природною чи штучною), при цьому яйце тримають під нахилом, щоб шкаралупа не впала в середину. Ножиці не повинні торкатись і пошкоджувати оболонку, що знаходиться під повітряною камерою, для цього зріз повинен проходити вище межі повітряної камери.

Алантоїсну рідину відбирають пастерівською піпеткою об'ємом до 10 мл, якою проколюють підшкаралупну оболонку і ХАО над тілом зародку

Амніотичну рідину об'ємом до 1 мл відбирають, вводячи піпетку в амніон між головою та тілом зародка під його, шиєю.

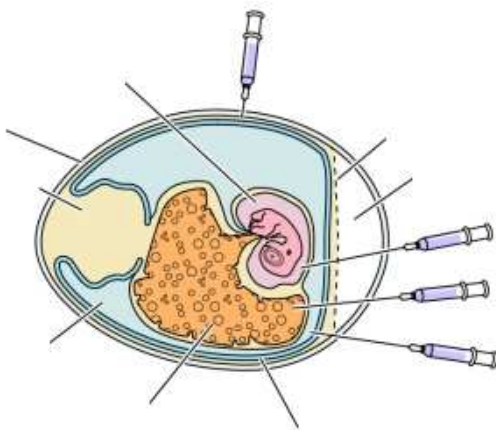
Хоріоалантоїсну оболонку вилучають таким чином. Спочатку ножицями підрізують оболонку і обережно виймають ембріон разом із жовтковим міхуром та білком в чашку Петрі, отримуючи таким чином деембріоноване яйце. Саму оболонку відокремлюють від шкаралупи і кладуть в стерильну чашку. Проводять макроскопічні дослідження. Найбільш характерні зміни спостерігають на оболонці у вигляді невеликих, округлої форми непрозорих вогнищ запалення, білуваті, перламутрові пляшки з некротичним центром.

## II. ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

**Завдання 1. Відпрацювання методики ураження курячих ембріонів та культивування вірусів на них.**

1.1. Ознайомтесь з будовою курячого ембріону за малюнками. Підготуйте курячий ембріон до ураження (овоскопування, визначення місця розміщення повітряної камери, великих кровоносних судин, тіла ембріону, обробка шкаралупи йодом). Підготуйте шприци з вірусовмісним препаратом для ін'єкцій. Проведіть ураження курячого ембріону непатогенним для людини вірусом грипу відкритим та закритим методами в хоріонлантоїсну оболонку, в алантоїсну порожнину, амніотичну порожнину, в жовточний мішок та тіло ембріону.

1.2. Зазначте на малюнку назви частин зародка та види ураження зародка.



**Завдання 2. Відпрацювання техніки відбору вірусовмісного матеріалу з курячих ембріонів.**

2.1. Проведіть розтин уражених курячих ембріонів. Отримайте вірусовмісний матеріал з органів інфікованих курячих ембріонів і деембріонуйте яйце.





## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4

### Тема: Методи дослідження вірусів. Використання клітинних культур у вірусології

**Мета:** ознайомитися з основними методами дослідження вірусів, способами культивування вірусів, детекції їх основних компонентів та інфекційності.

**Компетенції:** знати і вміти визначити характер цитопатичної дії вірусів, ідентифікувати тип вірусної інфекції, обирати метод культивування та ідентифікації вірусу.

**Матеріальне забезпечення:** фіксовані препарати зрізів тканин з ознаками цитопатичної дії вірусів, світловий мікроскоп, атлас із зображеннями цитопатичної дії вірусів різних систематичних груп.

### I. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Клітинні культури у вірусології використовуються з наступною метою:

1. Первинне виділення вірусів з оточуючого середовища або з патологічного матеріалу.
2. Накопичення вірусів (наприклад, при виготовленні вакцин та діагностикумів).
3. Підтримання штамів вірусів у лабораторних умовах.
4. Визначення інфекційного титру вірусів.
5. Вивчення динаміки взаємодії вірусів та клітин.
6. Ідентифікації вірусів.
7. Як тест-об'єкт у реакції нейтралізації.
8. Вивчення дії противірусних речовин.

Список типів клітин, які в теперішній час можливо культивувати, досить великий. Це елементи сполучної тканини (фібробласти), скелетні тканини (кістки та хрящі), скелетні, серцеві та гладенькі м'язи, епітеліальні тканини (печінки, легенів, молочної залози, шкіри, сечового міхура, нирок), клітини нервової системи (гліальні клітини та нейрони, хоча останні не мають здатності до проліферації), ендокринні клітини (наднирники, гіпофіз, клітини островків Лангерганса), меланоцити та багато різних типів клітин пухлин.

## Класифікація тваринних культур клітин

Класифікація клітин, що культивуються *in vitro*, пов'язана з певними труднощами. Спочатку тканинними культурами називали експланти цілих фрагментів тканин, вважаючи, що в цих фрагментах, хоча б частково, підтримується гістологічна цілісність. Тепер термін «культура тканини» перетворився на загальне поняття, яке включає в себе як органну культуру, в якій найбільші фрагменти тканини чи цілі ембріональні органи експлантуються зі збереженням тканинної архітектури, так і культури клітин, коли тканини диспергуються механічно, ферментативно чи шляхом спонтанної міграції клітин з експланта, і клітини розмножуються у вигляді суспензії чи моношару клітин, що приєдналися до субстрату.

**Органна культура** (культура тканин) зберігає міжклітинні взаємодії, протягом тривалого періоду зберігає гістологічне та біохімічне диференціювання та після початкової травми залишається, як правило, в незростаючому рівноважному стані протягом декількох днів і навіть тижнів. Ці культури не завжди здатні до розмноження.

**Культури клітин**, навпаки, позбавлені структурної організації, втрачають характерну гістотипічну архітектуру та пов'язані з нею біохімічні ознаки і, як правило, не досягають рівноважного стану при відсутності специфічних умов. Клітини в культурах розмножуються, що забезпечує отримання великої маси клітин та їх розділення на ідентичні паралелі. Клітини, що культивуються, можуть бути охарактеризовані, та визначена клітинна популяція, яка може бути збережена шляхом заморожування. Клітини ідентифікують за фенотиповими ознаками, шляхом вирощування в селективному середовищі, фізичним відбором, клонуванням чи генетично для отримання великої кількості відносно однорідних клітин.

Усі клітинні культури можна поділити на два типи: **переживаючі** (органні культури, проліферація яких в умовах *in vitro* досить обмежена або відсутня) та **ростучі** (здатні розмножуватися в умовах *in vitro*). Ці типи, у свою чергу, теж мають поділ. Переживаючі органні культури поділяють на ті, що культивуються в рідкому середовищі (можуть існувати до 30 днів

і навіть здатні до обмеженої проліферації), й ті, що культивуються на твердому середовищі.

Ростучі культури поділяють на культури фіксованих шматочків тканин, одношарові та суспензійні культури клітин. Культури фіксованих шматочків клітин включають в себе: капельно-плазмені культури, культури, що вирощуються у флаконах Карреля, культури у нерухомих пробірках та в пробірках, що обертаються. У вірусологічній практиці, в основному, використовують два останніх типи культур клітин.

### Одношарові культури клітин

Принцип методу одношарових культур клітин полягає у вирощуванні клітин, отриманих, як правило, шляхом ферментативної дезінтеграції на скляній поверхні у вигляді моношару, і базується на явищі адгезії – здатності клітин прикріплюватися до скляної поверхні. До одношарових культур відносять *первинні*, або *первинно-трипсинізовані*, *диплоїдні*, *гетероплоїдні* та *постійні* (перещеплювані) культури клітин.

**Первинна культура клітин** (первинно-трипсинізована культура) – культура, яка походить від клітин та органів, взятих безпосередньо з організму. Для отримання первинних культур клітин використовують різноманітні тканини та органи людини і тварин. Після відповідної обробки їх подрібнюють на фрагменти 1-2 мм та оброблюють протеолітичними ферментами (трипсин, версен, колагеназа), які руйнують міжклітинні зв'язки, внаслідок чого отримують завесь окремих клітин, які легко підрахувати.

Культури називають первинними до початку пасування чи субкультивування.

Як правило, культури, отримані з ембріональних тканин, характеризуються кращим виживанням та більш активним ростом, у порівнянні з культурами з відповідних дорослих тканин. Це відображає більш низький рівень спеціалізації та наявність стовбурових клітин в ембріонах. Отримання первинних культур клітин дорослих тканин (в основному з нирок) та їх розмноження є більш складним завданням, і тривалість життя таких культур, як правило, не велика

(максимум 20 генерацій при культивуванні *in vitro*, у порівнянні з 50 генераціями первинних клітин, отриманих з ембріональних тканин). Первинні культури клітин мають різну чутливість до вірусів (табл.). Така чутливість визначається типом тканини, з якої була отримана первинна культура, і тропізмом вірусу.

Приклади первинних культур клітин – клітини нирок ембріону людини, нирок макаки-резус, нирок африканської зеленої мавпи, нирок ембріону свині, фіброласти курячих ембріонів та ін.

Табл.

**Чутливість первинних культур клітин до вірусів людини**

Походження культури клітин	Віруси
Нирка ембріону людини	Аденовіруси (1-33), ріновіруси (1-55), вірус кору
Нирка макаки-резус	Поліовіруси (1-3), Коксаки А (2-4,7-1 1,13-18,20-24) і В (1-6), грипу А і В, парагрипу (1,2,4), кору, паротиту, реовіруси (1-3), аденовіруси (1-18, 20, 25-33), ротавіруси, цитомегаловірус, вірус гепатиту А.
Нирка африканської зеленої мавпи	Вірус вісповакцини, поліовіруси (1-3), ротавіруси, арбовіруси (група кліщового енцефаліту), тогавіруси
Фіброласти курячих ембріонів	Віруси східного, західного та венесуельського кінського енцефаломієліту, вірус лісу Семлікі, Синдбіс, Охотський, віруси віспи, хвороби Ньюкасла.
Нирка ембріону свині	Аденовіруси (1-33), реовіруси, поліовіруси (1-3), вірус грипу А та В, віспо вакцини.

З часу отримання субкультури первинна культура отримує назву **клітинна лінія**. Клітинні лінії можуть мати обмежений час існування *in vitro* (наприклад, диплоїдні фіброласти людини і тварин), а можуть розмножуватися *in vitro* необмежено довго (постійні, безперервні або перещеплювані клітинні лінії).

**Штам клітин** це популяція однорідних клітин (за одним чи декількома маркерами), які зберігають специфічні властивості протягом обмеженого періоду культивування. Штам клітин

може походити з первинної культури чи від лінії клітин шляхом селекції чи клонування клітин із специфічними властивостями.

**Клоновими лініями**, чи **клонами**, називають культури, вирощені з однієї ізольованої клітини.

Після висіву клітин на поживне середовище вони входять у фазу адаптації, або лаг-період, тривалістю 2-24 години, після якого починається період експоненційного росту (логарифмічна фаза) – кількість клітин збільшується удвічі через правильні проміжки часу. У кінці цього періоду клітини досягають правильного моношару і входять у період уповільненого росту чи спокою (стаціонарна фаза чи фаза плато). Якщо на даному етапі культивування не відбудеться перенесення клітин на свіже поживне середовище, то настає фаза старіння та загибелі клітин. Розмножуючись, клітини розміщуються на поверхні скла і при повному його покритті в один шар контактують одна з одною і перестають ділитися (спостерігається вище контактного гальмування). На склі формується шар товщиною в одну клітину, тому такі культури клітин називають **одношаровими** чи **моношаровими**.

Як правило, моношар формується через 3-5 діб. Швидкість його формування залежить від виду тканин, віку донора, якості поживного середовища, посівної концентрації клітин та інших факторів.

Поживне середовище замінюють по мірі його забруднення продуктами життєдіяльності клітин. Моношар зберігає свою життєздатність впродовж 7-21 діб (у залежності від виду клітин та поживного середовища).

**Лінії диплоїдних клітин** (напівперещеплювані лінії клітин) – це клітинні лінії, в яких, принаймні 75% клітин мають каріотип нормальних клітин вихідного типу; такі культури клітин, трансплантовані хом'ячкам, не проявляють онкогенної активності. Диплоїдний набір хромосом не завжди еквівалентний диплоїдному каріотипу, оскільки існують умови, при яких клітина може втрачати один тип хромосом і набувати інший. Це значить, що каріотип клітини змінився, а диплоїдний набір хромосом зберігся. Такі клітини слід вважати «псевдо диплоїдними». Диплоїдні культури можуть пасуватися багаторазово (диплоїдні штами), витримуючи до 80

популяційних поділів. Слід зазначити, що культури диплоїдних клітин дуже вибагливі до умов культивування, тому їх рідко використовують у вірусологічній практиці. Часто диплоїдні клітинні культури називають напівперещепленими культурами клітин.

Приклади диплоїдних культур клітин – WIT-38 (фібробласти легень людини), MRC-5 (диплоїдні фібробласти людини), ТМ 4 (лінія клітин тестикулярного епітелію миші) та ін.

У випадку, коли клітинна лінія має менш ніж 75% клітин із диплоїдним набором хромосом, говорять про *лінію гетеродиплоїдних клітин*. Цей термін не означає, що клітини злякисні чи здатні до необмеженого росту.

*Постійна* (безперервна, перещеплювана) *клітинна лінія* – складається із клітин одного типу, що здатні субкультивуватися поза організмом протягом необмеженого числа пасажів. Постійні клітинні лінії отримують із пухлинних або нормальних тканин людини або тварин, які мають змінений (трансформований) каріотип. Використання постійних культур клітин у вірусологічній практиці має певні переваги в порівнянні з первинними та диплоїдними культурами клітин.

На рівні сучасних знань про поведінку клітин, що культивуються *in vitro*, неможливо визначити точку, коли культура стає стабільною, тобто набуває здатності рости необмежено довго. На основі дослідів з фібробластоподібними клітинами людини встановлено, що культура повинна субкультивуватися не менш ніж 70 разів, з інтервалом у три доби, перш ніж її можна вважати безперервною лінією клітин.

У постійних культурах клітин клітини трансформовані. Під трансформацією клітин розуміють незворотні клітинні зміни, які характеризуються зміною ростових властивостей клітин, що культивуються. Трансформація робить клітини «безсмертними» і менш залежними від поживних та «геометричних» факторів росту. Зміни ростових властивостей пов'язані з порушенням транспорту через клітинну мембрану і є однією з адаптивних властивостей, які дозволяють клітинам розмножуватися в умовах, несприятливих для нетрансформованих батьківських клітин. При цьому клітинні мембрани втрачають поверхневий білок (250 кДа) і дещо змінюють антигенні властивості.

Спонтанна трансформація культур клітин нормальних тканин є відносно рідкісним явищем. Частоту таких трансформацій можна збільшити, оброблюючи клітини мутагенами чи деякими вірусами (наприклад, SV-40, вірус Епштейна-Барр та ін.).

Трансформовані клітини можуть утворювати пухлини у імунологічно толерантних тварин. За цією ознакою трансформація інколи неправомірно прирівнюється до злоякісних змін.

При взаємодії вірусів з клітинами культури тканин спостерігаються різні зміни, зумовлені рядом факторів. Серед них велике значення має ступінь чутливості клітин культури до вірусу та умови середовища. Постійні культури відрізняються за ступенем своєї чутливості до вірусів. Як правило, для культивування певних вірусів підбирають такі культури, в яких зміни під впливом вірусної інфекції є найбільш виразними.

Приклади постійних культур клітин: SV-28 – постійна культура нирки новонародженого хом'яка, трансформована вірусом SV-40; MCF-7 – карцинома молочної залози людини; HeLa – карцинома шийки матки людини; Hep-2 – карцинома гортані людини; KB – карцинома ротової порожнини людини; RH – нирка ембріону людини; Vero – клітини нирок зеленої мавпи; L – мишачі фібробласти; C-1300 – нейробластома миші; СПЕВ – нирка ембріона свині та ін.

Метод культивування клітин у суспензії широко ввійшов у вірусологічну практику у зв'язку з його перспективністю при накопиченні великої кількості клітин. Цей метод затвердив себе у виробництві ферментів та інших продуктів життєдіяльності бактеріальних клітин, проте адаптація клітин ссавців до суспензійних умов має певні труднощі, так як клітини тварин, у порівнянні з бактеріальними, більш чутливі до фізичних факторів, легше осаджуються, досить вимогливі до складу поживних середовищ і повільніше розмножуються.

Розповсюдженню методу суспензійного культивування сприяло введення ферментативного диспергування тканин тварин і, особливо, виведення постійних клітинних ліній, які виявилися здатними до необмежено тривалого пасування у суспензійному стані.

## Суспензійні культури клітин

Переваги методу культивування клітин у суспензіях:

- висока однорідність суспензій;
- можливість підтримання клітин у логарифмічній фазі росту;
- перспективи математичного моделювання процесів клітинного росту в залежності від впливу факторів зовнішнього середовища;
- зручність багатократного дослідження фізіологічного стану культури клітин у суспензії;
- висока економічність методу.

У зв'язку з цим великого значення набули дослідження штамів клітин, які здатні до тривалого розмноження в суспензійних умовах культивування. Так, були адаптовані багато постійних культур клітин до розмноження в цих умовах (ВНК-21, Нер-2 та ін.). Крім того, потрібно зазначити, що кровотворні клітини краще ростуть у суспензійній культурі.

Запропоновано декілька підходів, які дозволяють культивувати клітини у стані завису: *batch-культури* (розмноження в суспензії забезпечується безперервним перемішуванням завису в умовах постійності середовища), проточні системи (хемостати, турбідостати), застосування мікроносіїв (сефадекс, силікагель, цитолар та ін.). Культивування на мікроносіях в наш час є досить популярним методом, оскільки дозволяє вирощувати залежні від прикріплення до твердого субстрату клітини (первинні, субкультури, диплоїдні) в умовах суспензії.

### Умови культивування клітин *in vitro*

Перенесення клітин цілісного організму в штучні умови життя припиняє їх існування як одного з чисельних елементів тканини або органу, до складу яких вони раніше входили. При цьому клітини виходять із під контролю нейрогуморальних факторів організму і набувають таких особливостей, які залежать від самого факту їх існування у штучних умовах. Це проявляється, насамперед, в збільшенні швидкості розмноження клітин у культурі порівняно з їх розмноженням в організмі тварини.



Культивування клітин *in vitro* залежить від наступних факторів:

1. *Дотримання стерильності*, яка необхідна для забезпечення захисту культур від контамінації їх бактеріями, грибами, вірусами та клітинами інших культур. Стерильними повинні бути приміщення, в яких відбувається маніпуляція з культурами клітин, посуд, інструменти, поживні середовища, вихідна тканина та ін.

2. *Щільності популяції клітин*. При досягненні певної межі щільності популяції клітин у певному об'ємі подальше розмноження клітин припиняється. Це стосується як клітин, що схильні до контактного гальмування, так і гетероплоїдних клітин, що формують багат шарові пласти на склі. Щільність популяції клітин в постійних культурах у суспензії не повинна перевищувати  $5 \times 10^6$  кл/мл. Для перфузійних клітин в хемостатах, де періодично здійснюється подача поживного середовища й видалення продуктів метаболізму, диплоїдні, псевдодиплоїдні та гетеродиплоїдні клітинні лінії утворюють щільні популяції ( $2 \times 10^9$  кл/мл) та багат шарові культури.

3. *Вмісту поживного середовища* – неорганічних речовин, вуглеводів, білків, амінокислот, гормонів, вітамінів та інших біологічно-активних речовин, газового середовища. Так, двоокис вуглецю є продуктом обміну і відразу зв'язується з катіонами середовища. Іон двоокису вуглецю виконує функцію буфера у більшості поживних середовищ. Для підтримання певного тиску двоокису в атмосфері її додатково вводять в суди для культивування чи закривають їх герметично і той двоокис, що утворився в процесі культивування, зберігається.

4. *pH середовища*. Для оптимального росту більшість клітин *in vitro* оптимум рН біологічних рідин має бути між 7,2-7,6 та небажано відхилення рН від меж 6,8-7,8.

5. *Температури культивування*. Для більшості клітин ссавців та птахів оптимальною є температура 37-38,5°C. Якщо температура підвищується, це згубно діє на клітини, і при температурі 45°C клітини гинуть протягом однієї години, епітеліальні клітини шкіри та інших тканин ембіону людини краще ростуть при температурі 35-36°C. Більшість клітин

риб культивують при температурі не вище 20°C. Тканини амфібій також краще виживають при низькій температурі.

6. *Осмотичного тиску.* Для клітин ссавців оптимальним при 37-38°C є тиск 7,6 атм, хоча клітини можуть переносити значні коливання тиску, якщо ці коливання відбуваються не дуже швидко. Осмотичний тиск визначається, головним чином, іонами хлористого натрію, інші іони також суттєво впливають на осмотичний тиск, оскільки він значно збільшується при підвищенні концентрації глюкози.

### **Поживні середовища**

Розрізняють природні та штучні (синтетичні та напівсинтетичні) поживні середовища. Природні середовища складаються із суміші сольового розчину (наприклад, розчину Хенкса, Ерла), сироватки крові, тканинного (ембріонального) екстракту, коров'ячої амніотичної рідини та інших компонентів. Вміст кожного з компонентів в різних сумішах середовищ значно варіює. Цей тип середовищ використовують рідко.

На сьогодні, в основному, використовують штучні поживні середовища. До напівсинтетичних поживних середовищ відносять гідролізати різних білкових продуктів (гідролізат лактальбуміну, гемогідролізат, м'язевий ферментативний гідролізат, амінопептид та ін.). Серед синтетичних поживних середовищ найбільш широко застосовують середовище 199 та середовище Ігла. До їх складу входить більш ніж 60 компонентів (амінокислоти, вітаміни, компоненти нуклеїнових кислот, джерело ліпідів та вуглеводів, мінеральні солі та ін.). У всі поживні середовища та деякі сольові розчини для визначення рН додають індикатор – *феноловий червоний* (в концентрації 0,002%, який не має токсичного впливу на клітини та віруси). Додавання індикатора дозволяє визначити момент закислення поживного середовища продуктами метаболізму клітин до рівня, який потребує заміни поживного середовища на нове (рН<7; середовище забарвлюється в жовтий колір). При підвищенні рН розчин набуває червоно-малинового кольору. При нейтральному рН (7,2-7,4) колір середовища жовтогарячий. Для регулювання рН поживних середовищ використовують 7,5%-ий розчин бікарбонату натрію та 3%-ий розчин оцтової кислоти.



*Лунковий планшет для культивування клітин з поживним середовищем.*



*Заміна поживного середовища при культивуванні клітин*

Усі поживні середовища за функціональним призначенням можна поділити на *ростові* та *підтримуючі*. Ростові поживні середовища забезпечують існування та розмноження клітин і містять 2-10% сироватки крові.

Ці поживні середовища застосовують, як правило, в перші дні культивування клітин. Підтримуючі поживні середовища забезпечують життєдіяльність клітин, але не їх розмноження. Вони не містять сироватки крові. Їх використовують для культивування клітин після зараження їх вірусами.

### **Контамінація культур клітин**

Вірусологічні дослідження, які проводяться з використанням клітинних культур, потребують постійного контролю присутності сторонніх мікроорганізмів (контамінантів) – вірусів, бактерій, грибів, мікоплазм та клітин інших клітинних культур. На відміну від організму людини, імунна система якого володіє багатьма різноманітними механізмами захисту від інфекцій, клітини в культурі *in vitro* захищені лише обережністю роботи дослідника.

Найпоширенішими контамінантами клітинних культур є мікоплазми. І хоча культури первинних клітин не забруднені мікоплазмами, багато ліній і штамів постійних клітин мають таке забруднення. Джерелом мікоплазм можуть бути сироватка тварин, яка частіше за все буває забруднена та *Microplasma arginini*, а також власне дослідники, оскільки *M. hominis*, *M. pharingis* та *M. salivarium* легко виділяються з порожнини рота та глотки людини. Забруднення культур клітин мікоплазмами не є таким очевидним, як бактеріями. У зв'язку з цим їх своєчасне виявлення – важлива умова підтримання високої якості культури клітин. Крім того, невиявлені та не видалені мікоплазмені інфекції, як і інфекції, викликані іншими контамінантами, можуть змінювати метаболізм клітин, викликати хромосомні порушення, впливати на сприятливість клітин до вірусів, що досліджуються. Особливо це стосується латентних інфекцій.

Попередити розмноження та знищити бактерії, мікоплазми та гриби вдається за допомогою протимікробних препаратів (антибіотики та ін.), які додаються в ростові середовища

безпосередньо перед їх використанням. Однак, при тривалому культивуванні клітинних культур застосування антибіотиків не бажано. Тому при роботі з клітинами необхідно дотримуватися стерильних умов роботи для запобігання забруднення мікроорганізмами, та проводити адекватні тести для оцінки їх ефективності.

### **Методи виявлення та ідентифікації вірусів у клітинних культурах**

Існують наступні основні методи індикації (виявлення) вірусів у культурі клітин:

- за цитопатичним ефектом чи цитопатичною дією (ЦПЕ, ЦПД);
- за виявленням внутрішньоклітинних включень;
- електронною мікроскопією;
- в реакціях імуноферментного та радіоімунного аналізу (ІФА, РІА);
- в реакції гемадсорбції (РГАд);
- в реакції імунофлюоресценції;
- за виявленням інтерференції вірусів;
- за пригніченням метаболізму клітин (кольорова проба);
- за утворенням бляшок.

### **Цитопатичний ефект**

Лабораторна діагностика вірусних інфекцій часто вимагає виділення вірусу в культурі клітин. До клітинних моношарів вносять відповідні клінічні зразки, спостерігаючи згодом за цитологічними змінами, які вказують на репродукцію вірусу.

Термін **«цитопатичний ефект»** (ЦПЕ) використовуються для позначення вірус-індукованих клітинних змін, які можна побачити у світловому мікроскопі. До цих змін належать набухання або стиснення клітин, утворення багатоядерних гігантських клітин (синцитій), і утворення «включень» (візуалізовані при відповідному фарбуванні зразків) в ядрі та/або цитоплазмі інфікованої клітини.

Найефективніший спосіб продемонструвати клітинні зміни є фарбування хроматичними барвниками. Клітинні моношари фіксуються, після чого обробляються основними та кислотними

барвниками, які підкреслюють характер і місце зміни. По відношенню до барвників включення поділяють на базofilні (фарбуються основними барвниками – азур, піроксин) та ацидофiльні або оксифiльні включення (фарбуються кислими барвниками – еозин, кислий фуксин).

За своєю природою включення можуть бути місцями утворення вірусних часток (фабрики віріонів – тільця Гварнієрі), скупченням вірусів (тільця Бабеша-Негрі, поліедри), глибокими хроматину (тільця Каудрі).

Використання гематоксиліну (основний барвник) та еозину (кислотний барвник) використовується найчастіше і позначається як ГЕ фарбування (*H&E staining*).

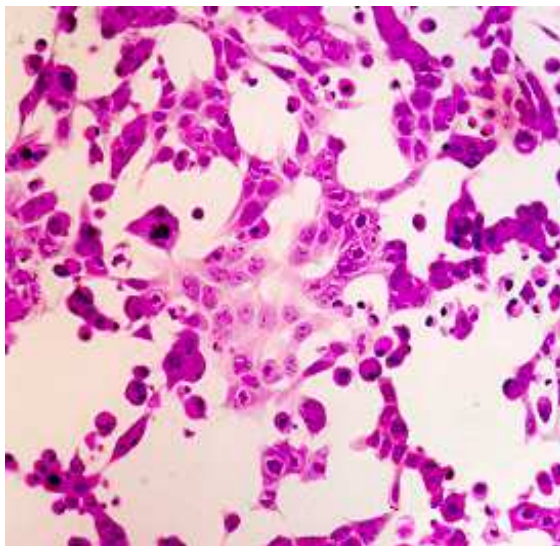
Загальний зовнішній вигляд клітинних змін, а також розташування і характер «включень» – базofilні та/чи еозинофiльні – може в багатьох випадках бути використаний як діагностичний критерій для визначення вірусу.

*Табл.*

***Приклади цитопатичного ефекту при ураженні вірусами різних систематичних груп***

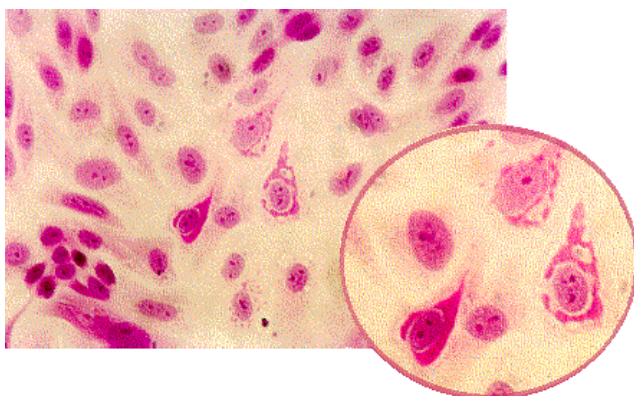
Вірус поліомієліту	Цитоцидний (клітинна загибель)
Вірус папіломи	Ацидофiльні включення у ядрі
Аденовірус	Базофiльні включення у ядрі
Вірус сказу	Ацидофiльні включення у цитоплазмі
Вірус цитомегалії	Ацидофiльні включення у ядрі і цитоплазмі
Вірус кору	Злиття клітин
Вірус поліоми	Трансформація
ВІЛ	Деструкція Т клітин

Клітини інфіковані ***аденовірусом*** мають спорідненість до гематоксиліну (пурпурово-синій барвник). Заражені клітини стають округлими і клітинний шар відкріплюється. Темні базофiльні включення у ядрах представляють накопичені вірусні білки у місці збирання вірусу.



*Мікрофотографія цитопатичної дії аденовірусів*

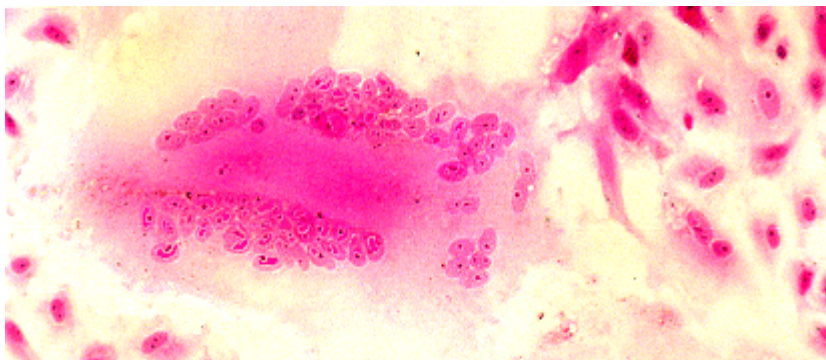
Реплікація **реовірусів** відбувається у цитоплазмі клітини і на кінцевих етапах збирання віріони вибруньковуються з мембрани ендоплазматичного ретикулуму. Цитоплазматичні сайти накопичення вірусних білків зафарбовуються еозином (насичений рожевий).



*Мікрофотографія цитопатичної дії реовірусів*

Багато оболонкових вірусів містять **фузійні білки** в оболонці. Це забезпечує здатність віріону зливатися з мембраною клітини-господаря, забезпечуючи тим самим проникнення інфекційного генетичного матеріалу у цитоплазму клітини. Протягом реплікації вірусу, експресія фузійного білка та його розміщення на плазматичній мембрані призводить до злиття сусідніх клітин та формування багатоядерних клітин або **синцитію**.

Дуже великий синцитій може утворюватися при реплікації **вірусу кору** у клітинній культурі. Додаткова вирізняюча ознака кору – присутність еозинофільних включень в ядрах інфікованих клітин. У синцитії багато ядер згруповані навколо еозинофільної цитоплазматичної маси, що представляє собою компартменти комплексу Гольджі злитих клітин. Внутрішньоядерні включення чітко візуалізуються.

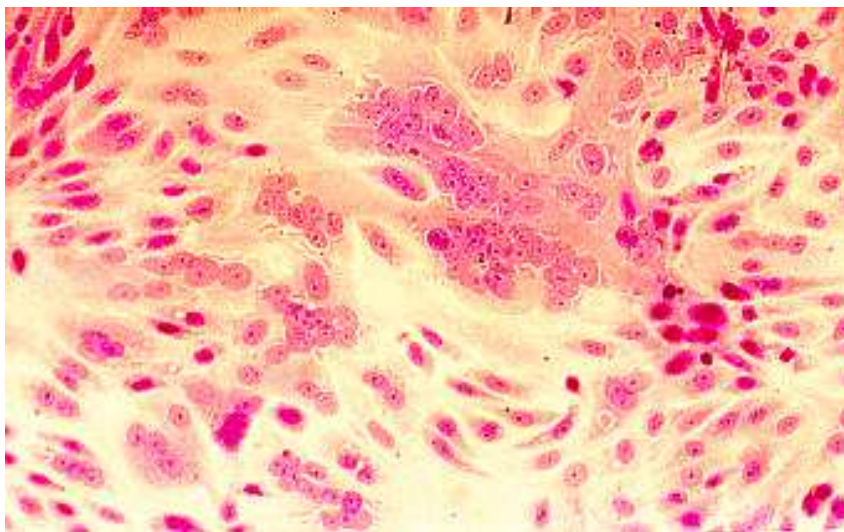


*Мікрофотографія цитопатичної дії вірусу кору*

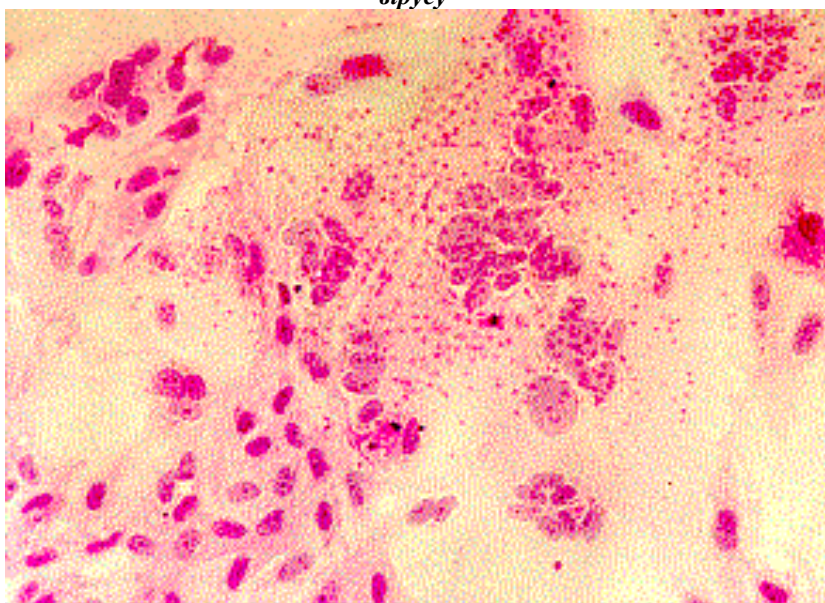
Як вказує назва вірусу, **респіраторно-синцитіальний вірус** (РСВ) викликає утворення великого синцитію. Ядра не містять включень, але бліді еозинофільні включення можуть візуалізуватися у цитоплазмі.

ЦПЕ **вірусу паротиту** не відрізняється від такого РСВ. Проте вірус паротиту кодує білок гемаглютинін, що розміщується в оболонці вірусу та виявляється на поверхні клітини у місцях, де згодом будуть вибруньковуватися новоутворені віріони.





*Мікрофотографія цитопатичної дії респіраторно-синцитіального вірусу*

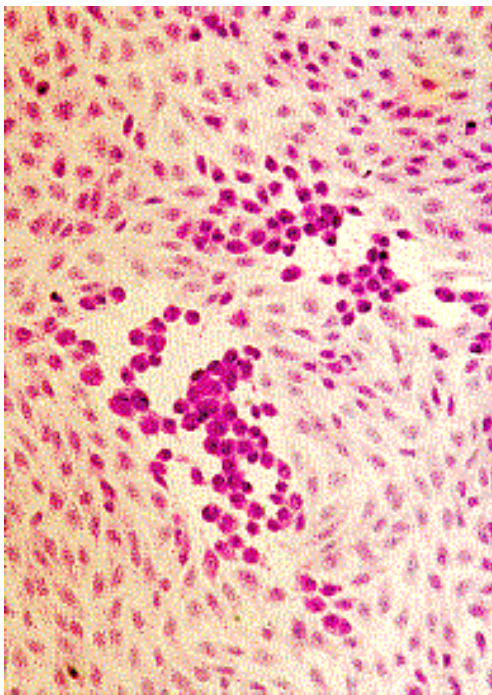


*Мікрофотографія цитопатичної дії вірусу паротиту*

Якщо до інфікованого клітинного моношару додати еритроцити, вони адсорбуватимуться на поверхні інфікованих клітин. Цей процес отримав назву *гемадсорбція*, що дозволяє відрізнити інфекції, викликані вірусом паротиту та РСВ.

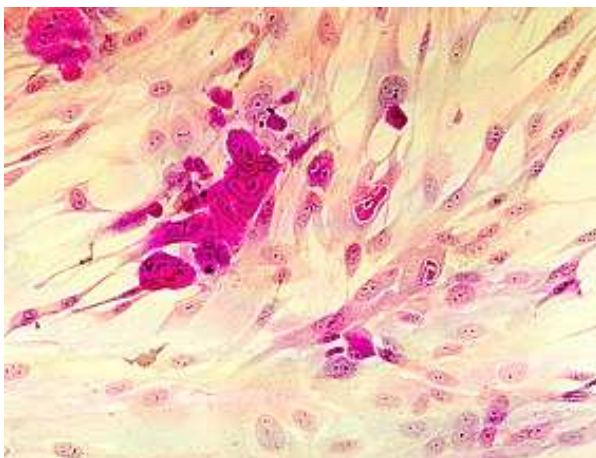
Усі *герпесвіруси* відтворюються у ядрі клітини. Накопичення вірусних білків призводить до утворення вирізняючих еозинофільних внутрішньоядерних включень. Незначні відмінності у ЦПЕ дозволяють відрізнити різні типи герпесвірусів.

Вирізняючі вогнища чи бляшки округлих клітин дозволяє типувати інфекцію ВПГ-1. Ядра стають деформовані та містять еозинофільні включення. До інших проявів ЦПЕ належать формування «гігантських клітин», а також багатоядерного синцитію (більш характерно для ВПГ-2).



*Мікрофотографія цитопатичної дії вірусу простого герпесу*

**Цитомегаловірус** людини реплікується лише у клітинах фібробластів (не в епітеліальних клітинах). Вірус репродукується повільно і тому вогнища малі та дискретні. Характерні еозинофільні включення типу «совиного ока» виявляються у ядрах інфікованих клітин.



*Мікрофотографія цитопатичної дії цитомегаловірусу*

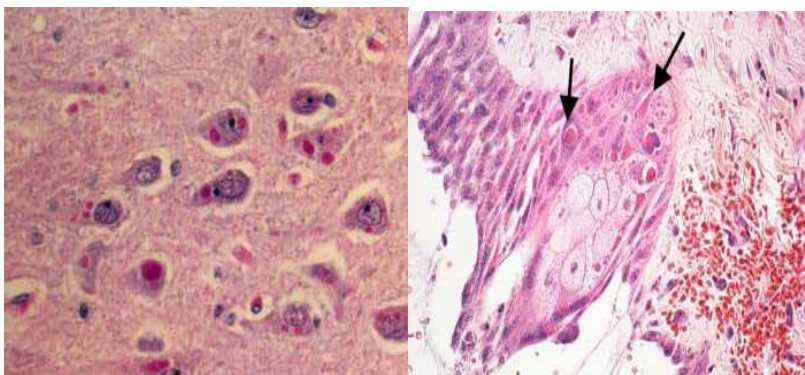
**Вірус варицела-зостер** реплікується як в епітеліальних клітинах, так і у фібробластах. Розвиток ЦПЕ займає більше часу, що відрізняє цю інфекцію від інфекції, викликаной ВПГ.



*Мікрофотографія цитопатичної дії вірусу варицела-зостер*

Ядра інфікованих клітин стають збільшеними та характеризуються наявністю виразних еозинофільних внутрішньоядерних включень. Округлення клітин та висока афінність до еозину характеризують пізні стадії інфекції.

При інфікуванні *вірусом сказу*, на гістологічних зрізах виявляються тільця Бабеша-Негрі.



*а*

*б*

*Тільця Бабеша-Негрі (а) і Гварнієрі (б)*

Ці еозинофільні чіткої форми включення мають діаметр 2-10 мкм в діаметрі і знаходяться в цитоплазмі нервових клітин, що містять вірус сказу (особливо в «рогах Аммона» у гіпокампі. Вони часто також виявляються в корі мозочка у секційному матеріалі мозку жертв сказу. Вони складаються з рибонуклеопроїнів, які продукують вірус.

При інфікуванні організму поксвірусами (вірус натуральної віспи) виявляються тільця Гварнієрі (включення В типу). При фарбуванні зразків еозином ці включення виявляються у вигляді рожевих крапель різного розміру в цитоплазмі уражених епітеліальних клітин. Тільця Гварнієрі є сайтами вірусної реплікації.

## II. ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

*Дайте визначення основним поняттям і термінам*

*Культура клітин.....*

*.....*

*Клітинна лінія.....*

*.....*

*Поживне середовище.....*

*.....*

*Середовище Ігла.....*

*.....*

*Штам клітин.....*

*.....*

*Первинна культура клітин.....*

*.....*

*Лінія гетеродиплоїдних клітин.....*

*.....*

*Постійна клітинна лінія.....*

*.....*

*Цитопатичний ефект.....*

*.....*

*Синцитій.....*

*.....*

*Гемадсорбція.....*

*.....*

*Клітинні включення.....*

*.....*

*Тільця Каудрі.....*

*.....*

*Тільця Бабеша-Негрі.....*

*.....*

*Тільця Гварнієрі.....*

*.....*

*Гематоксилін.....*

*.....*

*Еозин.....*

*.....*

### III. ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

**Завдання 1. Репродукція вірусу викликає появу нехарактерних для нормальної життєдіяльності клітини змін, що визначається як цитопатичний ефект.**

1.1. Розгляньте мікрофотографії та відзначте характер клітинних змін та наявність внутрішньоклітинних включень, характерних для визначених вірусних інфекцій.

Видова приналежність вірусу	Родина	Цитопатична дія вірусу	Внутрішньоклітинна локалізація





## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5

### Тема: Поширення вірусів. Особливості життєвих циклів вірусів

**Мета:** Ознайомитися із способами поширення вірусів рослин та хребетних у природі, основними стратегіями вірусної репродукції та характеру вірусної інфекції.

**Компетенції:** Розуміти основні типи та шляхи поширення вірусів, знати і вміти визначити тип вірусу за морфо-функціональними характеристиками чутливих організмів.

**Матеріальне забезпечення:** атлас із зображеннями схем поширення вірусів різних систематичних груп.

### I. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

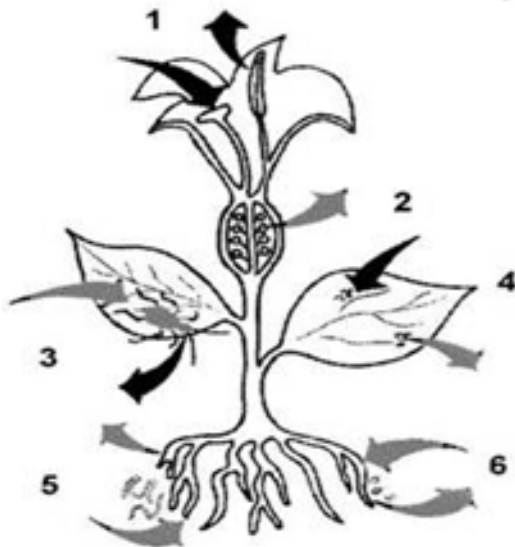
#### *Поширення вірусів рослин*

Віруси рослин мають здатність досить швидко розповсюджуватися в біоценозах. Вони можуть поширюватися завдяки векторам (кліщі, попелиці, нематоди, гриби), передаватися при вегетативному розмноженні через бульби, живці, цибулини. Більшість фітовірусів передаються щепленням. Близько 90 різних вірусів рослин передаються насінням, деякі фітовіруси можуть викликати інфекцію без участі векторів, коли збудник знаходиться в ґрунті. Знання екології збудника необхідне для використання необхідних засобів боротьби проти нього.

При ураженні рослин-господарів фітовірусами найчастіше розвивається системна реакція. При цьому інфекція часто протікає з яскраво вираженими симптомами у вигляді мозаїки, скручування, хлорозу, появи енацій та ін.

Така інфекція може закінчуватись навіть загибеллю інфікованих частин рослин або і всієї рослини. Разом з тим, інколи перебіг інфекційного процесу проходить без чітких ознак хвороби, які помітні за габітусом рослин. Часто уражений організм може бути прихованим носієм інфекції. Продуктивність таких рослин знижується в незначній мірі.





### **Основні шляхи передачі фітовірусів.**

*1 - передача за допомогою тилку; 2 - передача за допомогою насіння; 3 - за допомогою векторів-комах; 4 - при прямому контакті з рослинами (механічному пошкодженні); 5 - за допомогою векторів-нематод; 6 - за допомогою векторів-грибів.*

Так реагують на вірусну інфекцію рослини-резерватори, переважна більшість яких відноситься до бур'янів. Бур'яни (щириця біла, гірчиця біла, суріпиця звичайна, пирій повзучий та ін.) займають особливе місце серед факторів, що знижують врожай сільськогосподарських культур, оскільки вони є джерелом вірусів.

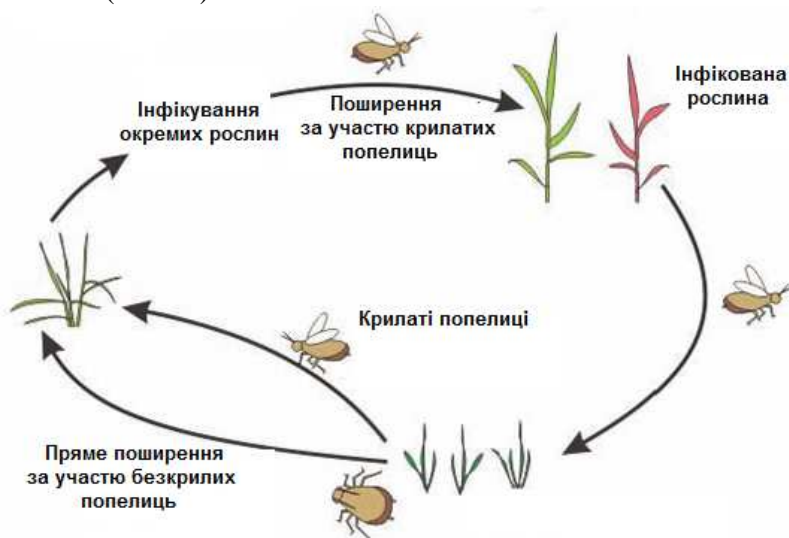
Багато вірусів швидко мігрують завдяки векторам, якими можуть бути попелиці, цикадки, кліщі, нематоди, гриби та ін. Перше місце в передачі вірусів серед комах займають попелиці. Попелиці і кліщі, як і інші летючі комахи, є одними з важливих факторів, що визначають дальність розповсюдження віруса від джерела. Так, за один день попелиці відносяться вітром на десятки і навіть сотні кілометрів.

Векторами вірусів рослин є членистоногі, нематоди та гриби.

Кожен вірус звичайно має свої вектори, що належать, як правило, до однієї таксономічної групи. Представники двох класів членистоногих – комахи (*Insecta*) та павукоподібні (*Arachnida*) можуть переносити віруси рослин. Безумовний інтерес привертає до себе ряд *Homoptera*, куди відносяться такі важливі переносники вірусів рослин, як цикади, попелиці та білокрилки. Ротовий апарат попелиці чудово пристосований для інокуляції вірусів.

Найважливішими представниками попелиць, що виявляються векторами багатьох фітовірусів, є *Macrosiphum (Sitobion) avenae* (велика злакова), *Rhopalosiphum padi* (черемхова), *Rhopalosiphum maidis* (соргова або кукурудзяна), *Schizaphis graminum* (звичайна злакова), *Myzus persicae* (зелена персикова), *Aphis fabae* (бурякова), *Macrosiphum euphorbiae* (велика картопляна), *Myzus (Phorodon) humuli* (хмелева), *Brachycaudus helichrysi* (геліхризова) тощо.

Класичним прикладом поширення вірусів за допомогою векторів-попелиць є поширення вірусу жовтої карликовості ячменю (ВЖКЯ).



**Поширення вірусу жовтої карликовості ячменю**

Поширення ВЖКЯ набуває викликає загрозливе становище у зв'язку зі збільшенням посівів озимих зернових культур. Цей вірус існує у вигляді декількох штамів і передається різними видами зернових попелиць. Черемхова попелиця (*Rhopalosiphum*) є основним вектором поширення цього вірусу. Восени, BYDV може бути введений в зернових культур в двох напрямках:

1. Пряма передача безкрилими попелицями, які живуть на траві або на зернових і рухаються через ґрунт, інфікуючи нові рослини.

2. Непряма передача крилатими попелицями, мігруючими на території нових посіві.

Донедавна білокрилки не відносилися до групи комах, здатних переносити віруси, що можуть викликати епідемії. Проблема широкого поширення білокрилок та пов'язаних з ними епіфітотії була актуальною переважно для тропічних та субтропічних регіонів, але вже сьогодні вона постає в агросистемах помірного клімату. На сьогодні відомо кілька видів алейродид, здатних переносити віруси культурних рослин. До них належать: білокрилка батата (*Bemisia tabaci*), білокрилка посрібнених листків (*Bemisia argentifolii*), оранжерейна білокрилка (*Trialeurodes vaporariorum*) та облямована білокрилка (*Trialeurodes abutiloned*).

Представники двох родин кліщів класу *Arachnida* – *Tetranychidae* та *Eriophyidae* – можуть переносити віруси рослин.

Ґрунт є також одним із джерел інфікування рослин вірусами. Потрапляючи в ґрунт, віруси здатні інфікувати нові рослини. Існує три групи вірусів, що передаються через ґрунт:

- віруси, що передаються грибами;
- віруси, що передаються нематодами;
- віруси, переносник яких невідомий.

Крім вірусів, які переносяться або нематодами з родів *Longidorus*, *Xiphinema* і *Trichodorus*, або зооспорами ґрунтових грибів з родів *Polymixa* і *Olpidium*, існує група ґрунтових вірусів, представники якої «вільними» віріонами зустрічаються в ґрунті і воді та можуть переходити без допомоги векторів від інфікованих до здорових рослин, хоча деякі з них можуть переноситися нематодами або грибами. На сьогодні відомі дві

групи вірусів рослин, що можуть передаватися нематодами. Представники групи *Tobravirus* мають паличкоподібні віріони та розповсюджуються нематодами родини *Trichodoridae* родів *Trichodorus* та *Paratrachodorus*.

### Вектори вірусів рослин

Членистоногі (Arthropoda)		Нематоди (Nematoda)	Гриби (Fungi)
Комахи (Insecta)	Павукоподібні (Arachnida)	Longidorus, Xiphinema, Trichodorus	Polymixa, Olpidium, Spongospora
Рівнокрилі (Homoptera)	Попелиці (Aphididae)	Галові кліщі (Eriophidae)	
	Червці (Psodococcidae)	Павутинні кліщі (Tetranychidae)	
	Білокрилки (Aleyrodidae)		
	Світнооски (Fulgoridae)		
	Псиліди (Psyllidae)		
	Свинушки (Delphacidae)		
	Горбатки (Membracidae)		
	Цикади (Cicadellidae)		
Напівжорсткорилі (Heteroptera)	Жуки (Coleoptera)		
	Листоїди (Chrysomelidae)		
	Довгоносики (Curculionida)		
Прямокрилі (Orthoptera)	Вуховертки (Dermaptera)		
	Молі (Lepidoptera)		
	Мухи (Diptera)		

В ґрунт віруси рослин можуть потрапити як прямим (з листових, стеблових і кореневих залишків уражених рослин, та при віддачі вірусів коренями інфікованих рослин), так і непрямим шляхом (вірусовмісні екскременти та вимивання вірусів з контамінованих ґрунтів дощовими водами).

Джерелами контамінації «вільних» від вірусів ґрунтів або інших субстратів може бути невелика кількість рослин, що постійно виділяють через корені вірус в навколишнє середовище. Деякі віруси настільки призвичаїлися до цього способу розповсюдження, що інфікують тільки кореневу систему рослин-господарів або окремі частини їх надземних органів. Діагностика в такому випадку ускладнена, і можна припустити, що віруси цієї групи розповсюджені більш широко, ніж вважали до останнього часу.

Численні віруси рослин містяться в ґрунті і в поверхневих водах, особливо в сільськогосподарських областях. Ступінь адсорбції і тривалість періоду, на протязі якого інфекційність зберігається і який може тривати тижні, а іноді і місяці, залежить від захисту вірусу і факторів зовнішнього середовища. Серед останніх це тип ґрунту, рівень вологості, рН, температура, вміст органічних речовин і зв'язана з цим біологічна активність середовища. Багато вірусів стабільні і здатні інфікувати рослини без допомоги векторів, а саме нематод та розповсюджених в ґрунті зооспор грибів. Передача вірусу з ґрунту та води можлива через непошкоджені корені рослин. Віруси, які є в струмках, можуть переноситись на великі відстані.

До теперішньої часу приблизно 9 вірусів були ідентифіковані, а кілька інших ізольовані з ґрунту і води лісових екосистем. Вони головним чином належать до: *Potex-*, *Tombus-*, *Tobamo-*, *Poty-* та *Necrovirus*.

На високородючих ґрунтах ймовірність розповсюдження вірусних хвороб збільшується. На ступінь ураження, безперечно, впливає живлення рослин, пригнічуючи симптоми або роблячи їх більш чіткими. Інактивація вірусу проходить швидше у вологих, добре аерованих ґрунтах, ніж у сухих, щільних або заболочених.

Термін життя окремої рослини обмежений, тому необхідною

умовою виживання вірусу є перехід його від одної рослини до іншої. Джерелом інфекції може бути насіння або пилок, вегетативні частини рослини, бур'яни, комахи (у випадку персистентних вірусів), ґрунт. Передача вірусів за допомогою насіння представляє собою дуже ефективний спосіб ураження будь-якої культури на ранніх стадіях розвитку, так як на ділянці, де вирощується дана культура, з'являються хаотично розміщені осередки інфекції. Трансплантаційна передача вірусів може проходити за допомогою вегетативних частин рослини (пагонів, бульб, цибулин, вусиків), щепленням (привій, підвій). Механічний або контактний спосіб передачі вірусу має особливо важливе практичне значення на ранніх етапах росту польових культур. В природніх умовах віруси можуть передаватися при контакті між собою, при застосуванні агротехнічних засобів. В останні роки велика кількість фітопатогенних вірусів, що не переносяться векторами, була виявлена в ґрунтах, ґрунтових водах, ріках, озерах та в морі. Коли листя зараженої вірусом рослини торкається листя здорової рослини, краї листя і листові волоски можуть пошкоджуватися. В результаті цього з соком інфікованої рослини вірус може проникнути в травму здорової рослини і заразити її. Таке зараження наймовірніше в тих випадках, коли віруси присутні в соку у високих концентраціях, а рослини легко пошкоджуються і стають високочутливі до інфекції. Саме таким шляхом розповсюджується в агроценозах вірус мозаїки люцерни, причому найшвидше розповсюджуються ті штами вірусу, які досягають в заражених рослинах найвищих концентрацій. Вірус мозаїки люцерни передається від рослини до рослини також при контакті рослин під землею, швидше за все при зіткненні здорового коріння із зараженими. Проте слід зазначити, що розповсюдження вірусів за рахунок механічного контакту відбувається у край рідко.

Рослинні патогени можуть різними методами попадати в ґрунт. Найбільш ймовірним є проникнення вірусів з інфікованими рослинами або рослинними залишками, в яких віруси можуть прямим або опосередкованим шляхом попадати в ґрунт. Прямий шлях полягає в тому, що вірусінфіковані рослинні залишки залишаються в ґрунті (корінці) або з залишками рослин попадають в ґрунт (паростки, вегетативні органи). При цьому

слід звернути увагу на те, що віруси, які містяться в рослинних залишках частіше довше залишаються інфекційними, ніж віруси, які знаходяться в ґрунті у вигляді вільних віріонів. Вірусінфіковані рослини, які вживають люди та тварини, що можуть проходити через шлунок без втрати інфекційності та контамінувати ґрунт через екскременти, представляють непрямий шлях контамінації ґрунту.

### ***Поширення вірусів хребетних***

Поширення вірусів хребетних здійснюється з використанням механізмів, які реалізуються різними шляхами, і часто включають зовнішнє середовище і проміжних господарів вірусу. Важливу роль в поширенні вірусів відіграють міграційні процеси, що спостерігаються серед людей і тварин.

### **Вірусні інфекції людини**



### ***Основні типи вірусних інфекцій людини***

Поширення вірусів в людській популяції має свої особливості. Інфікування вірусами зазвичай призводить до розвитку захворювань різної важкості.

Відповідно до чотирьох основних типів локалізації збудника в організмі (дихальні шляхи, шлунково-кишковий тракт, кров, шкіра) виділено декілька механізмів передачі вірусів.

**Трансмісивний механізм** – передача за допомогою векторів. При будь-якому варіанті такої передачі вірус передається вектором із внутрішнього середовища донора безпосередньо у внутрішнє середовище реципієнта. Вірусні захворювання, які передаються комахами або поширюються як зоонози, були виділені в окрему групу інфекцій – **арбовірусні інфекції** (від англ. *arthropod-borne* – ті, що переносяться артроподами, тобто членистоногими). Комарі є основним вектором для більшості арбовірусів, хоча інші кусаючі мухи, мошки і кліщі можуть також передавати захворювання. Люди – випадкові (тупикові) господарі, оскільки вони не продуують значної віремії і не сприяють поширенню віруса. Вони набувають інфекції під час харчування кров'ю зараженого вектора. Можливе також зараження у лабораторних умовах при контакті з інфікованими рідинами. Арбовірусні інфекції, як правило, спалахують пізньою весною та влітку, оскільки членистоногі є активними в цей час.

Арбовіруси класифікуються за антигенною спорідненістю, морфологією та реплікативними механізмами. Клінічно значущі арбовіруси належать до родин і родів *Togaviridae* (*Alphavirus*, від лат. «*Toga*» – предмет одягу, що походить від наявності оболонки), *Flaviviridae* (*Flavivirus*, від лат. «*flavi*» або «*flavus*» – жовтий, що походить від розвитку жовтяниці при цій вірусній інфекції), *Bunyaviridae* (*Bunyavirus*, від лат. «*bunya*» – назва місцевості *Bunyamwera* у Західній Уганді, де вірус був виділений у 1943 р.) і *Reoviridae* (*Orbivirus*, «*REO*», від респіраторний ентеро орфановий вірус та лат. «*orbi*» – кільце, що походить від кільцеподібних капсмерів. Деякі з цих вірусів переважно викликають енцефаліт, у той час як інші викликають лихоманки. Альфавіруси та буньявіруси, як правило, переносяться комарами, флавівіруси – комарами або кліщами, і плебовіруси (від *Phlebotomus* – москітна лихоманка), як правило, передається москітами (за винятком лихоманки долини



Ріфт – вірусу, який передається через комарів) . Представники *Bunyaviridae* викликають лихоманки або геморагічні лихоманки і передаються комарями, кліщами, москітами, або мошками. Першим ізольованим арбовірусом був вірус везикулярного стоматиту Індіана у 1925. З тих пір більше вірусів було виділено, але лише 6 з них викликають значні хвороби людей: вірус західного кінського енцефаліту (WEE), вірус східного кінського енцефаліту (EEE), вірус енцефаліту Сент-Луїс (SLE), і віруси кліщової лихоманки Паусану, Ла-Кросс та Колорадо.

**Парентеральний механізм** – передача вірусів через кров. Віруси, циркулюючі в крові, можуть передаватися в процесі переливання крові, при використанні забруднених шприців і інших медичних інструментів (штучний шлях), статевим шляхом тощо.

**Аліментарний (ентеральний) механізм** – вірус проникає через слизові оболонки органів травлення. Різновидом аліментарного механізму є фекально-оральний механізм передачі вірусу.

**Аерогенний механізм** – вхідними воротами інфекції є слизові оболонки органів дихання. Реалізується повітряно-крапельним шляхом.

**Контактний механізм** – реалізується через шкірні покриви. Такий механізм передачі можуть використовувати дуже небагато вірусів. Так, наприклад, вірус сказу може проникати в організм тварини і людини при ослюненні шкірних покривів. Слина собак містить гіалуронідазу, яка полегшує проникнення вірусу в кров через шкіру.

**Вертикальний механізм** – передача вірусів від матері плоду під час виношування і пологів. Збудник може передаватися через плаценту, через навколоплідні води і оболонки, при проходженні плоду через родові шляхи матері.

### **Типи вірусних інфекцій**

Вірусні інфекції поділяються на **автономні** та **інтеграційні**.

**Автономний** – тип вірусної інфекції, при якому вірусний геном реплікується незалежно від клітинного.

**Інтеграційний** – тип вірусної інфекції, при якому вірусний геном частково або повністю інтегрується з клітинним геномом

та реплікується разом із ним.

*Продуктивна* вірусна інфекція завершується утворенням інфекційного потомства, на відміну від *абортивної*, для якої не характерне утворення інфекційних часток, або вони утворюються в значно меншій кількості, ніж при продуктивній вірусній інфекції.

*Гостра* вірусна інфекція – це така форма інфекції, за якої після утворення вірусного потомства клітина або гине, або видужує і не містить вірусних компонентів. При *хронічній* вірусній інфекції клітини продовжують продукувати вірусні частки або їх компоненти протягом тривалого часу і передають цю здатність спадково. Гостра інфекція, яка завершується загибеллю клітини (лізісом), носить назву *цитолітичної* (*цитотидної*), а гостра вірусна інфекція, яка безпосередньо не призводить до лізису клітини, і при якій клітина ще може функціонувати впродовж деякого часу, продукуючи вірусні частки, називається *нецитолітичною* (*нецитотидною*).

При *латентній* інфекції явні ознаки хвороби не виявляються, але вірус з організму не зникає. Ця рівновага між господарем і паразитом досягається різними способами у різних паразитів і господарів. Вірус може існувати в справді прихованій неінфекційній формі, можливо, як інтегрований геном або епісомний агент, або, як інфекційний та постійно реплікуючий агент, що називається *персистуюча вірусна інфекція*. Інфекційні агенти, які викликають хронічні стійкі інфекції знайшли спосіб уникати клітинної імунної відповіді.

Приклади прихованої інфекції включають в себе:

1. Хронічна вроджена краснуха, ЦМВ, ВЕБ, гепатиту В, ВІЛ;
2. Прихований ВПГ, ВЗВ, аденовірус та деякі ретровірусні інфекції;
3. Куру, СКЯ, прогресуючий краснушний паненцефаліт.

## II. ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

*Дайте визначення основним поняттям і термінам*

*Горизонтальне поширення.....*

*.....*

*Вертикальне поширення.....*

*.....*

*Вектор.....*

*.....*

*Циркуляційне поширення.....*

*.....*

*Нециркуляційне поширення.....*

*.....*

*Білки руху.....*

*.....*

*Пермісивні клітини.....*

*.....*

*Арбовірусні інфекції.....*

*.....*

*Нові віруси.....*

*.....*

*Автономна вірусна інфекція.....*

*.....*

*Інтеграційна вірусна інфекція.....*

*.....*

*Продуктивна інфекція.....*

*.....*

*Абортивна інфекція.....*

*.....*

*Цитоцидна інфекція.....*

*.....*

*Латентна інфекція.....*

*.....*

*Персистуюча інфекція.....*

*.....*

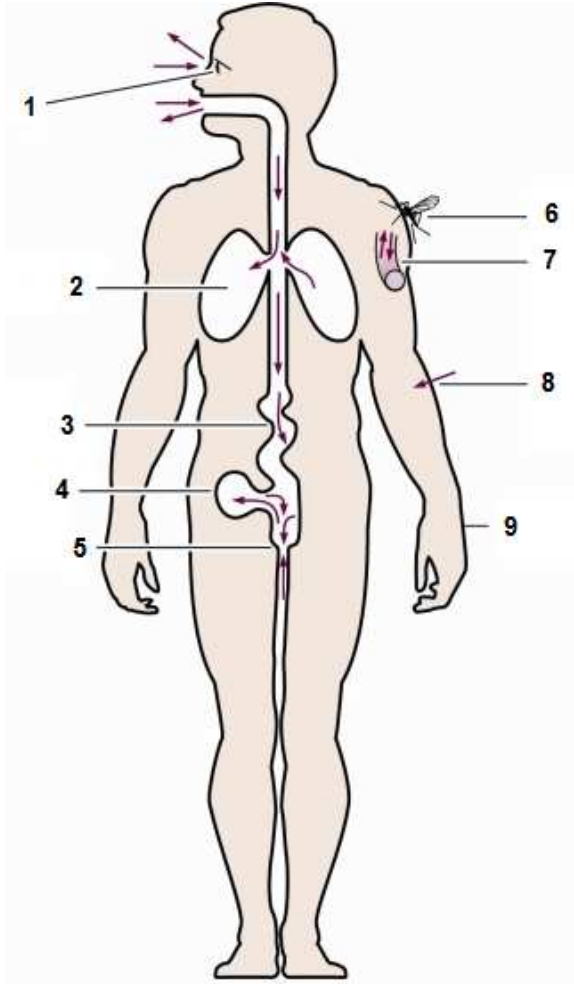
*Класифікація Балтимора.....*

*.....*

### III. ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

*Завдання 1. Віруси людини і тварин поширюються різними механізмами відповідно до воріт інфекції.*

1.1. Відповідно до схеми зазначте види воріт вірусної інфекції та віруси (із зазначенням систематичного положення), які вражають організм людини.



1.2. Заповніть таблицю.

<i>№</i>	<i>Ворота вірусної інфекції</i>	<i>Вірус (систематичне положення)</i>	<i>Вірусна інфекція (хвороба)</i>
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			
9.			

1.3. Заповніть таблицю, зазначаючи механізм поширення вірусів людини і тварин та вказуючи назви вірусів та їх систематичне положення.

<i>Механізм</i>	<i>Віруси</i>	<i>Родина</i>



2.1. Заповніть таблицю, зазначаючи систематичне положення вірусів відповідно до класифікації Балтимора.

<i>Тип згідно класифікації Балтимора</i>	<i>Тип геному</i>	<i>Родина</i>	<i>Типовий представник</i>

2.2. Заповніть таблицю, зазначаючи типи вірусних інфекцій та вказуючи назви вірусів та їх систематичне положення.

<i>Тип інфекції</i>	<i>Віруси</i>	<i>Родина</i>







## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6

### Тема: Методи діагностики вірусних інфекцій

**Мета:** засвоїти принципи сучасних методів діагностики вірусних інфекцій.

**Компетенції:** вміти аналізувати результати проведених діагностичних реакцій з використанням серологічних і молекулярно-генетичних методів.

### 1. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

#### Огляд методів діагностики

Діагностичні тести, які використовуються у вірусології, можуть бути згруповані в 3 категорії: 1) пряме виявлення вірусу, 2) непрямі дослідження (виділення вірусу), і 3) серологія. При прямому виявленні, клінічні зразки розглядаються безпосередньо на наявність вірусних частинок, вірусних антигенів чи вірусних нуклеїнових кислот. При непрямих дослідженнях, зразок вміщують в культуру клітин, яйця або тварини з метою виростити вірус – це називається виділення вірусу. Серологія насправді складає на сьогоднішній день основну частину роботи в будь якій вірусологічній лабораторії. Серологічний діагноз може бути поставлений на основі виявлення зростання титрів антитіл між гострою стадією інфекції та періодом видужання або виявлення IgM. Загалом, більшість поширених вірусних інфекцій може бути діагностована серологічно.

#### **1. Пряме дослідження зразків.**

1. Електронна мікроскопія / імунна електронна мікроскопія.
2. Дослідження клітинних включень методом світлової мікроскопії.
3. Виявлення антигенів імуофлуоресцентними методами (наприклад, ELISA).
4. Пряме виявлення вірусних геномів методами молекулярної біології.

## **2. Непряме дослідження.**

1. У клітинних культурах – цитопатичний ефект, гемадсорбція, реакція нейтралізації, інтерференція, імунофлуорисценція.
2. У курячих ембріонах – гемаглютинація, включення.
3. На тваринах – захворювання чи загибель, що підтверджується у реакції нейтралізації.

## **3. Серологія.**

Визначення зростання титру антитіл у проміжку між гострою фазою інфекції та періодом видужання, чи виявлення IgM при первинній інфекції.

### ***Класичні методи***

1. Реакція зв'язування комплементу(РЗК)
2. Реакція гальмування гемаглютинації (РГГА)
3. Імунофлуорисценція (ІФ)
4. Реакції нейтралізації
5. Радіальний гемоліз

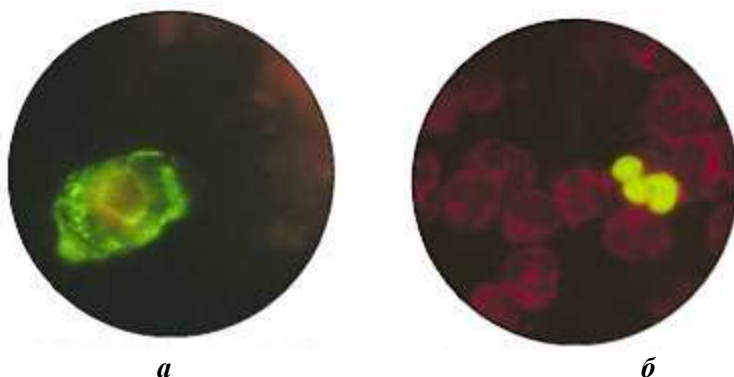
### ***Новітні методи***

1. Радіоімуноаналіз (РІА)
2. Імуноферментний аналіз (ІФА)
3. Реакція аглютинації частинок
4. Вестерн блот
5. Рекомбінантний імуноблот аналіз (RIBA), лінійний імуноаналіз (Liatek)

## **Пряме виявлення**

Прямі методи дослідження, часто називають швидкими методами діагностики, оскільки, як правило, вони дозволяють отримати результат або в той же самий або на наступний день. Це дуже корисно у випадках, коли схема лікування пацієнта багато в чому залежить від наявності швидких результатів лабораторних досліджень. Наприклад, РСВ у новонароджених, або важка ЦМВ інфекція у пацієнтів з імунодефіцитом. Тим не менш, важливо зрозуміти, що не всі прямі методи обстеження є швидкими, і, навпаки, виділення вірусу і серологічні методи іноді можуть дати швидший результат. З появою ефективної противірусної хіміотерапії, діагностичні експрес-методи будуть відігравати все більш важливу роль у діагностиці вірусних інфекцій.

**Виявлення антигену.** Приклади виявлення антигену включають імунофлюоресцентне тестування аспірату носоглотки для виявлення вірусів дихальних шляхів, наприклад, РСВ, віруси грипу і аденовіруси, виявлення антигену ротавірусу у фекаліях, тест на антигенемію ЦМВ білка РР65, виявлення ВПГ і ВЗВ у зішкрябах шкіри і виявлення НВsAg в сироватці крові. (втім, останнє, як правило, розглядається як серологічний тест). Основною перевагою цих аналізів є те, що вони є швидкими для виконання і результати стають доступними протягом декількох годин. Однак, ці методи часто є трудомістким, результат часто важко читати й інтерпретувати, а чутливість і специфічність залишається низькою. Крім того якість отриманого матеріалу для аналізу має першочергове значення для того, щоб тест спрацював належним чином.



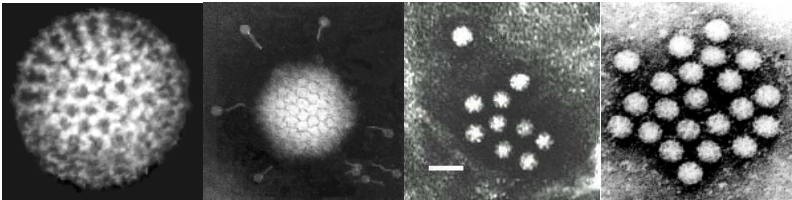
**Приклади виявлення вірусних антигенів методом прямої імунофлюорисценції**

*а – виявлення антигену ВПГ в епітеліальних клітинах; б – РР65 антиген ЦМВ у нейтрофілах периферичної крові.*

**Електронна мікроскопія (ЕМ).** При використанні цього методу вірусні частинки виявляються та ідентифікуються на основі морфології. Зазвичай використовується збільшення близько 50000. ЕМ в даний час в основному використовується для діагностики вірусного гастроентериту шляхом виявлення вірусу у фекаліях, наприклад, ротавіруси, аденовіруси, астровірус, каліцівірус і Норволк-подібні віруси. Іноді він може

бути використаний для виявлення вірусів в бульбашках та інших ураженнях шкіри, викликаних вірусами герпесу і папіломи.

Чутливість і специфічність ЕМ може бути підвищена за рахунок імуноної електронної мікроскопії, при якій вірусоспецифічні антитіла використовуються для аглютинації вірусних частинок одна з одною і, таким чином полегшуючи їх розпізнавання чи захоплення вірусних частинок на сітці ЕМ. Основні проблеми з ЕМ виникають при придбанні та обслуговуванні цього обладнання. Крім того, чутливість ЕМ часто є недостатньою, принаймні від  $10^5$  до  $10^6$  вірусних частинок на мл у зразку необхідно для візуалізації. Таким чином, спостерігач повинен бути висококваліфікованим. При наявності надійного виявлення антигену і молекулярних методів для виявлення вірусів, пов'язаних з вірусними гастроентеритами, ЕМ стає все менш і менш використовуваною.



**Електронні мікрофотографії вірусів, які зазвичай виявляються у фекаліях пацієнтів, хворих на гастроентерит.**

*Зліва направо: ротавірус, аденовірус, астровіруси, Норволк-подібні віруси.*

**Світлова мікроскопія.** Реплікація вірусу часто викликає гістологічні зміни в інфікованих клітинах. Ці зміни можуть бути характерними і неспецифічними. Вірусні включення в основному являють собою накопичення реплікуючих вірусних частинок або в ядрі, або цитоплазмі. Хоча це і нечутливий або неспецифічний метод, тим не менш, він служить корисним доповненням в діагностиці деяких вірусних інфекцій.

**Виявлення вірусних геномів.** Методи, засновані на виявленні вірусного геному, також відомі як молекулярні методи. Часто

говорять, що за молекулярними методами майбутнє вірусної діагностики. Однак на практиці, хоча використання цих методів і дійсно зростає, роль молекулярних методів в рутинній діагностичній практиці вірусологічної лабораторії все ще мала в порівнянні з традиційними методами. Цілком очевидно, однак, що роль молекулярних методів буде швидко зростати у найближчому майбутньому. Класичні молекулярні методи, такі як дот-блот і Саузерн-блот залежать від використання конкретних ДНК/РНК-зондів для гібридизації. Специфічність реакції залежить від умов, які використовуються для гібридизації. Ці методи дозволяють кількісно оцінити присутність ДНК/РНК у зразку. Тим не менш, часто виявляється, що чутливість цих методів не краща, ніж звичайних вірусологічних методів діагностики.

Нові молекулярні методи, такі як полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), лігазна ланцюгова реакція (LCR), ампліфікація на основі нуклеїнової кислоти (NASBA) та розгалужена ДНК (p-ДНК), залежать від тієї або іншої форми ампліфікації, або нуклеїнової кислоти-мішені, або від самого сигналу. p-ДНК є по суті звичайною технікою гібридизації з підвищеною чутливістю. Тим не менш, вони не так чутливі, як ПЛР та інші методи ампліфікації. ПЛР – єдиний метод ампліфікації, що перебуває у загальному користуванні. ПЛР є надзвичайно чутливою технікою: можна досягти чутливості до 1 молекули ДНК в клінічному зразку. Тим не менш, ПЛР має багато проблем, головною з яких є забруднення, так як тільки незначна кількість забруднень може дати неправдиві позитивні результати. Крім того, оскільки ПЛР настільки чутлива порівняно з іншими методами, позитивний результат ПЛР часто дуже важко інтерпретувати, оскільки вона не обов'язково вказує на наявність захворювання. Ця проблема особливо велика в разі прихованих вірусів, таких як ЦМВ, так як приховані геноми ЦМВ можуть бути присутні у крові здорових людей. Незважаючи на все це, ПЛР в даний час все частіше використовується для діагностики вірусних інфекцій, тим більше, що вартість аналізу знижується при наявності замкнених автоматизованих систем, які також можуть виконувати кількісну (кількісна ПЛР), наприклад, ПЛР у реальному часі.

**Полімеразна ланцюгова реакція** (ПЛР або PCR) – експериментальний метод молекулярної біології, спосіб значного збільшення малих концентрацій бажаних фрагментів ДНК в біологічному матеріалі (пробі). Крім простого збільшення кількості копій ДНК (цей процес називається *ампліфікацією*), ПЛР дозволяє проводити безліч інших маніпуляцій з генетичним матеріалом (введення мутацій, гібридизацію фрагментів ДНК), і широко використовується в біологічній і медичній практиці, наприклад для клонування генів, введення мутацій, виділення нових генів, секвенування, для створення і визначення генетично модифікованих організмів, діагностики захворювань (спадкових, інфекційних), ідентифікації малих кількостей ДНК, встановлення батьківства.

У вірусології метод ПЛР застосовують для своєчасного виявлення та ідентифікації вірусів. ПЛР використовують для детекції аномальних генів та вірусів. Завдяки ПЛР стало можливим досліджувати віруси, вбудовані в геном клітини-господаря, а також віроїди та вірусіди.

Метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) заснований на багатократному вибірковому копіюванні певної ділянки ДНК за допомогою ферментів *in vitro* (в штучних умовах). При цьому відбувається копіювання тільки тієї ділянки, яка задовільняє задані умови, і лише в тому випадку, якщо вона присутня в досліджуваному зразку.

За допомогою ПЛР зазвичай можуть бути ампліфіковані відносно короткі (до 10 *kbp*) ділянки ДНК з відомими кінцями, у окремих випадках можуть використовуватися ділянки до 40*kbp*.

ПЛР проводять в ампліфікаторі – приладі, що забезпечує періодичне охолодження і нагрівання тестових пробірок із розчином, зазвичай з точністю температури не менше за 0,1 °С.

Для проведення найпростішої ПЛР потрібні такі компоненти:

- ДНК-матриця, тобто фрагмент ДНК, що містить ту ділянку, яку потрібно ампліфікувати.
- два праймери, комплементарні кінцям необхідного фрагменту.
- термостабільна ДНК-полімераза.
- дезоксинуклеотидтрифосфати (А, G, С, Т).
- буферний розчин.

Специфічність ПЛР базується на утворенні комплементарних комплексів між матрицею і праймерами (короткими синтетичними олігонуклеотидами довжиною 18-30 основ). Кожен з праймерів комплементарний одному з ланцюгів дволанцюгової матриці. Праймер слугує затравкою для ДНК-полімерази при синтезі комплементарного ланцюжка матриці.

Найважливіша особливість праймерів, яку враховують під час утворення комплексу праймер-матриця — температура плавлення ( $T_m$ ). Вона визначається, як температура, за якої половина нуклеотидів праймера гібридизована із матрицею.  $T_m$  можна приблизно визначити за формулою:

$$T_m = 2 \cdot (n_A + n_T) + 4 \cdot (n_G + n_C),$$

де  $n_A$ ,  $n_T$ ,  $n_G$ ,  $n_C$  – кількість нуклеотидів в праймері.

Якщо праймер короткий і  $T_m$  низька, то праймер може виявитися частково комплементарним до інших ділянок матричної ДНК, що може призвести до появи неспецифічних продуктів. Верхня межа температури плавлення праймера рівна 80 °С, оскільки при цьому активність полімерази зазвичай знижується. Тому підбираючи праймер необхідно провести його моніторинг перед тим як починати ПЛР.

При виборі праймерів бажано дотримуватися наступних критеріїв:

- вміст GC ~ 40—60 %;
- близькі  $T_m$  праймерів (відмінності не більш, ніж на 5 °С);
- відсутність неспецифічних вторинних структур – шпильок і димерів;
- бажано, щоб на 3'-кінці був гуанін або цитозин.

#### ***Хід реакції***

Реакції ПЛР проводять у 0,2 чи 0,5 мл мікропробірках типу Епендорф (рис).





### *Пробірки типу Епендорф*

Обладнання для нагрівання та охолодження може бути простим, як наприклад набір водяних бань з різною температурою води або складним та включати нагрівальний блок, що регулюється мікропроцесором.



### *Ампліфікатор для полімеразної ланцюгової реакції*

Зазвичай при проведенні ПЛР виконується 20-35 циклів, кожен з яких складається з трьох стадій (рис.):

1. Дволанцюгову ДНК-матрицю нагрівають до 94—96 С (або до 98 С, якщо використовується особливо термостабільна полімераза) протягом 0,5-10 хв, щоб ланцюги ДНК розійшлися. Ця стадія називається **денатурацією** – руйнуються водневі зв'язки між двома ланцюгами. Іноді перед першим циклом проводять попереднє прогрівання реакційної суміші протягом 2-5 хв для повної денатурації матриці і праймерів.
2. Коли ланцюги розійшлися, температуру знижують, щоб праймери могли зв'язатися з одноланцюговою матрицею. Ця стадія називається **відпалом** (англ. *annealing*). Температура відпалу залежить від праймерів і зазвичай вибирається на 5-10 °С нижче за їх температуру плавлення. Час стадії – 0,5-2 хв.
3. ДНК-полімераза реплікує матричний ланцюг, використовуючи праймер як затравку. Це так звана **стадія елонгації**. Температура елонгації залежить від полімерази. Полімерази Taq і Pfu, що найчастіше використовуються, найбільш активні за 72 °С. Час елонгації залежить як від типу ДНК-полімерази, так і від довжини фрагмента, який ампліфікують. Середня швидкість елонгації – 1000 пар основ за 1 хв. Після закінчення всіх циклів часто проводять додаткову стадію фінальної елонгації, щоб добудувати всі одноланцюгові фрагменти. Ця стадія триває 10-15 хв.

Для аналізу продукту, отриманого в ПЛР, використовують різні методи, такі як: гель-електрофорез, дот-блот-гібридизацію та блот-гібридизацію за Саузерном. З їх допомогою можливо аналізувати більшість ПЛР-продуктів, але абсолютно достовірні результати можливо отримати тільки секвенуванням.

Частіше всього для швидкої візуалізації результатів ПЛР використовують гель-електрофорез в агарозному гелі за загальноприйнятими методиками.

## Непряме дослідження

Клітинні культури, яйця і тварини можуть бути використані для виділення вірусу. Однак культивування у яйцях і тваринах методично трудомісткі, і тому більшість вірусологічних діагностичних лабораторій використовують тільки культури клітин.

Розрізняють первинні і вторинні культури клітин. Первинні культури підтримується шляхом заміни рідкого середовища 2 або 3 рази на тиждень. Коли клітинам у культурі стає занадто тісно, клітини відокремлюють від стінки посудини або трипсином або ЕДТА, частина з яких використовується для ініціювання вторинних культур. У первинних і вторинних культурах, клітини зберігають деякі характеристики тканин, з яких вони отримані.

Клітини з первинних культур можна пасажувати послідовно кілька разів. Ці клітини можуть потім продовжувати ділитися з постійною швидкістю протягом багатьох послідовних пасажів. Зрештою, після низки пасажів, клітини старіють і культура не може більше пасажуватись. Для культури диплоїдних клітин людини темп росту знижується після 50 поділів.

Розрізняють 3 типи клітинних культур:

1. **первинні клітинні культури** – клітини нирок мавп. Вони, по суті нормальні клітини, отримані з щойно убитих дорослих тварин. Ці клітини можуть пасажуватися один або два рази.
2. **напівнеперервні клітинні культури** – ембріональні клітини нирок людини та фібробласти шкіри людини. Ці клітини отримані з ембріональних тканин і можуть пасажуватися до 50 разів.
3. **безперервні клітинні культури** – HeLa, Vero, Hep2, LLC-MK2, BGM. Ці клітини іморталізовані, тобто пухлинні клітинні лінії та можуть пасажуватися безперервно.

Клітинні культури сильно відрізняються за своєю чутливістю до різних вірусів. Вкрай важливо, щоб для конкретного вірусу використовували найчутливішу культуру клітин. Вірусомісний зразок для інфікування культури клітин повинен бути доставлений в лабораторію якомога швидше. Тампони слід

помістити в пробірку, що містить середовище транспортування вірус. Біологічні рідини і тканини повинні бути поміщені в стерильний контейнер.

Після отримання зразка його інокують до декількох різних типів клітинних культур в залежності від характеру зразка та клінічних проявів захворювання. Культуральне середовище повинно бути замінене через 1 годину або, якщо це неможливо, на наступний ранок після інокуляції віруса. Інокульовані флакони повинні бути культивовані при 35-37 ° С в обертовому барабані, щоб клітинний моношар постійно омивався середовищем. Обертання є оптимальним для виділення респіраторних вірусів і призводить до ранньої появи ЦПЕ для багатьох вірусів. Якщо використовуються стаціонарні флакони, важливо, щоб шар клітин розташовувався у поживному середовищі.



*Культуральні флакони з поживним середовищем*

Первинні культури клітин широко визнані кращими доступними клітинними системами, так як вони підтримують широкий спектр вірусів. Тим не менш, вони дуже дорогі, і часто важко отримати надійне постачання. Безперервні клітинні культури є найбільш прості в обігу, але спектр вірусів, що підтримується ними, часто обмежений.

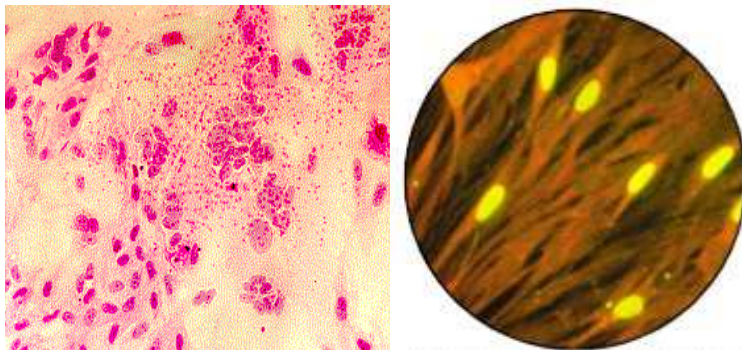
**Виявлення реплікуючих вірусів.** Присутність реплікуючих вірусів звичайно виявляється на основі:

1. цитопатичного ефекту (ЦПЕ) – може бути специфічним та неспецифічним, наприклад ВПГ та ЦМВ формують специфічний ЦПЕ, в той час як ентеровіруси – ні.
2. гемадсорбція – клітини набувають здатності злипатися з еритроцитами тварин. Гемадсорбція здебільшого використовується для виявлення вірусів грипу та парагрипу.

Підтвердження наявності визначеного віруса проводиться на основі реакції нейтралізації, гальмування гемадсорбції, імунофлуорисценції та молекулярних тестів.

**Проблеми з культурою клітин.** Основна проблема з культурою клітин – тривалий період (до 4 тижнів), необхідний для отримання доступного результату. Крім того, чутливість часто є недостатньою і залежить від багатьох факторів, таких як стан зразка, і стан клітинної культури. Клітинні культури також дуже сприйнятливі до бактеріальних забруднень і токсичного впливу речовин у зразку. Крім того, багато вірусів не будуть рости в культурі клітин, наприклад віруси гепатиту В і С, діарейні віруси, парвовіруси тощо.

**Швидкі методи культури клітин.** Швидкі методи культури клітин доступні тоді, коли вірусні антигени виявляються від 2 до 4 днів після інокуляції. Прикладами швидких методів культури можуть бути методи флаконових шарових культур і тест DEAFF на ЦМВ. У тесті DEAFF на ЦМВ, клітинні шари вирощуються на окремих підкладках у пластикових флаконах. Після інокуляції культуральний флакон обертають на низькій швидкості протягом однієї години (для прискорення адсорбції вірусу), а потім витримують протягом 2- 4 днів. Покривне скло, потім виймають і досліджують на наявність ранніх антигенів ЦМВ методом імунофлуоресценції.



### **Приклади непрямого дослідження вірусів**

*Зліва: гемадсорбція еритроцитів на поверхні клітинного шару, інфікованого вірусом кору. Справа: позитивний DEAFF тест на ЦМВ.*

Роль клітинних культур (як звичайних, так і швидких методів) в діагностиці вірусних інфекцій все частіше заміщується швидкими діагностичними методами, такими як методи виявлення антигену і молекулярні методи. Таким чином, роль культури клітин як очікується, скоротиться в майбутньому, і, ймовірно, буде обмежена у використанні лише великими центральними лабораторіями.

### **Серологія**

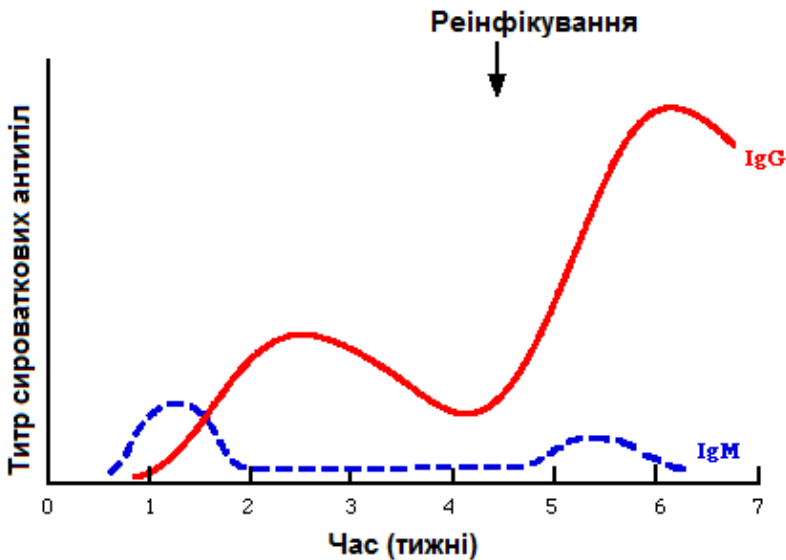
Серологія формує основу вірусної діагностики. Це те, що виявляється внаслідок первинної гуморальної імунної відповіді на вірусний антиген. Після експозиції, першими антитілами, які з'являються є IgM, після яких зростає титр IgG. У випадках повторного зараження, рівень конкретних IgM або залишатися незмінним або збільшується незначно. Але рівень IgG зростає швидше і набагато раніше, ніж при первинній інфекції. На сьогодні доступними є багато різних типів серологічних тестів. У деяких аналізах, таких як імуноферментний аналіз (ІФА) та радіоімуноаналіз (RIA), можна виявляти загальні антитіла IgM і IgG, в той час як з інші аналізи, такі як реакція зв'язування комплементу (РЗК) дозволяє виявляти тільки антитіла IgG. Деякі з цих тестів є набагато чутливіші, ніж інші: ІФА та

радіоімунаналіз є найчутливішими доступними тестами, в той час як РЗК тест не настільки чутливий. Новітні технології, такі як ІФА пропонують кращу чутливість, специфічність та відтворюваність, ніж класичні методи, такі як РЗК. Чутливість і специфічність тестів багато в чому залежить від використовованого антигену. Аналізи, які використовують рекомбінантні білки або синтетичні пептидні антигени мають тенденцію бути більш конкретним, ніж ті, які використовують цілі або зруйновані вірусні частинки.

### ***Критерії для діагностики первинної інфекції:***

1. Значне підвищення титру IgG/загальні антитіла у сироватках гострої фази інфікування та періоду видужування. Однак, значне зростання дуже важко визначити і воно багато в чому залежить від використаного серологічного методу. У разі РЗК, він зазвичай приймається в чотири рази або більше збільшення титру. Основна проблема в тому, що діагноз зазвичай ретроспективний, тому що до того часу, коли береться сироватка в період одужання, пацієнт, зазвичай вже здоровий.
2. Наявність IgM – ІФА, РІА та ІФ можуть бути використані для виявлення IgM. Це забезпечує швидку діагностику. Однак, є багато проблем з аналізами IgM, такі як інтерференція з ревматоїдним фактором, повторне зараження вірусом, і нез'ясовні збереження IgM протягом років після первинної інфекції.
3. Сероконверсія, що визначається як перехід від раніше негативного стану щодо наявності антитіл в позитивний, наприклад стан сероконверсії при ВІЛ після уколу голкою або при краснусі після контакту із завідомо інфікованою особою.
4. Поодинокий високий титр IgG (або загальних антитіл) – це дуже ненадійний спосіб серологічної діагностики, так як дуже важко визначити період щодо якого порівнюється це зростання.

**Критерії для діагностування реінфікування чи реактивації.** Часто буває дуже важко відрізнити реінфікування/реактивацію від первинної інфекції. У більшості випадків, не важливо проводити розмежування між первинною інфекцією та повторним зараженням. Тим не менш, це дуже важливо у визначених ситуаціях, таких як краснуха в першому триместрі вагітності: первинна інфекція пов'язана з високим ризиком пошкодження плоду, тоді як повторне зараження ні. Загалом, різке суттєве підвищення титру антитіл виявляється при повторній інфекції, тоді як рівень IgM, як правило, низький або відсутній у випадках реінфікування/реактивації.



**Серологічні події після первинної інфекції та реінфекції.**

Відзначте, що при реінфекції, IgM може бути відсутнім або бути присутнім на низькому рівні.

**Обмеження серологічних методів.** Наскільки корисний виявиться серологічний результат залежить від індивідуальних особливостей вірусу.



1. Для вірусів, таких як краснуха та гепатит А, поява клінічних симптомів збігається з появою антитіл. Виявлення IgM або підвищення титрів IgG в сироватці крові пацієнта буде означати активне захворювання.
2. Тим не менш, багато вірусів викликають появу клінічних проявів захворювання задовго до появи антитіл, наприклад респіраторні і шлунково-кишкові віруси. Так що в цьому випадку будь яка серологічна діагностика буде ретроспективною і, отже, не буде корисною.
3. Існують також віруси, які викликають появу клінічних проявів захворювання через місяці та навіть роки після сероконверсії, наприклад, ВІЛ-інфекції та сказ. У випадку цих вірусів, сама присутність антитіл достатня, щоб поставити остаточний діагноз.

Існує цілий ряд проблем, пов'язаних з серологією:

1. довгий період часу, необхідний для постановки діагнозу з використанням парних сироваток гострої фази інфекції та періоду видужання;
2. низька імуногенність місцевих інфекцій, наприклад генітальний герпес може не викликати гуморальної імунної відповіді;
3. широка антигенна перехресна реактивність між спорідненими вірусами наприклад, віруси ВПГ і ВЗВ, вірус японського енцефаліту і лихоманки Денге, що може призвести до помилкових позитивних результатів;
4. пацієнти з ослабленим імунітетом часто характеризуються зниженою або відсутньою гуморальною імунною відповіддю;
5. пацієнти з інфекційним мононуклеозом та із захворюваннями сполучної тканини можуть реагувати неспецифічно і давати помилковий позитивний результат;
6. аналізи пацієнтів, які отримували кров і продукти крові, можуть давати хибно-позитивні результати внаслідок передачі антитіл.

***Антитіла у цереброспінальній рідині (ЦСР).*** У здорової людини, повинно бути мало або немає бути взагалі антитіл в спинномозковій рідині. При вірусному менінгіті або енцефаліті антитіла можуть вироблятися проти вірусу лімфоцитами у

спинномозковій рідині. Виявлення антитіл у спинномозковій рідині вважається істотним, коли співвідношення між титром антитіл в сироватці крові та в спинномозковій рідині становить менше 100. Але це залежить від цілісного неушкодженого гематоенцефалічного бар'єру. Проблема в тому, що у багатьох випадках менінгіту та енцефаліту, гематоенцефалічний бар'єр пошкоджується, так що антитіла з сироватки крові дійсно можуть проникати у ЦСР. Це також відбувається, коли спинномозкова пункція була травматичною, в цьому випадку спинномозкова рідина буде закривавленою. Один із способів перевірки цілісності гематоенцефалічного бар'єру є використання сурогатних антитіл, які більшість людей буде мати, наприклад, до вірусу кору, так як більшість людей були вакциновані. Якщо гематоенцефалічний бар'єр не пошкоджений, повинно бути мало або взагалі не бути антитіл до вірусу кору в спинномозковій рідині.

**Радіоімунологічний аналіз (RIA)** відноситься до групи так званих методів зв'язування (*bindings assays*), заснованих на утворенні комплексу між антигеном і антитілом, і забезпечує можливість визначення низьких кількостей різних речовин (вірусів, мікроорганізмів, антитіл, лікарських препаратів, гормонів, ферментів). Метод розроблений *R. Yalow* і *S. Berson* (1960 р.) для кількісного визначення інсуліну в плазмі людини був відмічений Нобелівською премією в 1977 р.

Висока чутливість і специфічність RIA сприяє його широкому використанню в теоретичній і практичній вірусології з діагностичною метою, для індикації вірусів в дослідних матеріалах, для визначення кількості й якісних особливостей антитіл, з метою вивчення антигенної структури вірусів, їх аналізу імунохімії і молекулярно-біологічних механізмів синтезу вірусних антигенів. Останніми роками метод RIA використовували для роботи з вірусами грипу, поліомієліту, герпесу, сказу, вісповакцини, альфа- і онковірусів людини і тварин.

Метод RIA у вірусології застосовують для кількісного визначення відомого міченого антигена до і після його контакту з гомологічними антитілами, які заздалегідь взаємодіють з невідомим неміченим антигеном. Якщо останній відповідає за

антигенною структурою міченому антигену і антитілам, що використовуються у досліді, то частина або всі активні центри антитіл будуть блоковані цим невідомим антигеном. Доданий пізніше мічений антиген залишається незв'язаним або зв'язаним лише частково, що і зареєструється радіометрично.

Інтенсивність конкуренції між відомим міченим і невідомим неміченим антигенами визначається ступенем ідентичності їх антигенних властивостей. При цьому кількість міченого антигена, здатного вступити в імунний комплекс з антитілами, обернено пропорційна до кількості неміченого антигена, вже адсорбованого антитілами з досліджуваного матеріалу. Такий метод називається прямим конкурентним РІА.

Сьогодні широко використовується твердофазний варіант РІА, при якому антитіла або антигени (залежно від завдання дослідження) адсорбуються на твердому носіїві. Як носій, або тверда фаза, використовують різні полімери (сефадекс, целюлозу, похідні полістиролу, пробірки зі всіляких пластиків). Для виявлення вірусу в досліджуваному матеріалі (наприклад, секреті з порожнини носа) антитіла адсорбують на вибраному носіїві для отримання іmobilізованих антитіл, здатність яких формувати імунний комплекс при цьому не змінюється. Умови утворення іmobilізованих антитіл розробляють індивідуально для кожного носія. Такий варіант РІА забезпечує можливість швидкого і легкого відділення імунного комплексу, що знаходиться на твердому носіїві, і міченого вірусу, що залишився незв'язаним в рідкій частині реагуючої суміші і піддається кількісній радіометричній оцінці.

**Імуноферментний аналіз** – вид імунохімічного аналізу, що базується на імунологічній реакції антигену з відповідним антитілом з утворенням комплексу антиген–антитіло, для виявлення якого використовують кон'югати антигену, антитіла або обидва компоненти цієї реакції з ферментами. Індикатором реакції є здатність ензимів викликати руйнування субстрату з утворенням забарвленого продукту.

ІФА було розроблено в 70-х роках ХХ століття на перетині імунохімії та інженерної ензимології та являється еволюційним продовженням і альтернативою радіоімунному аналізу в послідовності серологічних методів діагностики.

На сьогодні ІФА зайняв міцну позицію в діагностиці інфекційної патології людини, тварин та рослин, в онкології та ендокринології. Основними перевагами ІФА є:

- висока чутливість і специфічність
- відтворюваність результатів
- простота виконання
- доступність та стабільність реагентів
- гнучкість та можливість модифікації конструкцій
- експресивність та можливість автоматизації для проведення масових аналізів

Весь процес імуноферментного аналізу можна умовно поділити на три основні стадії:

1. Формування специфічного комплексу антиген-антитіло
2. Введення в утворений комплекс мітки
3. Візуалізація мітки

З точки зору способу виконання всі методи ІФА можна розділити на дві групи:

- системи, що не потребують розділення компонентів (гомогенні методи): якщо активність мічених молекул, які зв'язані з антитілами, суттєво відрізняється від активності вільних мічених молекул
- системи, які потребують розділення (гетерогенні методи): отримують дві окремі фракції міченого ліганда - зв'язану з антитілами і вільну, а лише потім вимірюють активність зв'язаних мічених молекул (твердофазний імуноферментний аналіз, ТІФА)

Як тверда фаза в ТІФА використовують 96-лункові полістиролові планшети, які здатні сорбувати макромолекули. В кожній лунці планшету проводиться аналіз окремого зразку.

**Основними компонентами твердофазного ІФА** є: імуносорбент - адсорбовані на твердій фазі антигени або антитіла (залежно від цілей аналізу), імуноферментний кон'югат - ковалентно зшиті з ферментом специфічні антитіла або антигени та досліджуваний матеріал - біологічні рідини організму.

В якості антигенів можуть використовуватися очищені нативні антигени мікроорганізмів або їх аналоги - рекомбінантні білки та синтетичні пептиди.

В якості антитіл використовують поліклональні (пул специфічних антитіл, виділених з сироваток тварин) або моноклональні (моноспецифічні антитіла, отримані методами клітинної інженерії) антитіла.

Імуноферментні кон'югати - це ковалентно зшиті молекули антигенів або антитіл з ферментом. Одним із біологічних феноменів, на якому базується ІФА, являється висока каталітична активність ферментів, які використовуються в якості індикатора в ІФА.

Основними ферментними мітками є:

- пероксидаза хрому - фермент, що найчастіше використовується; містить вуглеводні залишки, що легко окиснюються періодатом, через які може відбуватися зв'язування ферменту з антитілами або антигеном
- лужна фосфатаза - дуже стабільний, але дорогий фермент
- $\beta$ -D-галактозидаза - рідко використовується
- глюкооксидаза - рідко використовується

Таким чином, весь імуноферментний аналіз можна умовно розділити на три основні стадії: формування специфічного комплексу антиген-антитіло, введення в нього мітки (імунохімічний процес) і її візуалізація тим чи іншим фізичним способом. Перед постановкою ІФА проводиться робота, яка включає наступні етапи: вирощування біологічно-чистого матеріалу з моноінфекцією, отримання очищених вірусних препаратів, приготування антисироваток з високим титром специфічних антитіл, виділення IgG і кон'югування з ферментами. Після з'єднання антигену або антитіла з твердим носієм можна проводити реакцію прямого, непрямого, конкурентного і сандвіч-типу (рис.).

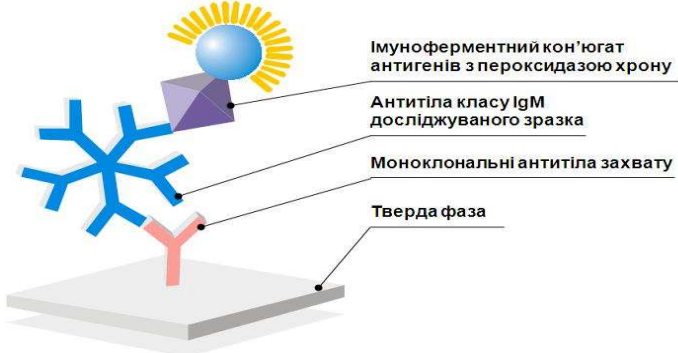
При прямому варіанті ІФА лунки мікроплат покривають тестуючим антигеном, інкубують, потім надлишок антигену видаляють і додають вірус специфічне антитіло, кон'юговане з ферментом. Після інкубації надлишок кон'югату видаляють і додають субстрат (хромоген). Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості антигену.

## Основні варіанти ТІФА

### ➤ Непрямий ТІФА

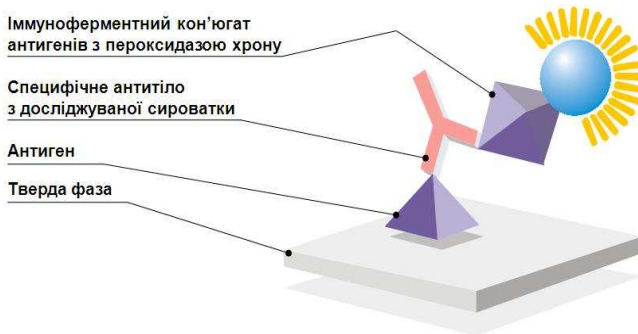


### ➤ ТІФА на основі IgM-захвату

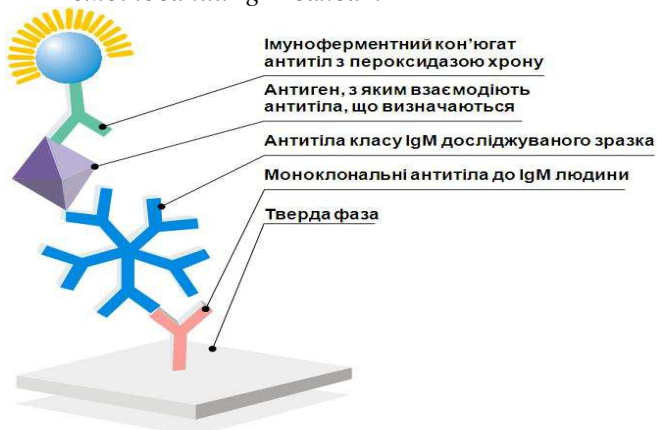


### ➤ «Сендвіч»-ТІФА

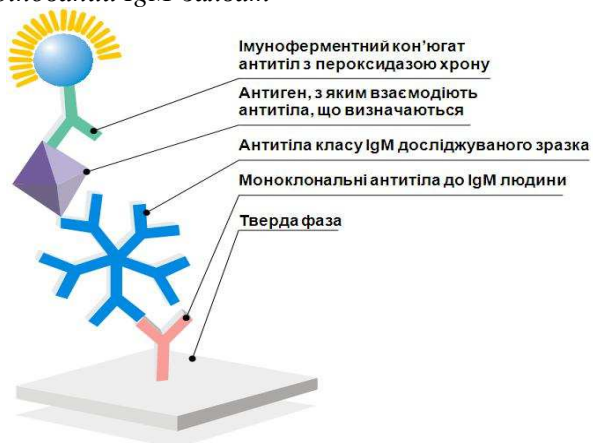




➤ *Комбінований IgM-захват*



➤ *Комбінований IgM-захват*





### ***Мікролашковий ІФА***

*Забарвлені лунки свідчать про реактивність; чим темніший колір, тим вища реактивність.*

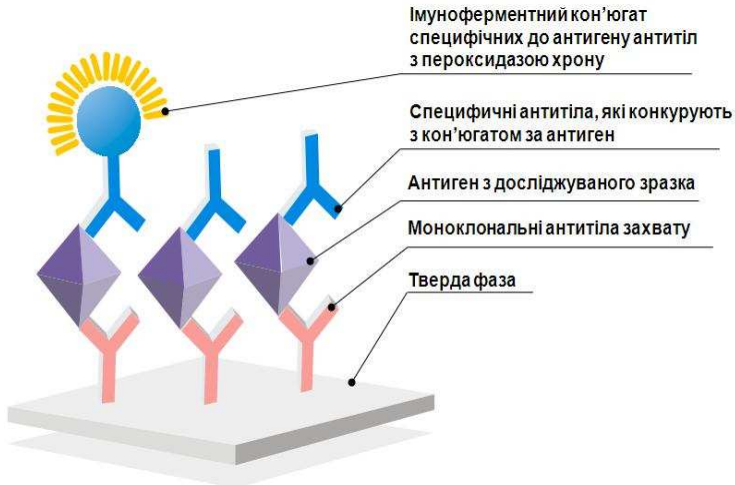
При непрямому варіанті ферменту мітку вводять не в антивірусні імуноглобуліни, а в антитіла до них. Імунний комплекс антиген-антитіло, іммобілізований на твердому носії інкубують з анти видовими антитілами, які мають ферментну мітку.

Під час використання сандвіч-методу або його модифікації на тверду підкладку послідовно сорбують первинні антитіла, досліджуваній антиген і вторинні антитіла. У випадку простого варіанту сандвіч-методу ферментна мітка вводиться до складу вторинних антитіл, а при модифікованому методі – вторинні антитіла проявляються комплементарними до них анти видовими ензим-міченими імуноглобулінами

Серед методів ІФА можна виділити два типи – це так званий послідовний, або неконкурентний, та конкурентний аналіз.

➤ *Конкурентний ТІФА*





При конкурентному гетерогенному аналізі присутні в реакційному середовищі зв'язані і не зв'язані з ферментом антигени одночасно вступають в конкурентну взаємодію з іммобілізованими на твердому носії антитілами. При інкубації надлишок незв'язаних компонентів відмивають і в систему додають відповідний субстрат.

Одна з важливих переваг ІФА – висока чутливість, яка досягається, як правило, за рахунок ферментного кон'югату, збільшення періоду інкубації, особливо на стадії ферментативної реакції, і здійснення такої послідовності етапів, при якій антиген зв'язується з іммобілізованими на носії антитілами, а потім взаємодіє з доданими на останній стадії кон'югованими антитілами.

**Імунофлюоресцентний метод.** Імунофлюоресценція полягає у використанні мічених флюорохромом антитіл, точніше, иммуноглобулінової фракції антитіл IgG. Мічене флюорохромом антитіло утворює з антигеном комплекс антиген-антитіло, який можна побачити під мікроскопом в УФ-променнях, що збуджують світіння флюорохрома.

Розроблено декілька варіантів реакції імунофлюоресценції: прямий, непрямий, сандвіч-метод, модифікація непрямого методу з використанням комплементу тощо.

Реакцію прямої імунофлюоресценції використовують для вивчення клітинних антигенів, виявлення вірусу в заражених клітинах і виявлення бактерій і рикетсій в мазках.

Так, для діагностики сказу відбитки шматочків мозку тварин, заражених вірусом обробляють люмінесціюючою антирабичною сироваткою. При позитивному результаті в цитоплазмі нервових клітин виявляються глибоки яскраво-зеленого кольору.

Ширше застосовують метод непрямой імунофлюоресценції, заснований на виявленні комплексу антиген-антитіло за допомогою люмінесціюючої іmunної сироватки проти IgG-антитіл, що використовують не тільки для виявлення антигенів, але і титрування антитіл. Метод широко використовують в серодіагностиці герпесу, цитомегалії, лихоманки Ласса. Препарати з нашарованою досліджуваною сироваткою крові поміщають в термостат при температурі 37°C для утворення іmunних комплексів, а потім після відмивання реагентів, що не зв'язалися, виявляють ці комплекси міченою люмінесціюючою сироваткою проти глобулінів людини. Застосовуючи мічені іmunні сироватки проти IgM- або IgG-антитіл, можна диференціювати типи антитіл і виявляти ранню іmunну відповідь за наявністю IgM-антитіл.

Імунофлюоресценцію широко використовують не лише у вірусології, але й в бактеріології, паразитології імунопатології для виявлення антитіл до тканинних антигенів людини. Перевага імунофлуорисцентного аналізу в порівнянні з іншими методами полягає в дослідженні внутрішньоклітинної локалізації антигену.

**Реакція гемаглютинації.** Реакція гемаглютинації (РГА) широко застосовується у вірусологічній практиці як швидкий, технічно простий, дешевий та достатньо надійний метод виявлення гемаглютинуючих вірусів в досліджуваному матеріалі, а також для титрування вірусів.

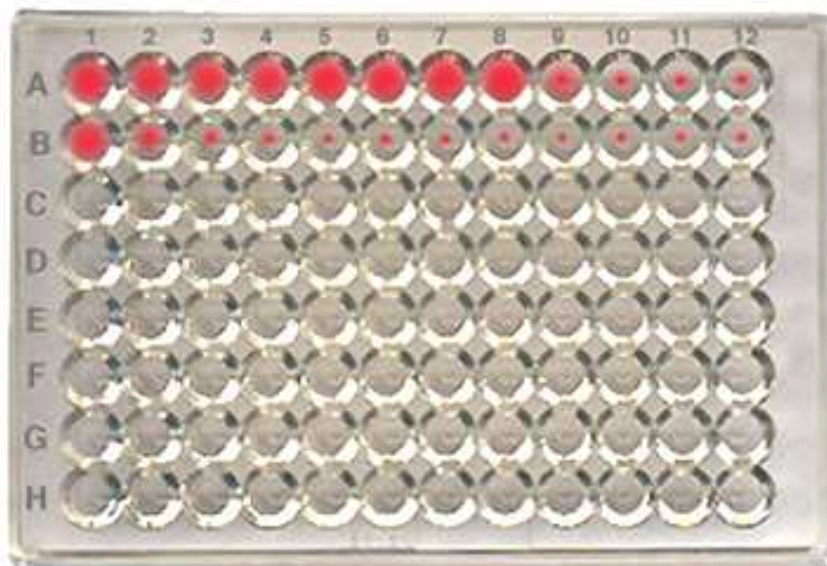
Принцип реакції гемаглютинації заключається в тому, що аглютинація відбувається за рахунок адсорбції вірусних часток на поверхневих рецепторах еритроцитів різноманітних видів тварин (без участі в реакції специфічної антисироватки). Ця властивість зумовлена взаємодією поверхневих вірусних білків (у простих вірусів це білки капсиду, у складних – гліко- та

ліпопротеїни суперкапсиду), які дістали назву гемаглютининів, з поверхневими білками еритроцитів (глікопротеїнами). В результаті такої адсорбції еритроцити склеюються один з одним, що призводить до утворення агрегату, який осідає на дно пробірки чи лунки планшету тонкою плівкою у вигляді переверненої парасольки (повна аглютинація). Якщо ж реакція не відбулася, тобто в розчині відсутні гемаглютинуючі віруси, то еритроцити осідають на дно щільним осадом. Взаємозв'язок між вірусами та еритроцитами є зворотним і може наступити фаза елюції (звільнення) вірусу за допомогою вірусного ферменту нейрамінідази, яка дисоціює утворені зв'язки. Швидкість елюції залежить від ряду факторів: концентрації солей в розчині, температури, рН середовища. Здатність вірусу елюювати з еритроцитів часто використовують при роботі з вірусом грипу для його очистки та концентрації.

Умови постановки реакції гемаглютинації залежать від багатьох чинників. Різні типи вірусів, а іноді і штами одного і того ж вірусу відрізняються чутливістю до спектру еритроцитів (немаглютинуючих видів). Наприклад, до вірусу грипу найбільш чутливі еритроцити курей, людини (0-групи), морських свинок; до вірусів енцефаліту – еритроцити гусей; до вірусу кору – еритроцити мавп; фітовіруси активно аглютинують баранячі еритроцити. Таку видову приналежність еритроцитів часто використовують для індикації вірусів. У лабораторній діагностиці найчастіше використовують еритроцити птахів, а не ссавців, бо вони швидше аглютинують і дають чіткий результат. Інтенсивність реакції залежить від температури та виду вірусу. Так, для вірусів грипу та паротиту інтенсивність РГА найбільша при 4-22 °С, для вірусу поліоми – 4 °С. РГА, як правило, ставлять в ізотонічних розчинах з рН в межах 6,0-9,0. В кислому та лужному середовищах відбувається швидка інактивація гемаглютинуючих властивостей вірусу.

ГА тест проводиться у спеціальних пробірках, плексигласових плашках та у апараті Takata. Вірусомісний зразок розводиться в два рази в 0,5 мл ізотонічного розчину. 0,5 мл суспензії еритроцитів тричі промитих фізіологічним розчином додаються до дослідних зразків і 0,5 мл суспензії еритроцитів змішується з рівним об'ємом безвірусного ізотонічного фізіологічного розчину

(використовується як контроль). Суміш інкубують при 37°, 20° чи 4 °С, залежно від досліджуваного вірусу. Результати тесту перевіряють через певний проміжок часу (від 30 хвилин до 3 годин), фіксуючи наявність або відсутність гемаглютинації у досліджуваних зразках.



*Реакція гемаглютинації*

## II. ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

*Дайте визначення основним поняттям і термінам*

- Електронна мікроскопія.....*  
.....
- Імунна електронна мікроскопія.....*  
.....
- Серологія.....*  
.....
- Імуноферментний аналіз.....*  
.....
- Радіоімуноаналіз.....*  
.....
- Полімеразна ланцюгова реакція.....*  
.....
- Агарозний гель-електрофорез.....*  
.....
- Сероконверсія.....*  
.....
- Гемаглютинація.....*  
.....
- IgM.....*  
.....
- IgG.....*  
.....
- Реакція зв'язування комплементу.....*  
.....
- Реакція гальмування гемаглютинації.....*  
.....
- Реакція нейтралізації.....*  
.....
- Радіальний гемоліз.....*  
.....
- Вестерн блот.....*  
.....

### III. ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

**Завдання 1. Реакція гемаглютинації ґрунтується на здатності деяких вірусів викликати злипання (аглютинацію) еритроцитів.**

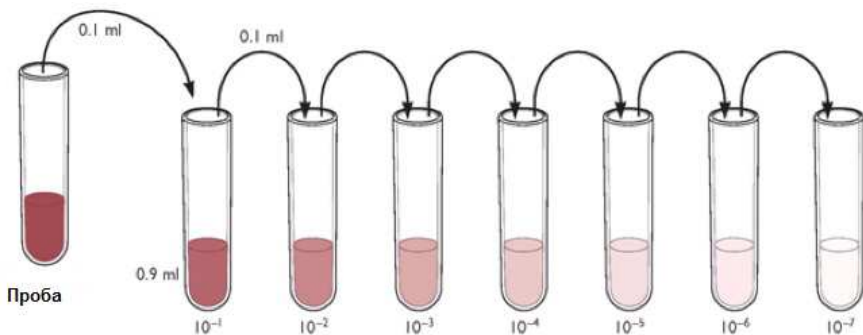
1.1. За запропонованою методикою визначте титр вірусу в реакції гемаглютинації.

#### **Хід роботи**

1. Для реакції використовують 2 % завис еритроцитів. Для її приготування свіжоотриману кров дефібринують, використовуючи антикоагулянти (2,5-5 % розчин цитрату натрію, гепарину).

2. Дефібриновану кров тричі відмивають центрифугуванням у фізіологічному розчині при 1000-1500g, а з осаду готують необхідку концентрацію еритроцитів. Зберігаються вони в холодильнику приблизно тиждень. В разі потреби можна використати формалінізовані еритроцити.

3. Приготуйте в планшеті двократні розведення матеріалу, що містить вірус, на фізіологічному розчині. Для цього до ряду лунок розлийте по 0,02 мл фізіологічного розчину. В першу лунку додайте 0,02 мл досліджуваного матеріалу (отримайте розведення 1:2), перенесіть з неї 0,02 мл до другої, з неї стільки ж до наступної і т.д. З останньої лунки 0,02 мл матеріалу відібрати в дезінфікуючий розчин.



**Рис. Спосіб розведення вірусного матеріалу**

4. Для контролю до 4-5 лунок поруч з дослідним рядом налейте по 0,02 мл фізіологічного розчину.

5. До кожного розведення вірусу і до контролю додайте рівний об'єм еритроцитів.

6. Струсніть планшет і залишіть при 37 °С приблизно на півгодини.

7. Врахуйте результати реакції, беручи до уваги, що інтенсивність реакції залежить від кількості еритроцитів на дні лунок:

– негативна реакція, яка характеризується осадженням еритроцитів на дно лунок у вигляді невеликого кільця з гладкими краями або «гудзичка»;

+ слабка інтенсивність – для даної реакції характерні невеликі одиночні відкладення на дні лунки. Еритроцити, що не аглютинують, утворюють «маленьке кільце» в центрі лунки;

++ середня інтенсивність – їй властиве утворення на дні лунки «широкого щільного кільця» з еритроцитів, що не аглютинують;

+++ інтенсивна реакція – еритроцити, що аглютинують, утворюють так звані «парасольки», в центрі яких, явно видно кільця, що утворилися осівшими неаглютинованими еритроцитами;

++++ різко інтенсивна реакція, в якій аглютинують всі еритроцити і, утворені «паральки», вистилають дно лунок. Титром даної реакції вважають останнє розведення сироватки, при якому виявляється явна аглютинація еритроцитів не менше +++, тобто при інтенсивній або різко інтенсивній реакції.

Занотуйте результати досліджень.

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---







## ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7

### Тема: Противірусна хіміотерапія

**Мета:** засвоїти основні стратегії та мішені противірусної боротьби.

**Компетенції:** знати основні біологічні та методичні проблеми у розробці дієвих противірусних препаратів вміти аналітично спрогнозувати можливу роль визначеної ланки вірусної репродукції як мішені противірусної терапії.

### I. ТЕОРЕТИЧНА ЧАСТИНА

Серед лікарських засобів, що найінтенсивніше розробляються останніми роками, одне з перших місць займають антивірусні препарати (АП). На різних етапах доклінічного і клінічного вивчення постійно знаходяться тисячі сполук, що володіють антивірусною активністю, а фармацевтичний ринок щорік поповнюється десятком нових АП. Якщо врахувати, що до початку 90-х років минулого століття арсенал найефективніших АП, що володіють етіотропним та імунокорегуючими ефектами, був низьким, а терапія вірусних інфекцій зводилася в основному до вживання препаратів патогенетичної або симптоматичної дії, то в сьогодні можна констатувати різку інтенсифікацію пошуку і створення нових АП.

Всі розроблені раніше АП за хімічним складом, механізмом дії, спектром активності і тривалості клінічного ефекту розділяють на три групи.

1. Хіміопрепарати.
2. Інтерферони і їх індуктори.
3. Імуномодулятори.

Лікування **ВІЛ-інфекції** залежить від стадії захворювання, конкретних клінічних проявів і включає власне антивірусну (етіотропну) терапію, імунокорекцію і лікування опортуністичних захворювань.

Найбільш ефективною при ВІЛ-інфекції слід визнати етіотропну терапію. На початкових стадіях ВІЛ-інфекції вона

направлена на пригнічення репродукції збудника, ослаблення його імуносупресивної дії та переривання подальшої передачі вірусу здоровим людя.

Запропоновані для лікування ВІЛ-інфекції засоби за механізмом дії відносяться в основному до інгібіторів протеолізу (табл.1) і ревертази (табл.2), тобто впливають на універсальні мішені (біосинтез вірусних білків і зворотну транскрипцію) в циклі реплікації вірусу інфекції, приводячи до пригнічення розмноження ВІЛ.

Згідно останнім міжнародним рекомендаціям сучасна антивірусна терапія ВІЛ-інфекції включає одночасне використання двох-трьох нуклеозидних інгібіторів зворотної транскриптази в різних поєднаннях в комплексі з інгібіторами протеази. У ряді схем як компонент використовуються нуклеозидні інгібітори ревертази. Комбінована терапія ВІЛ-інфекції забезпечує максимальний клінічний ефект, достовірне зниження вірусного навантаження, зниження смертності на 40% і поліпшення якості життя хворих. Комбінована терапія в значній мірі попереджає мутаційний процес, що приводить до появи резистентних штамів ВІЛ. Однак таке лікування недоступне основній масі хворих СНІДом, оскільки вартість такої терапії досягає 15 тис. доларів США в рік, а використання до 20 різних ліків щодня може привести до цілого ряду важких побічних ефектів.

До списку вказаних в таблиці. 2 засобів можна додати два нові інгібітори ревертази – тимазид і вуазидин, що є аналогами базового препарату азидотимідину.

**Грип та інші ГРВІ.** В обширному арсеналі засобів проти грипу є живі і інактивовані грипозні вакцини, етіотропні антивірусні засоби, протигрипозний людський імуноглобулін, інтерферони (ІФН), багаточисельні антибіотики і хіміотерапевтичні препарати для попередження і лікування постгрипозних бактеріальних ускладнень.

Серед лікарських засобів, що застосовують при грипі, пріоритет належить етіотропним препаратам, дія яких направлена безпосередньо на збудника інфекції. Всі препарати етіотропної дії доцільно розглядати з врахуванням їх дії в циклі репродукції вірусів грипу і інших ГРВІ.

Вживання хіміопрепаратів для профілактики і лікування грипу й інших ГРВІ є загально визнаним світовим стандартом. Хіміотерапевтичні засоби представлені двома основними групами препаратів: блокаторы М2-каналів (амантадин, ремантадин) та інгібіторами нейромінідази (занамівір, озельтамівір). Препарати обох груп володіють прямою противірусною дією, порушуючи різні фази реплікативного циклу вірусів.

Ремантадин і амантадин відносяться до найбільш вивчених хіміопрепаратів. Ремантадин застосовується як для профілактики, так і для лікування грипу А в період епідемій у дорослих і дітей від 2 років і старше, а також проявляє антитоксичну дію при грипі В. Противірусний ефект ремантадину реалізується шляхом інгібування синтезу М-білка вірусу грипу, при цьому порушується процес репродукції і збірки повноцінних віріонів. Одним з основних механізмів антитоксичної дії ремантадину є його здатність захищати організм від розвитку капіляротоксикозу і пов'язаних з ним порушень прохідності судин.

На основі ремантадину створений новий препарат “Полірем”, що є його полімеризованою формою.

У педіатричній практиці застосовується ремантадин в сиропі із спеціальним матричним носієм, що підсилює протизапальну дію ремантадину і що знижує його токсичність.

Окреме місце займає раніше створений синтетичний препарат класу аномальних нуклеозидів, що володіє широким спектром активності відносно багатьох ДНК- і РНК-вмісних вірусів – рибавірин. Рибавірин відноситься до групи інгібіторів протеаз. Проходячи через клітинні мембрани, рибавірин метаболізується, перетворюючись послідовно на моно- і трифосфат. Будучи конкурентним інгібітором інозинмонофосфатдегідрогенази, гальмує синтез вірусної ДНК і РНК. Хоча препарат володіє високою ефективністю, токсичність і недостатньо вивчений механізм дії обмежують його використання в клінічній практиці.

З групи інгібіторів протеаз на стадії вивчення знаходяться препарати мизорібін і 2-деокси-2-фторгуанозин. До групи хіміопрепаратів відносяться також добре відомі препарати:

- дейтифорин – синтетичний препарат класу біциклотенів, за ефективністю рівний з ремантадином, але менш токсичний;
- арбідол – синтетичний хіміопрепарат класу гідрокінонів, що використовують як для лікування грипу А, так і грипу В, володіє окрім антивірусної дії вираженою інтерфероніндукуючою й імунотропною активністю;
- адапромін – синтетичний препарат класу амантанів, дозволений для вживання як профілактичний і лікувальний засіб при грипі А і В і що перевершує за спектром антивірусної дії ремантадин і дейтифорин, активний відносно ремантадинрезистентних штамів вірусів грипу А.

Досягненням в області фармакотерапії грипу з'явилося створення принципово нових препаратів – озельтамівіру і занамівіру. Обидва препаратів блокують ключовий фермент реплікації вірусів грипу А і В – нейромінідазу. Під час інгібування даного ферменту порушуються здатність вірусу проникати в здорові клітини і вихід віріонів з інфікованої клітини, що приводить до обмеження поширення інфекції в організмі. Препарати характеризуються системністю дії, відсутністю розвитку резистентності, їх вживання різко знижує розвиток вторинних бактеріальних ускладнень. Раннє призначення занамівіра показало його ефективність для профілактики грипу більш ніж в 80% випадків.

У медичній практиці знайшли хіміопрепарати, дія яких заснована на інгібуванні протеолітичного дозрівання вірусних поліпептидів (інгібітори протеолізу). До таких препаратів відносяться аprotинін, параамінометилбензойна кислота, амбен тощо, що рекомендуються для лікування гострих інфекцій, викликаних орто-, параміксо-, ретро-, герпес-, флаві-, пікорна, тогавірусами та інших в перші дні захворювання.

Перспективним протівірусним препаратом представляється плеконарил, нещодавно розроблений в США. Виявлена його ефективність проти риновірусів.

Синтезований новий препарат GS-4104, який призначений як для профілактики грипу А і В, так і для лікування.

В більшості випадків вживання лише етіотропних засобів терапії при грипі і ГРВІ буває недостатнім і максимальний клінічний ефект може бути отриманий при поєднаному

вживанні препаратів, оскільки лише в цьому випадку досягається придушення реплікації вірусів з одночасною корекцією порушень систем імунітету і інтерферону.

**Вірусні гепатити.** За останні роки список вірусних гепатитів розширився. На ряду з раніше відомими вірусним гепатитам А, В, С, D, Е були ідентифіковані збудники гепатитів G, F і TTV.

Для лікування вірусних гепатитів протягом останніх 20 років базовими препаратами, що не мають до теперішнього часу альтернативи, залишаються ІФН.

Завдяки системній дії (антивірусний та імуномодулюючий ефекти) досягається пригнічення реплікації вірусу, а саме зниження адсорбції, інгібування депротейнізації, індукція клітинних нуклеаз і протеаз, стимуляція інтерфероногенезу з одночасною стимуляцією HLA гепатоцитів, амплікацією кілерних клітин і цитотоксичних Т-лімфоцитів і продукцією нейтралізуючих антитіл.

Враховуючи недостатню ефективність монотерапії ІФН інтенсивний пошук привів до вивчення як засоби для терапії вірусних гепатитів інгібіторів зворотної транскриптази і, зокрема, аналогів нуклеозидів. Механізм їх дії полягає в блокуванні синтезу вірусної ДНК і РНК шляхом заміни собою натуральних нуклеозидів і тим самим в гальмуванні реплікації вірусу. Ефективність аналогів нуклеозидів вже доведена відносно HSV, VZV, CMV і HIV. Деякі з них виявилися навіть ефективнішими при HBV-інфекції, чим при HIV або HSV.

До вказаної групи препаратів слід віднести ламівудин, ацикловір, рибавірин, ребетол, рибамідил, видарабин, лобукавір, соривудин тощо.

Серед потенційних кандидатів для лікування хронічного гепатиту В слід зазначити новітні нуклеозиди BMS-200475 (ентекавір), емтрицитабін і клевудин, що знаходяться на стадії клінічних досліджень.

Найвивченішим з перерахованих препаратів є ламівудин, застосований для лікування вірусного гепатиту С. В основі механізму дії ламівудину лежить його здатність пригнічувати синтез залежної РНК- ДНК-полімерази HBV.

Основною проблемою, що ставить під сумнів

перспективність використання аналогів нуклеозидів як монотерапія вірусних гепатитів, є розвиток резистентності до препаратів. Так, до року лікування ламівудином в 15–25% хворих спостерігається селекція стійких до препарату штамів, вірогідність їх появи наростає із збільшенням тривалості лікування.

**Герпес.** За даними ВОЗ, смертність від герпетичної інфекції серед вірусних захворювань знаходиться на другому місці (15,8%) після гепатиту (35,8%). Найпоширеніші захворювання, що викликаються вірусом простого герпесу (ВПГ) – ВПГ-1, ВПГ-2, вірусом оперізуючого герпесу і цитомегаловірусом (ЦМВ). Хіміотерапія герпесу заснована на здатності препаратів вибірково порушувати процес взаємодії ВПГ і клітини, включатися в цикл розвитку ВПГ на стадіях синтезу вірусної ДНК і зборки вірусних часток, гальмуючи їх репродукцію, що приводить зрештою до вірусостатичного ефекту (мал. 2).

Антигерпетики складають близько від 80% існуючих АП. Не дивлячись на очевидні успіхи в розробці протигерпетичних препаратів, до цих пір не знайдені лікарські засоби радикального лікування герпетичних інфекцій. Жоден з сучасних антигерпетичних препаратів не запобігає ні переходу вірусу в латентний стан, ні виникненню рецидивів після їх відміни, ні передачі інфекції. Проте, зменшення гостроти загострення і подовження періодів ремісії захворювання є безперечною гідністю антигерпетичних препаратів.

Препарати, раніше запропоновані для лікування герпесу, вельми багаточисельні і розрізняються механізмом дії.

Для досягнення максимального терапевтичного ефекту, а також попередження появи резистентних штамів ВПГ найбільш доцільним є, мабуть, використання препаратів з різним механізмом дії. Великим досягненням можна вважати створення препаратів антигерпетичної спрямованості, що відносяться до класу модифікованих нуклеозидів, а саме ациклічних пуринвімісних нуклеозидів.

До найширше використовуваних в світовій клінічній практиці протигерпетичних засобів відносяться ацикловір, валацикловір, фамцикловір (пенцикловір), ганцикловір, ефективність яких була показана в багаточисельних

рандомізованих клінічних дослідженнях.

Ацикловір – синтетичний ациклічний аналог дезоксигуанозину, природного компонента ДНК, сьогодні залишається світовим стандартом протигерпетичного лікування. Механізм дії ацикловіру полягає в інгібуванні тимідинової кінази вірусу і, отже, процесу реплікації. Ацикловір проникає переважно в заражену вірусом клітину, де під впливом вірусспецифічної тимідинкінази переходить в результаті фосфорилування в активну форму з утворенням моно-, ди- і трифосфатів. Ацикловір знайшов своє вживання для лікування всіх форм герпетичної інфекції.

У зв'язку з тим, що біодоступність ацикловіру низька, протягом останніх 10 років розроблялися різні його аналоги. Новішими антигерпетичними препаратами є валацикловір і фамцикловір (пенцикловир).

Валацикловір – L-валіновий ефір ацикловіру в лікуванні гострих і профілактиці рецидивуючих герпесвірусних інфекцій на 25–40% перевершує ацикловір.

Фамцикловір – аналог гуануну і по клінічній ефективності вельми близький до валацикловіру. Резистентність до валацикловіру і фамцикловіру зустрічається дуже рідко, в основному у ВІЛ-інфікованих пацієнтів. Під час розвитку резистентності можливе вживання інших протівірусних препаратів – ганцикловіру, фоскарнету, цидофовіру або місцево трифлуридину.

Ганцикловір – ациклічний нуклеозид, що найефективніше пригнічує реплікацію герпес-вірусів. Проте із-за високої гемо- і гепатотоксичністю вживання ганцикловіру обмежене.

Фоскарнет є конкурентним інгібітором пірофосфату і володіє широким спектром протівірусної активності, пригнічуючи ДНК-полімерази герпес-вірусів. В той же час необхідно відзначити, що цей фосфорсодержащий препарат володіє токсичністю, і це у ряді випадків обмежує його вживання.

Останнім часом на фармацевтичному ринку з'явилося нове покоління лікарських засобів, здатних зайняти одне з провідних місць в комплексній протизапальній терапії, – індуктори ІФН (циклоферон, аміксин, ридостин і ін.). Ці препарати поєднують етіотропний та імуномодулюючий ефекти.



## II. ПІДГОТОВКА ДО ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

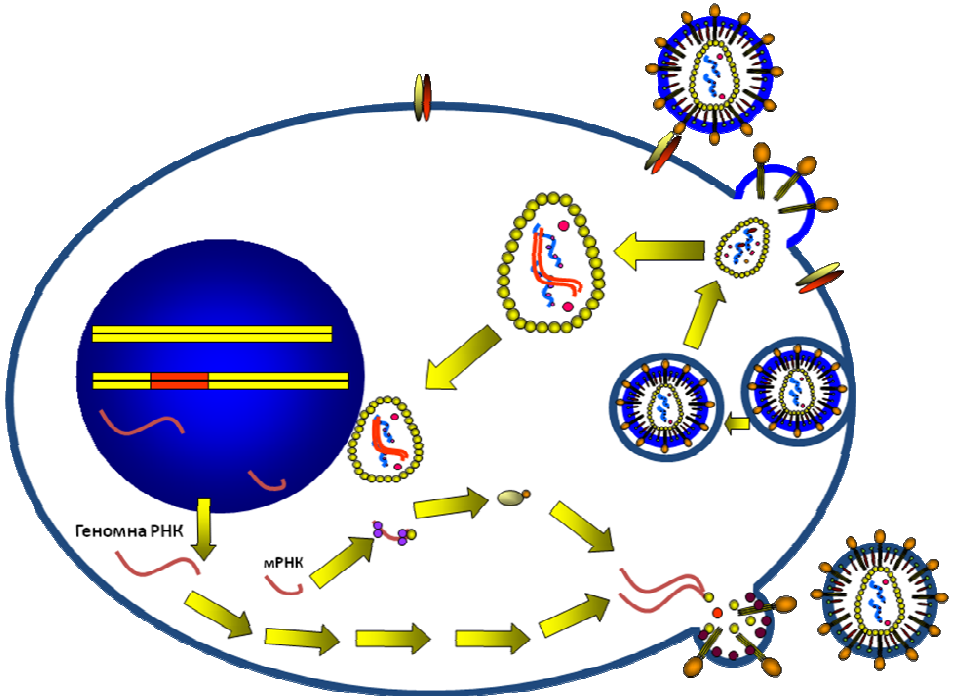
*Дайте визначення основним поняттям і термінам:*

- Елімінація.....*  
.....
- Ерадикація.....*  
.....
- Резистентність.....*  
.....
- Скринінг.....*  
.....
- Інтерферон.....*  
.....
- Індуктори інтерферону.....*  
.....
- Ациклічні нуклеозидні аналоги.....*  
.....
- Похідні адамантану.....*  
.....
- Протеаза ВІЛ.....*  
.....
- Нейрамінідаза.....*  
.....
- Віремія.....*  
.....
- Цитотоксичність.....*  
.....
- HAART.....*  
.....

### III. ВИКОНАННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ РОБОТИ

*Завдання 1. Мішенями дії провірусних препаратів виступають етапи вірусної репродукції.*

1.1. На малюнку позначте мішені противірусних препаратів.







## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

### Основна:

1. Шмараков І.О., Марченко М.М., Співак М.Я. Основи вірусології: підручник / за ред. В.С. Підгорського – Чернівці: Чернівецький нац. ун-т, 2011. – 320 с.
2. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / Под ред. А.А.Воробьева – 2-е изд., испр. и доп. – М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2006. – 704 с.
3. Борисов Л.Б. Медицинская микробиология, вирусология, иммунология: Учебник, М.: ООО «Медицинское информационное агенство», 2005. – 736 с.
4. Коротяев А.И., Бабичев С.А. Медицинская микробиология, иммунология и вирусология.– СПб.: СпецЛит, 2002.– 591 с.
5. Канцерогенез / Под ред. Д.Г.Заридзе. – М.: Медицина, 2004. – 576 с.
6. Поліщук В.П., Будзанівська І.Г., Шевченко Т.П. Посібник з практичних занять до курсу «Загальна вірусологія». – К.: Фітосоціоцентр, 2005. – 204 с.

### Додаткова:

1. Вирусология / Под ред. Б.Филдса, Д.Найпа. в 3 Т./ – М.: Мир, 1989.
2. Бойко А.Л. Основи екології та біофізики вірусів. – К.: Фітосоціоцентр, 2003. – 164 с.
3. Загородній Ю.В., Бойко А.Л. Математичні моделі в дослідженні вірусів рослин. – К.: ЕксОб, 2001. – 152 с.
4. Покровский В.В., Ермак Т.Н., Беляева В.В., Юрин О.Г. ВИЧ-инфекция: клиника, диагностика и лечение/ Под общ. ред. В.В. Покровского. – М.: ГЭОТАР Медицина, 2000. – 496 с.
5. Бахов Н.И., Земсков В.М., Барсуков А.А., Диашев А.Н. Молекулярно-биологические механизмы защиты организма от вирусных инфекций // Успехи современной биологии. – 2004. – Т. 124, № 4. – С. 317 – 328.
6. Новиков Д.К. Противовирусный иммунитет // Иммунопатология. Аллергология. Инфектология. – 2002. – № 1. – С. 5 – 15.
7. Крюкова И.Н. Возможность заражения человека некоторыми онкогенными вирусами млекопитающих // Успехи современной биологии. – 2005. – Т. 125, № 4. – С. 373 – 378.

8. Алибек К., Севко А.Л., Олишевский С.В., Клименко Т. Вирусный канцерогенез: современный взгляд на проблему // Лікарська справа. – 2007. – № 5-6. – С. 3 – 25.
9. Носач Л. Сучасний стан антивірусної хіміотерапії // Вісник фармакології та фармації. – 2004. – № 4. – С. 6 – 10.
10. Гендон Ю.З. Прогресс в разработке вирусных полинуклеотидных (ДНК) вакцин // Вопросы вирусологии. – 1999. – № 4. – С. 148 – 154.
11. Пшеничнов В.А., Лымарь В.Т., Ялышев М.Р., Пшеничнов А.В. Проточная цитометрия в вирусологических исследованиях // Вопросы вирусологии. – 1990. – № 4. – С. 279 – 281.
12. Закиров И.Г. Опыт применения амиксина при лечении и профилактике некоторых вирусных инфекционных заболеваний // Клиническая медицина. – 2002. – № 12. – С. 54 – 58.
13. Семенов Б. Возвращающиеся инфекции – новая проблема вакцинопрофилактики // Инфекционный контроль. – 2002. – № 1. – С. 56 – 58.
14. Онищенко Г.Г., Зверев В.В., Катлинский А.В. и др. Тетравакцина – новый принципиальный подход к предотвращению пандемии гриппа // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. – № 4. – С. 15 – 19.
15. Ершов Ф.И. Новое поколение препаратов для профилактики вирусных инфекций // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2007. – № 4. – С. 100 – 103.
16. Зверев В. Вакцинопрофилактика вирусных инфекций: настоящее и будущее // Инфекционный контроль. – 2002. – № 1. – С. 54 – 55.
17. Суворова З.К., Буравцова Е.В., Деулина М.О., Покровский В.В. Серологическая диагностика инфекций, вызываемых ВИЧ, иммуноферментными методами // Медицинская помощь. – 1993. – № 5. – С. 22 – 24.
18. Максименко О.В. Сучасні підходи до лабораторної діагностики ВІЛ-інфекції // Лабораторна діагностика. – 2003. – № 4. – С. 31 – 37.

## ЗМІСТ

<b>ПЕРЕДМОВА</b> .....	3
<b>ТЕХНІКА БЕЗПЕКИ У ВІРУСОЛОГІЧНИХ ЛАБОРАТОРІЯХ</b> .....	4
<b>ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 1</b> Тема: Структурний аналіз віріонів різних систематичних груп .....	11
<b>ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 2</b> Тема: Методи дослідження вірусів. Використання лабораторних тварин у вірусології .....	20
<b>ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 3</b> Тема: Методи дослідження вірусів. Курячі ембріони та їх використання у вірусології .....	61
<b>ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 4</b> Тема: Методи дослідження вірусів. Використання клітинних культур у вірусології .....	73
<b>ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 5</b> Тема: Поширення вірусів. Особливості життєвих циклів вірусів .....	96
<b>ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 6</b> Тема: Методи діагностики вірусних інфекцій .....	114
<b>ЛАБОРАТОРНА РОБОТА № 7</b> Тема: Протівірусна хіміотерапія .....	146
<b>СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ</b> .....	157

*Навчальне видання*

## **ОСНОВИ ВІРУСОЛОГІЇ**

**Навчально-методичний посібник  
з лабораторного практику**

**Укладачі:** Шмараков Ігор Олександрович  
Кеца Оксана Віталіївна

Літературний редактор *Макарова О. П.*  
Комп'ютерний набір та верстка *Шмараков І.О.*

Формат 60/84. Бумага офсетная. Печать цифровая. Тираж 200 экз.

Опечатано Ч.П. Озеров  
г. Харьков, ул. Университетская 33/9  
Свидетельство о госрегистрации №818604 от 02.03.2000.