НАЦІОНАЛЬНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

В.Г. Скибіцький, О.С. Калініна,
Г.В. Козловська

ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНА ВІРУСОЛОГІЯ

Підручник

ОЛДІ ПЛЮС
2020

УДК 636.09:614:578
С42

Рекомендовано до друку Вченою радою
Національного університету біоресурсів і природокористування України
(протокол № 2 від 23 вересня 2020 р.)

Рецензенти:

Галатюк О.Є. – доктор ветеринарних наук, професор, завідувач кафедри мікробіології, фармакології та епізоотології Житомирського національного агроекологічного університету;

Ушкалов В.О. – доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент НААН України, директор Української лабораторії якості і безпеки продукції АПК НУБіП України;

Корнієнко Л.Є. – доктор ветеринарних наук, професор, головний науковий співробітник епізоотологічного відділу Державного науково-дослідного інституту з лабораторної діагностики і ветсанекспертизи.

С42 Ветеринарно-санітарна вірусологія : підручник / В.Г. Скибіцький, О.С. Калініна, Г.В. Козловська – Херсон: ОЛДІ-ПЛЮС, 2020. – 416 с.

ISBN 978-966-289-357-1

Викладено фундаментальні основи вірусології. Представлено дані про природу і походження вірусів, структурну організацію та хімічний склад, механізм репродукції та популяційну генетику вірусів, особливості патогенезу вірусних інфекцій та противірусного імунітету, імунопрофілактику та хіміотерапію вірусних інфекцій. Охарактеризовано методологію лабораторної діагностики вірусних інфекцій тварин та санітарно-вірусологічного дослідження об'єктів довкілля і харчових продуктів. Подано сучасну класифікацію вірусів та основні таксономічні ознаки родин вірусів людини і тварин. Викладено епізоотологічні особливості, патогенез, клінічні симптоми, патологоанатомічні зміни, методи лабораторної діагностики та засоби імунопрофілактики актуальних вірозів тварин.

Зміст підручника відповідає навчальній програмі дисципліни «Ветеринарно-санітарна вірусологія». Підручник буде корисний студентам, аспірантам і викладачам закладів вищої освіти.

УДК 636.09:614:578

© Скибіцькийс В. Г., Калініна О. С., Козловська Г. В., 2020
© НУБіП України, 2020

ISBN 978-966-289-357-1

ВІДОМОСТІ ПРО АВТОРІВ

Скибіцький Володимир Гурійович

Доктор ветеринарних наук, професор кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології НУБіП України. Викладає навчальні дисципліни: «Ветеринарно-санітарна вірусологія», «Ветеринарна вірусологія», «Ветеринарна мікробіологія», «Лабораторна діагностика інфекційних хвороб». Наукові інтереси стосуються механізмів протиінфекційного імунітету, дослідження етіології та патогенезу інфекційних хвороб тварин, розробки засобів і методів діагностики та профілактики. Автор та співавтор понад 300 наукових і науково-методичних праць, зокрема 7 підручників, 6 практикумів та 7 навчальних посібників; 8 методичних рекомендацій, впроваджених у практику ветеринарної медицини, 12 ТУ на виробництво біологічних препаратів; співавтор 22 патентів.

Електронна адреса: vladimirsk@i.ua

Калініна Ольга Сергіївна

Кандидат ветеринарних наук, доцент, завідувач кафедри мікробіології та вірусології ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького. Викладає навчальні дисципліни «Вірусологія», «Ветеринарна вірусологія», «Клінічна мікробіологія», «Санітарна мікробіологія». Наукові інтереси пов'язані з дослідженням етіопатогенетичних та діагностичних аспектів асоційованих респіраторно-кишкових інфекцій великої рогатої худоби. Автор та співавтор 218 наукових і навчально-методичних праць, зокрема 2 підручників, 2 навчальних посібників, 2 практикумів, 7 науково-методичних рекомендацій; співавтор 2 ТУ на виробництво ветеринарних препаратів, 10 ДСТУ.

Електронна адреса: kalininaos@ukr.net

Козловська Ганна Володимирівна

Кандидат ветеринарних наук, доцент кафедри епізоотології, мікробіології і вірусології НУБіП України. Викладає навчальні дисципліни: «Ветеринарно-санітарна мікробіологія», «Ветеринарна вірусологія», «Veterinary microbiology». Наукові інтереси пов'язані з вивченням еколого-біологічних аспектів збудників харчових токсикоінфекцій в плані розробки ефективних засобів їх діагностики і профілактики. Автор та співавтор 215 наукових і науково-методичних праць, зокрема 5 підручників, 2 практикумів, 9 навчальних посібників, 2 монографій, 6 методичних рекомендацій, впроваджених у практику ветеринарної медицини та 23 методичних вказівок із навчальних дисциплін; співавтор 7 патентів.

Електронна адреса: annakozlovska@i.ua

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 11

ПЕРЕДМОВА 15

РОЗДІЛ І. БІОЛОГІЯ ВІРУСІВ 17

ТЕМА 1.1. ВВЕДЕННЯ У ВІРУСОЛОГІЮ 17

1.1.1. Історія розвитку вірусології 17

1.1.2. Природа і походження вірусів 23

1.1.3. Роль вірусів у інфекційній патології людини і тварин та завдання сучасної вірусології 29

Питання для обговорення та самоперевірки 36

ТЕМА 1.2. СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ХІМІЧНИЙ СКЛАД ВІРУСІВ 37

1.2.1. Фізична структура вірусів 37

1.2.2. Хімічний склад вірусів 41

Нуклеїнові кислоти 41

Протеїни 43

Ліпіди 46

Вуглеводи 47

Компоненти клітини-хазяїна 47

Питання для обговорення та самоперевірки 48

ТЕМА 1.3. КЛАСИФІКАЦІЯ ТА НОМЕНКЛАТУРА ВІРУСІВ 48

1.3.1. Основи класифікації вірусів 48

1.3.2. Основні таксономічні ознаки родин вірусів людини і тварин 54

Питання для обговорення та самоперевірки 58

ТЕМА 1.4. РЕПРОДУКЦІЯ ВІРУСІВ 58

1.4.1. Особливості репродукції вірусів 58

1.4.2. Адсорбція і проникнення віріонів у клітину 60

1.4.3. Депротеїнізація (роздягання) віріонів 62

1.4.4. Транскрипція вірусних геномів 64

1.4.5. Трансляція вірусних іРНК 66

1.4.6. Реплікація вірусних геномів 68

1.4.7. Формування і вихід віріонів із клітини 74

Питання для обговорення та самоперевірки 77

ТЕМА 1.5. ПОПУЛЯЦІЙНА ГЕНЕТИКА ВІРУСІВ 78
1.5.1. Структурна організація вірусного геному 78
1.5.2. Характеристика популяційної структури вірусів 80
1.5.3. Механізми спадкової мінливості вірусів 82
1.5.4. Генетичні та негенетичні взаємодії вірусів 86
1.5.5. Загальні принципи генної інженерії 89
Питання для обговорення та самоперевірки 91
Висновки 91

РОЗДІЛ ІІ. ВІРУСНА ІНФЕКЦІЯ ТА ПРОТИВІРУСНИЙ ІМУНІТЕТ 93

ТЕМА 2.1. ПАТОГЕНЕЗ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ 93
2.1.1. Особливості патогенезу вірусних інфекцій 93
2.1.2. Вірусна інфекція клітин 94
2.1.3. Цитопатологія вірусних інфекцій 97
2.1.4. Шляхи проникнення вірусів у організм 99
2.1.5. Первинна репродукція та поширення вірусів у організмі 101
2.1.6. Локалізація вірусів у організмі та деструкція чутливих клітин 102
2.1.7. Форми вірусних інфекцій та основні механізми персистенції вірусів 104
Питання для обговорення та самоперевірки 106

ТЕМА 2.2. ЕКОЛОГО-ЕПІЗООТОЛОГІЧНІ (ЕПІДЕМІОЛОГІЧНІ) АСПЕКТИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ 107
2.2.1. Вплив антропогенних чинників на екологію вірусів та екологічні ніші вірусів 107
2.2.2. Механізми виникнення і поширення вірусних інфекцій 108
2.2.3. Екологічна роль вірусної персистенції, кровосисних членистоногих і хребетних 111
2.2.4. Спільність збудників вірусних інфекцій людини і тварин 114
2.2.5. Еволюція вірусів 117
Питання для обговорення та самоперевірки 119

ТЕМА 2.3. ПРОТИВІРУСНИЙ ІМУНІТЕТ 119
2.3.1. Особливості противірусного імунітету 119
2.3.2. Характеристика вірусів як антигенів 120
2.3.3. Клітинні чинники противірусного імунітету 122
2.3.4. Гуморальні чинники противірусного імунітету 126

Антитіла 127
Інгібітори 129
Комплемент 130
Інтерферони 131
2.3.5. Імунопатологічні реакції за вірусних інфекцій та вірусіндукована імуносупресія 133
Питання для обговорення та самоперевірки 136

ТЕМА 2.4. ІМУНОПРОФІЛАКТИКА ТА ХІМІОТЕРАПІЯ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ 137
2.4.1. Загальні принципи імунопрофілактики вірусних інфекцій і типи вірусних вакцин 137
2.4.2. Цільновіріонні вакцини 139
2.4.3. Субодиничні вакцини 141
2.4.4. Генноінженерні вакцини 142
2.4.5. Синтетичні вакцини 144
2.4.6. Засоби хіміотерапії вірусних інфекцій 144
Питання для обговорення та самоперевірки 149
Висновки 149

РОЗДІЛ ІІІ. МЕТОДОЛОГІЯ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ТВАРИН 151

ТЕМА 3.1. ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ТВАРИН 151
3.1.1. Методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій тварин 151
3.1.2. Відбір патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин для вірусологічного дослідження 154
Питання для обговорення та самоперевірки 158

ТЕМА 3.2. ЕКСПРЕС-МЕТОДИ ІНДИКАЦІЇ ВІРУСІВ 158
3.2.1. Вірусоскопія 158
3.2.2. Електронна та імуноелектронна мікроскопія 160
3.2.3. Індикація тілець-включень вірусів 164
3.2.4. Метод ДНК-зондів 166
3.2.5. Полімеразна ланцюгова реакція 167
Питання для обговорення та самоперевірки 169

ТЕМА 3.3. ІЗОЛЯЦІЯ ВІРУСІВ У ЧУТЛИВИХ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМАХ 169
3.3.1. Ізоляція вірусів у організмі лабораторних тварин 169
3.3.2. Ізоляція вірусів у курячих ембріонах 178

3.3.3. Ізоляція вірусів у культурах клітин 188
Питання для обговорення та самоперевірки 201

ТЕМА 3.4. ТИТРУВАННЯ ВІРУСІВ 201
3.4.1. Титрування вірусів за інфекційною активністю 202
3.4.2. Титрування вірусів за гемаглютинувальною активністю 205
Питання для обговорення та самоперевірки 209

ТЕМА 3.5. СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСІВ ТА АНТИТІЛ 209
3.5.1. Загальні принципи серологічних реакцій 209
3.5.2. Реакція нейтралізації 211
3.5.3. Реакція затримки гемаглютинації 213
3.5.4. Реакція непрямої гемаглютинації 215
3.5.5. Реакція затримки гемадсорбції 217
3.5.6. Реакція зв'язування комплементу 218
3.5.7. Реакція дифузійної преципітації 223
3.5.8. Реакція імунофлуоресценції 224
3.5.9. Імуноензимний аналіз 227
3.5.10. Імунохроматографічний аналіз 231
Питання для обговорення та самоперевірки 232
Висновки 233

РОЗДІЛ IV. МЕТОДОЛОГІЯ САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ОБ'ЄКТІВ ДОВКІЛЛЯ І ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ 234

ТЕМА 4.1. СТІЙКІСТЬ ВІРУСІВ ТА ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ОБ'ЄКТІВ ДОВКІЛЛЯ І ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ 234
4.1.1. Стійкість вірусів у навколишньому середовищі 234
4.1.2. Загальні принципи санітарно-вірусологічного дослідження об'єктів довкілля і харчових продуктів 241
Питання для обговорення та самоперевірки 242

ТЕМА 4.2. САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВОДИ 242
Питання для обговорення та самоперевірки 252

ТЕМА 4.3. САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ҐРУНТУ ТА ОСАДУ СТІЧНИХ ВОД 253
Питання для обговорення та самоперевірки 255

ТЕМА 4.4. САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОВІТРЯ 255
Питання для обговорення та самоперевірки 258

ТЕМА 4.5. САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗМИВІВ ІЗ ПРЕДМЕТІВ ПОБУТУ 258
Питання для обговорення та самоперевірки 260

ТЕМА 4.6. САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ 261
Питання для обговорення та самоперевірки 265
Висновки 265

РОЗДІЛ V. СПЕЦІАЛЬНА ВІРУСОЛОГІЯ 267

ТЕМА 5.1. ДНК-ГЕНОМНІ ВІРУСИ 267
5.1.1. Родина *Poxviridae* (поксвіруси) 267
Вірус нодулярного дерматиту (Infectious nodular dermatitis virus) 269
Вірус міксоми (Myxoma virus) 272
5.1.2. Родина *Asfarviridae* (асфарвіруси) 275
Вірус африканської чуми свиней (African swine fever virus) 276
5.1.3. Родина *Herpesviridae* (герпесвіруси) 283
Альфагерпесвірус свиней 1 (Suid alphaherpesvirus 1) 285
Альфагерпесвірус ВРХ 1 (Bovine alphaherpesvirus 1) 290
Альфагерпесвіруси коней 1 і 4 (Equid alphaherpesviruses 1, 4) 295
Альфагерпесвіруси курячих 2 і 3 (Gallid alphaherpesviruses 2, 3) 300
5.1.4. Родина *Adenoviridae* (аденовіруси) 306
Мастаденовіруси ВРХ A, B і C, атаденовірус ВРХ D (Bovine mastadenoviruses A, B, C, Bovine atadenovirus D) 307
5.1.5. Родина *Parvoviridae* (парвовіруси) 310
Амдопарвовірус м'ясоїдних 1 (Carnivore amdoparvovirus 1) 311
Питання для обговорення та самоперевірки 315

ТЕМА 5.2. РНК-ГЕНОМНІ ВІРУСИ 316
5.2.1. Родина *Paramyxoviridae* (параміксовіруси) 316
Респіровірус ВРХ 3 (Bovine respirovirus 3) 317
Ортоавулавірус птахів 1 (Avian orthoavulavirus 1) 321
5.2.2. Родина *Rhabdoviridae* (рабдовіруси) 327
Ліссавірус сказу (Rabies lyssavirus) 328
5.2.3. Родина *Orthomyxoviridae* (ортоміксовіруси) 336
Вірус грипу А (Influenzavirus A) 338
5.2.4. Родина *Coronaviridae* (коронавіруси) 343
Альфакоронавірус 1 (Alphacoronavirus 1) 344
5.2.5. Родина *Flaviviridae* (флавівіруси) 349
Пестівірус С (Pestivirus C) 350

5.2.6. Родина *Picornaviridae* (пікорнавіруси) . . . 357
Вірус ящуру (Foot-and-mouth disease virus) . . . 358
Тешовірус А (Teshovirus A) . . . 364
5.2.7. Родина *Caliciviridae* (каліцівіруси) . . . 367
Вірус геморагічної хвороби кролів (Rabbit hemorrhagic disease virus) . . . 368
5.2.8. Родина *Retroviridae* (ретровіруси) . . . 371
Вірус лейкозу ВРХ (Bovine leukemia virus) . . . 373
Ротавіруси А, В і С (Rotaviruses A, B, C) . . . 382
5.2.10. Родина *Birnaviridae* (бірнавіруси) . . . 386
Вірус інфекційної бурсальної хвороби (Infectious bursal disease virus) . . . 387
Питання для обговорення та самоперевірки . . . 391

ТЕМА 5.3. ПАТОГЕННІ ПРІОНИ . . . 392
Питання для обговорення та самоперевірки . . . 401

ТЕМА 5.4. КЛІНІЧНІ ПРОЯВИ ВІРУСНИХ І ПРІОНОВИХ ІНФЕКЦІЙ ТВАРИН . . . 401
Питання для обговорення та самоперевірки . . . 408

Висновки . . . 408

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ . . . 410

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК . . . 412

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АХН – алеутська хвороба норок
АЧС – африканська чума свиней
БУО – бляшкоутворювальна одиниця
в/в – внутрішньовенно
ВГХК – вірусна геморагічні хвороба кролів
ВД – вірус діареї
ВІЛ – вірус імунодефіциту людини
в/м – внутрішньом'язово
ВРХ – велика рогата худоба
ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров'я
ВООЗт – Всесвітня організація охорони здоров'я тварин
ВУО – віспоутворювальна одиниця
в/ч – внутрішньочеревно
в/ш – внутрішньошкірно
ГАО – гемаглютинувальна одиниця
ГЕ – губчастоподібна енцефалопатія
ГЛА – гідролізат лактоальбуміну
ГРВІ – гострі респіраторні вірусні інфекції
ГСТ – гіперчутливість сповільненого типу
Детройт-6 – перещеплювана культура клітин із метастазу раку легень у кістковий мозок
$ЕД_{50}$ – 50 %-ва ефективна доза
ЕМ – електронна мікроскопія
ЗІЕФ – зустрічний імуноелектро форез
ІБХ – інфекційна бурсальна хвороба
$ІД_{50}$ – 50%-ва інфекційна доза
ІЕА – імуноензимний аналіз
ІЕМ – імуноелектронна мікроскопія
і/н – інтраназально
і/т – інтратрахеально
і/ц – інтрацеребрально
ІЛ – інтерлейкін
ІПВВ – інфекційний пустульозний вульвовагініт
ІРТ – інфекційний ринотрахеїт

ІХА – імунохроматографічний аналіз
ІФН – інтерферон
кДа – кілодальтон (103 дальтон)
КЧС – класична чума свиней
$ЛД_{50}$ – 50%-ва летальна доза
ЛРС – лімфоретикулярна система
МДа – мегадальтон (106 дальтон)
МЕБ – Міжнародне епізоотичне бюро
мкг – мікрограм
мкл – мікролітр
мкм – мікрометр
МО – міжнародна одиниця
нвХКЯ – новий варіант хвороби Крейтцфельдта – Якоба
нм – нанометр
НСК – нормальна сироватка кроля
ОД – одиниця дії
ПГ-3 – парагрип-3
ПЕГ 4000, ПЕГ 6000 – поліетиленгліколь із мол. масою 4000 Д і 6000 Д
ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція
п/ш – підшкірно
РАЛ – реакція аглютинації латексу
РБТЛ – реакція бласттрансформації лімфоцитів
РГА – реакція гемаглютинації
РГАд – реакція гемадсорбції
РДП – реакція дифузійної преципітації
РЗГА – реакція затримки гемаглютинації
РЗГАд – реакція затримки гемадсорбції
РЗК – реакція зв'язування комплементу
РІА – радіоімунний аналіз
РІД – реакція імунодифузії
РІФ – реакція імунофлуоресценції
РН – реакція нейтралізації
РНГА – реакція непрямої гемаглютинації
РНІФ – реакція непрямої імунофлуоресценції
РНФМ – реакція нейтралізації флуоресціюючих мікробляшок
РРГ – реакція радіального гемолізу
РРІД – реакція радіальної імунодифузії
РС – респіраторно-синцитіальний
САФ – скрейпіасоційовані фібрили
СНЕВ – перещеплювана культура клітин нирки ембріона свині
СНС – симпатична нервова система
СНІД – синдром набутого імунодефіциту
ТГЕ – трансмісивні губчастоподібні енцефалопатії
ТГЕС – трансмісивний гастроентерит свиней
ТЕН – трансмісивна енцефалопатія норок
$ТЦД_{50}$ – 50%-ва тканинна цитопатична доза
УФ – ультрафіолетові
ФБР – фосфатний буферний розчин
ФДК – фолікулярні дендритні клітини
ХАО – хоріоналантоїсна оболонка
ЦНС – центральна нервова система
ЦПД – цитопатогенна дія
ЦТЛ – цитотоксичні Т-лімфоцити
BESP – перещеплювана культура клітин селезінки ембріона корові
BHK-21 – перещеплювана культура клітин нирки сірійського хом'яка
COS – перещеплювана культура клітин мавпи, стабільно трансформована атенуйованим дефектним поліомавірусом макак-резусів 1
COVID-19 – тяжкий гострий респіраторний синдром 2
CRFK – перещеплювана культура клітин нирок кота
FRhK-4, FRhK-6 – перещеплювані культури клітин нирки ембріона макаки-резус
H – гемаглютинін
HeLa – перещеплювана культура клітин карциноми шийки матки жінки
Hep-2 – перещеплювана культура клітин карциноми гортані людини
Ig – імуноглобулін
KB – перещеплювана культура клітин карциноми ротової порожнини людини
L – перещеплювана культура клітин підшкірної сполучної тканини миші

L-41	– перещеплювана культура фібробластів миші
L20B	– перещеплювана культура фібробластів миші (L-клітин), яким генно-інженерним методом надана здатність експресувати рецептор до ентеровірусу С
MA-104	– перещеплювана культура клітин нирки макаки-резус
MDBK	– перещеплювана культура клітин нирки ембріона корови
MDCK	– перещеплювана культура клітин нирки собаки
MERS	– гострий респіраторний синдром Близького Сходу
MERS-CoV	– коронавірус гострого респіраторного синдрому Близького Сходу
MHC	– головний комплекс гістосумісності
MS	– перещеплювана культура клітин нирки мавпи
N	– нейрамінідаза
pH	– показник концентрації водневих іонів
PK-15	– перещеплювана культура клітин нирки поросяти
PrP	– пріонний протеїн (пріон)
PrPc	– клітинна ізоформа пріона
PrPsc	– інфекційна ізоформа пріона
RD	– перещеплювана культура клітин рабдоміосаркоми людини
SARS	– тяжкий гострий респіраторний синдром
SARS-CoV	– коронавірус тяжкого гострого респіраторного синдрому
SARS-CoV-2	– коронавірус тяжкого гострого респіраторного синдрому 2
T84	– перещеплювана культура клітин карциноми токстого кишечнику людини/метастази в легені
Vero	– перещеплювана культура клітин нирки африканської зеленої мавпи
Wi-38	– диплоїдна культура клітин легень ембріона людини

100-річчю факультету
ветеринарної медицини НУБіП України
присвячується

ПЕРЕДМОВА

Віруси є облігатними внутрішньоклітинними генетичними паразитами, які повсюдно поширені серед тварин, рослин, грибів, найпростіших, бактерій та архей. Віруси є повноправними представниками різноманіття живої природи на різних рівнях організації життя і невід'ємною частиною біоценозів. Вони підтримують екологічну рівновагу, впливаючи на чисельність популяцій своїх хазяїв, і є резервуаром генетичної різноманітності на Землі.

Віруси посідають вагоме місце в інфекційній патології людини і тварин, зумовлюючи епідемічні та епізоотичні спалахи небезпечних захворювань (у тому числі зооантропонозів). Віруси контамінують об'єкти довкілля і харчову продукцію, чим створюється потенційна епідемічна небезпека. Без чіткого розуміння природи, біології та екології вірусів, механізмів патогенної дії їх на організм неможливо здійснювати фаховий контроль за вірусними інфекціями.

Навчальна дисципліна «Ветеринарно-санітарна вірусологія» – важливий елемент у підготовці висококваліфікованих фахівців зі спеціальності 212 «Ветеринарна гігієна, санітарія і експертиза». *Основними завданнями,* які стоять перед студентами при вивченні дисципліни, є: 1) пізнання фундаментальних властивостей вірусів, які мають ветеринарно-санітарне значення; 2) вивчення етіології, патогенезу, засобів імунопрофілактики та методів індикації збудників актуальних вірусних інфекцій тварин; 3) вивчення закономірностей циркуляції патогенних для людини вірусів у об'єктах довкілля (вода, ґрунт, повітря, предмети побуту) і харчових продуктах; 4) засвоєння методів санітарно-вірусологічного дослідження об'єктів довкілля і харчових продуктів.

У результаті вивчення навчальної дисципліни «Ветеринарно-санітарна вірусологія», студенти повинні *знати:* фундаментальні основи біології вірусів; таксономію та номенклатуру вірусів; популяційну генетику й екологію вірусів; етіологію та патогенез вірусних інфекцій тварин, механізми противірусного імунітету і засоби імунопрофілактики; методи індикації вірусів у патологічному матеріалі від хворих і загиблих тварин;

методи санітарно-вірусологічного дослідження об'єктів довкілля і харчових продуктів.

Студенти повинні *вміти:* правильно відбирати для лабораторного дослідження проби матеріалу від хворих і загиблих тварин, з об'єктів довкілля і харчових продуктів; складати план лабораторного дослідження; засвоїти методи швидкої індикації вірусів безпосередньо в досліджуваних пробах, ізоляції вірусів у чутливих лабораторних об'єктах та методи серологічної ідентифікації вірусів і специфічних антитіл; аналізувати та узагальнити результати лабораторного дослідження і на цій основі зробити висновок про потенційну епідемічну небезпеку.

Всі розділи підручника написані його авторами консолідовано: розділи 1–3 – Скибіцький В.Г., Калініна О.С., Козловська Г.В.; розділ 4 – Козловська Г.В., Калініна О.С., Скибіцький В.Г.; розділ 5 – Калініна О.С., Козловська Г.В., Скибіцький В.Г.

Розділ І
БІОЛОГІЯ ВІРУСІВ

Навчальні цілі розділу: ознайомитися з історією відкриття вірусів, досягненнями та актуальними завданнями вірусології, роллю вірусів у інфекційній патології людини і тварин; пізнати природу і гіпотези походження вірусів, їхні кардинальні відмінності від клітинних форм життя; знати фізичну структуру, хімічний склад та особливості репродукції вірусів; засвоїти основи популяційної генетики вірусів; знати сучасну класифікацію та номенклатуру вірусів, основні таксономічні ознаки родин вірусів людини і тварин.

ТЕМА 1.1. ВВЕДЕННЯ У ВІРУСОЛОГІЮ

1.1.1. Історія розвитку вірусології

Вірусологія як нова галузь інфекційної патології виникла наприкінці XIX століття, коли стало зрозуміло, що багато поширених заразних хвороб людини, тварин і рослин спричинюються патогенами, відмінними від бактерій і найпростіших. З часу відкриття вірусів минуло вже 128 років. І дотепер не послаблюється увага науковців всього світу до цих унікальних об'єктів органічного світу, які перебувають на межі між живою й неживою матерією і не здатні проявляти будь-які ознаки життя поза клітинами.

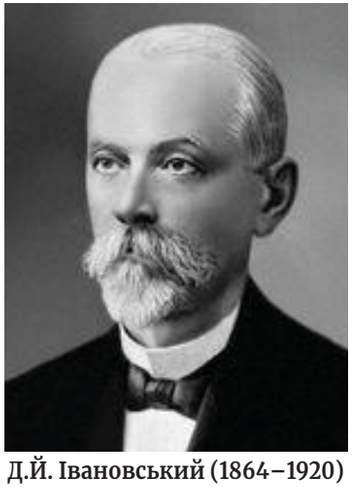
Ця невгасима увага до вірусів зумовлена двома основними причинами. Насамперед, віруси були й залишаються одними з основних збудників інфекційних захворювань людини і тварин. Достатньо згадати одну з найдревніших і найстрашніших хвороб в історії людства – *натуральну віспу,* описану за 4 тис. років до н.е. в країнах Близького Сходу. Саме віспа стала першою інфекційною хворобою, проти якої були розроблені ефективні засоби імунопрофілактики, що дало змогу ліквідувати її в цілому світі. *Поліомієліт* 3,5 тис. років тому назад уражав дітей Древнього Єгипту і в середині XX століття становив серйозну загрозу людству. Створення поліовакцини стало справжнім тріумфом вірусологів і радикальним засобом боротьби з цією небезпечною хворобою. Найбільш масова вірусна інфекція людини – *грип*, незважаючи на невтомні зусилля науковців багатьох країн, ще не переможена. Чумою XX століття назвали *СНІД,* а чумою

XXI століття – COVID-19; це одні з найнебезпечніших сучасних захворювань людини. Загальновизнано існування *онкогенних вірусів*, які спричинюють злоякісні пухлини у тварин і людини. Поширені *вірусні інфекції тварин і рослин* завдають сільському господарству значних економічних збитків та зменшують продовольчі ресурси людства.

Неослабна увага до вірусів не обмежується лише їхньою провідною роллю в інфекційній патології людини, тварин і рослин. Як найбільш просто організовані форми життя, віруси є незамінними, самою природою створеними моделями, що допомагають вирішувати фундаментальні питання біології.

Слово «*virus*» латинського походження і буквально означає «*отрута*». Вірусологія зародилася в надрах мікробіології. Історія її досить незвичайна. Першу в світі вакцину – проти натуральної віспи – розробив видатний англійський лікар *Е. Дженнер* у 1796 р. із лімфи телят, хворих на коров'ячу віспу. Це було за 96 років до відкриття вірусів. Другу вірусну вакцину – антирабічну (проти сказу) – отримав на кролях знаменитий французький учений, основоположник наукової мікробіології та імунології *Л. Пастер* у 1885 р., за сім років до відкриття вірусів.

Це без перебільшення епохальне відкриття належить видатному російському вченому-ботаніку ***Д.Й. Івановському*** (1864–1920 рр.). У 1887 р., вивчаючи *мозаїчну хворобу тютюну*, він встановив, що збудник невидимий у світловому мікроскопі, не росте на штучних живильних середовищах і проходить через бактеріальні фільтри. Про результати досліджень Д.Й. Івановський доповів 12 лютого 1892 р. у Російській академії наук та опублікував у праці під назвою «Про дві хвороби тютюну». В ній уперше було описано основні ознаки збудника тютюнової мозаїки, які тривалий час залишалися єдиними критеріями для зарахування інфекційних агентів до вірусів: фільтрівність і нездатність рости на штучних живильних середовищах. Д.Й. Івановський назвав збудника *фільтрівним вірусом.*



Д.Й. Івановський (1864–1920)

Наукові кола не надали серйозної уваги цьому відкриттю на фоні блискучих успіхів мікробіології того часу. В 1898 р. авторитетний німецький

мікробіолог *Ф. Леффлер* разом із *П. Фрошем* відкрили новий фільтрівний збудник – *вірус ящуру,* а в 1901 р. американський військовий лікар *В. Рід* виявив перший вірус людини – *збудник жовтої гарячки*. Ці сенсаційні відкриття підтвердили концепцію Д.Й. Івановського, представлену в 1892 р.

Отже, Д.Й. Івановський відкрив віруси – нову форму існування органічної матерії, дав критерії та методи їхньої індикації, заклав основи низки наукових напрямків у вірусології, а саме: вивчення природи вірусів, цитопатології вірусних інфекцій, фільтрівних форм мікроорганізмів, хронічного і латентного вірусоносійства.

Авторитетний нідерландський мікробіолог *М. Бейерінк,* автор концепції *contagium vivum fluidum*, якому багато зарубіжних учених приписували честь відкриття вірусу тютюнової мозаїки, визнав у 1899 р. пріоритет Д.Й. Івановського. Всесвітньо відомий американський вірусолог і біохімік *В. Стенлі* в 1935 р. виділив вірус тютюнової мозаїки в кристалічному вигляді й отримав за це в 1946 р. Нобелівську премію, теж визнав пріоритет Д.Й. Івановського. Він сказав: «Є значні підстави вважати Івановського батьком нової науки – вірусології, яка представляє в теперішній час поле діяльності великого і важливого значення. Право Івановського на славу росте з роками. Я вважаю, що його відношення до вірусів треба розглядати в такому аспекті, як ми дивимося на відношення Пастера і Коха до бактерій».

Упродовж 1902–1905 рр. було встановлено вірусну етіологію чуми ВРХ, свиней і м'ясоїдних, віспи овець, кіз і птахів, хвороби Ауєскі, інфекційної анемії коней. У 1908 р. данські науковці *В. Еллерман* і *О. Банг* довели вірусну природу *лейкозу курей*. Проте ці дослідження не отримали належної оцінки, оскільки лейкози тривалий час не зараховували до неопластичних хвороб. У 1911 р. було відкрито перший офіційно визнаний онкогенний *вірус саркоми Рауса*, названий на честь автора. У 1966 р. американський вірусолог *П. Раус* отримав за це відкриття Нобелівську премію. У 1915 р. англійський мікробіолог *Ф. Туорт* уперше спостерігав феномен бактеріофагії в культурі стафілококів, а в 1917 р. канадський мікробіолог *Ф. д'Ерелль* виділив вірус, що уражав бактерії (дизентерійний бактеріофаг).

Отже, за короткий історичний проміжок часу – всього 25 років – було відкрито основні групи вірусів рослин, тварин, бактерій і людини.

Стрімкий розвиток вірусології нерозривно пов'язаний із впровадженням нових методів і техніки вірусологічних досліджень і насамперед – методів виділення й культивування вірусів у лабораторних умовах. Як у жодній іншій науці, у вірусології простежується швидка і чітка зміна рівнів пізнання дослідного об'єкта – від рівня організму до субмолекулярного.

У **1930–1940 рр.** віруси вивчаються ***на рівні організму***. Спочатку єдиною експериментальною моделлю для культивування вірусів були *лабораторні тварини*. З 1940-х рр. у вірусологічну практику запроваджено *курячі ембріони*. Це стало значним кроком уперед у розвитку вірусології та розширило спектр вірусів, які культивуються в лабораторних умовах.

У 1941 р. американський вірусолог *Дж. Герст* відкрив явище гемаглютинації, що сприяло дослідженню взаємодії вірусів із чутливими клітинами на моделі вірусу грипу та еритроцитів.

Значний внесок у розвиток вірусології зробили російські вірусологи *Л.О. Зільбер, М.П. Чумаков* та ін. У 1937 р. вони відкрили вірус кліщового енцефаліту, виявили його переносників – іксодових кліщів, розробили методи лабораторної діагностики, профілактики і лікування.

Важливою подією в розвитку вірусології стали дослідження вірусу жовтої гарячки і розробка двох вакцин у 1934–1937 рр. (на білих мишах і курячих ембріонах). За ці дослідження в 1951 р. американський вірусолог *М. Тейлер* отримав Нобелівську премію.

У **1950-ті рр.** віруси вивчаються ***на рівні клітини***, коли у вірусологічну практику було запроваджено *метод культури клітин*. Це стало справжньою революцією, почалася золота ера вірусології. Культура клітин є найдосконалішою системою для культивування вірусів. У культурі клітин було виділено та ідентифіковано сотні нових, невідомих до того часу вірусів, які не розмножуються ні в організмі лабораторних тварин, ні в курячих ембріонах. Таким чином було встановлено вірусну етіологію багатьох хвороб людини і тварин. На моделі культури клітин досліджено взаємодію вірусів із чутливими клітинами, детально вивчено стадії репродукції вірусів. Метод культури клітин дав можливість створити високоефективні вірусні вакцини.

Широке застосування культури клітин у вірусології стало можливим завдяки важливому відкриттю американських вірусологів *Дж. Ендерса, Т. Веллера* і *Ф. Роббінса* в 1949 р. Вони встановили здатність збудника поліомієліту розмножуватися в культурі клітин нирки африканської зеленої мавпи і спричинювати цитопатичні зміни та обґрунтували виробництво поліомієлітної вакцини. У 1954 р. за це відкриття їм присуджено Нобелівську премію. Першою культуральною вакциною стала вакцина проти поліомієліту, яку розробили американські та російські вірусологи (*Дж. Солк,* 1954; *А. Себін, М.П. Чумаков, А.О. Смородінцев,* 1956). Після поліовакцини було створено інші культуральні вакцини – проти кору, краснухи, кліщового енцефаліту, сказу, ящуру тощо.

У **1960-ті рр.** дослідження вірусів виходить ***на молекулярний рівень***. У вірусології стали широко застосовувати *методи молекулярної біології*, за допомогою яких встановлено будову вірусів і механізм їхньої репродукції. Однак це ще не все. Віруси завдяки простій організації їхнього геному стали незамінною моделлю для молекулярної біології, генетики, генної інженерії, біохімії, імунології. Всі фундаментальні відкриття в біології (розшифрування структури і механізму реплікації ДНК, генетичного коду, механізму синтезу протеїнів) були зроблені завдяки використанню вірусів як експериментальної моделі. Сама вірусологія, широко використовуючи ідеї та методи молекулярної біології, генетики, біохімії та інших наук, почала інтенсивно розвиватися. У 1969 р. Нобелівськими лауреатами стали американські вірусологи *М. Дельбрюк, А. Герші* і *С. Лурія* за відкриття механізму реплікації та генетичної структури вірусів.

І, нарешті, в **1970-ті рр.** віруси вивчаються ***на субмолекулярному рівні***. Стрімкий розвиток молекулярної біології відкриває широкі можливості й перспективи в дослідженні первинної структури нуклеїнових кислот і протеїнів. З'являються *методи секвенування*, за допомогою яких визначають послідовність нуклеотидів та амінокислот у відповідних макромолекулах. Отримано перші генетичні карти геномів ДНК-вмісних вірусів.

У 1970 р. американські вірусологи *Г. Темін* і *Д. Балтімор* відкрили в складі РНК-вмісних онкогенних ретровірусів *зворотну транскриптазу (ревертазу)* – ензим, який переписує генетичну інформацію з РНК на ДНК. Це стало одним із найбільших внесків вірусології в сучасну науку. Використання зворотної транскриптази лежить в основі генної інженерії. За допомогою цього ензиму став реальним синтез гена на матриці іРНК, виділеної з полісом. З'явилася можливість отримати ДНК-копію РНК-геному і провести її секвенування. За відкриття зворотної транскриптази Г. Теміну і Д. Балтімору було присуджено в 1975 р. Нобелівська премія.

У 1972 р. виникає новий розділ молекулярної біології – ***генна інженерія***. У США *П. Берг* опублікував першу генноінженерну роботу про створення гібридної (рекомбінантної) молекули ДНК: він «зшив» *in vitro* фрагменти геномів двох неспоріднених вірусів: поліомавірусу макак-резусів 1 і бактеріофага λ. Цей химерний геном був уведений в *E. coli*. Оскільки в бактеріальних клітинах з'явилася нова генетична інформація, *E. coli* почала синтезувати чужорідні (вірусні) протеїни. Отже, було отримано реальну можливість виробництва дешевих препаратів протеїнів, які мають значення в медицині (інсулін, інтерферон) і сільському господарстві (корми). Наприклад, в *E. coli* можна ввести на основі рекомбінантної ДНК ген інтерферону або

інсуліну, і бактерії почнуть синтезувати ці протеїни. За фундаментальні дослідження в галузі біохімії нуклеїнових кислот, зокрема рекомбінантної ДНК, П. Бергу було присуджено в 1980 р. Нобелівську премію.

За цей період зроблено важливі відкриття у вірусології. У фокусі досліджень – три наймасовіші хвороби людини: *грип, гепатит, рак.* З'ясовано причини пандемій грипу, що регулярно повторюються. Ідентифіковано збудники гепатитів А і В. Детально вивчено онкогенні віруси птахів і гризунів, розшифровано структуру їхнього геному та ідентифіковано ген – онкоген, який відповідає за злоякісну трансформацію клітин. Отримано прямі докази інтеграції вірусних нуклеїнових кислот у хромосоми людини і тварин. За дослідження механізму взаємодії онкогенних вірусів із клітинним геномом Нобелівським лауреатом 1975 р. став американський вірусолог *Р. Дульбекко* (поряд із Г. Теміним і Д. Балтімором), а в 1989 р. – американські вірусологи *Д. Бішоп* і *Г. Вармус* за відкриття клітинного походження онкогенів ретровірусів.

За дослідження нових механізмів походження і поширення інфекційних захворювань Нобелівську премію в 1976 р. отримали американські науковці: 1) лікар *Б. Бламберг* – за відкриття в 1963 р. у крові аборигенів Австралії так званого австралійського антигену (HBs-антигену вірусу гепатиту В); 2) вірусолог та імунолог *К. Гайдушек* – за дослідження етіології повільної інфекції людини куру, що спостерігалася серед туземців Нової Гвінеї і була пов'язана з ритуальним канібалізмом.

У 1997 р. присуджено Нобелівську премію американському неврологу, біохіміку і вірусологу *С. Прузінеру* за встановлення пріонної етіології трансмісивних губчастоподібних енцефалопатій тварин і людини.

У 1982 р. значною подією у вірусології стало виділення американськими вірусологами на чолі з *Р. Галло* Т-лімфотропного вірусу людини, який спричинює Т-клітинний лейкоз. У 1983 р. *Л. Монтан'є* і *Ф. Барре-Сінуссі* (Франція) відкрили споріднений вірус імунодефіциту людини, що спричинює ВІЛ-інфекцію (СНІД). У 2008 р. за це відкриття їм присуджено Нобелівську премію. Ще одним Нобелівським лауреатом 2008 р. став німецький вірусолог *Г. цур Гаузен* за встановлення в 1983 р. ролі папіломавірусу людини у виникненні раку шийки матки. У 2020 р. Нобелівську премію отримали *Г. Алтер*, *Ч. Райс* (США) і *М. Гаутон* (Велика Британія) за відкриття в 1989 р. вірусу гепатиту С.

Отже, за короткий проміжок часу вірусологія досягла таких вершин, що зі спеціалізованого розділу мікробіології перетворилася в одну з фундаментальних біологічних наук.

1.1.2. Природа і походження вірусів

З часу відкриття вірусів зазнали значних змін уявлення про їхню природу. Д.Й. Івановський та його сучасники підкреслювали *дві основні властивості вірусів:* фільтрівність і нездатність розмножуватися на штучних живильних середовищах. Однак згодом з'ясувалося, що ці ознаки притаманні не лише вірусам. Були відкриті фільтрівні форми і стадії бактерій (наприклад, туберкульозної палички), а потім – і фільтрівні види мікроорганізмів (мікоплазми). Тому термін «фільтрівний» було відкинуто. Абсолютний внутрішньоклітинний паразитизм вірусів теж виявився не унікальною їхньою особливістю. Внутрішньоклітинними паразитами є хламідії, рикетсії, деякі найпростіші (малярійний плазмодій).

Не раз виникали дискусії, що таке віруси – жива чи нежива матерія, організми чи не організми. Безперечно, вірусам притаманні *основні властивості всіх форм життя*, а саме: здатність розмножуватися, спадковість, мінливість, здатність пристосовуватися до умов навколишнього середовища, займати певні екологічні ніші в біосфері; і, нарешті, на віруси поширюються закони еволюції органічного світу на Землі. Тому в середині 1940-х рр. видатний австралійський вірусолог та імунолог, лауреат Нобелівської премії *Ф. Бернет* сформулював концепцію, згідно з якою віруси є повноцінними організмами. Його монографія так і називалася – «Вірус як організм» (1946 р.).

Спеціалісти з таксономії без особливих суперечок виділили віруси в окреме *царство Vira*. Проте наступне дослідження вірусів, могутній стимул якому дало впровадження техніки культури клітин (1950-ті рр.) і методів молекулярної біології (1960-ті рр.), призвело до накопичення багатьох фактів, які не вкладалися в рамки концепції, що віруси є організмами.

Вивчення будови вірусів показало, що для них характерна максимально проста організація. Віруси – це неклітинні форми життя. Неактивною формою існування будь-якого вірусу є ***віріон***, який складається з молекули *нуклеїнової кислоти* (ДНК або РНК) і протеїнової оболонки – *капсиду*. Віріони багатьох вірусів мають зовнішню ліпопротеїнову оболонку – *суперкапсид*.

Термін «віріон» запропонував у 1962 р. французький мікробіолог і генетик, лауреат Нобелівської премії *А. Львов* замість «вірусна частка», як раніше називали позаклітинний вірусний індивід. Після введення терміну «віріон» головною ознакою вірусів стали вважати наявність лише однієї нуклеїнової кислоти – ДНК або РНК, тоді як у всіх організмів, навіть

найпримітивніших, є ДНК і три види РНК: інформаційна, рибосомальна і транспортна. Однак досить швидко цей критерій для визначення природи вірусів утратив свою актуальність, коли було детально досліджено взаємодію вірусів із чутливими клітинами.

На відміну від інших організмів, генетичний апарат яких представлений дволанцюговою ДНК, носієм генетичної інформації у вірусів можуть бути як ДНК, так і РНК. Відповідно віруси поділяються на *ДНК-геномні* та *РНК-геномні*, причому близько 80 % вірусів людини і тварин містять РНК. Нуклеїнові кислоти вірусів надзвичайно *різноманітні*: одно- і дволанцюгові, лінійні й кільцеві, фрагментовані та навіть роз'єднані. Разом з тим, генетичний код є універсальним – однаковим для вірусів, бактерій, архей, грибів, найпростіших, рослин, тварин і людини.

Кардинальною відмінністю вірусів від інших організмів, навіть найпримітивніших, є *відсутність у них власних протеїносинтезувальних систем*. Синтез вірусних протеїнів здійснюється на клітинних рибосомах. Тому віруси можуть репродукуватися лише в живих клітинах.

Після проникнення віріона в чутливу клітину розпадаються його оболонки, звільняється вірусна нуклеїнова кислота; генетичний апарат клітини блокується, а всі інші органели функціонують. Далі на основі записаної на молекулі вірусної ДНК або РНК генетичної інформації клітина зі своїх сировинних матеріалів і своїми системами синтезує вірусні компоненти: нові молекули вірусної нуклеїнової кислоти і вірусних протеїнів. Будь-яка *вірусна інфекція є боротьбою двох геномів – вірусного і клітинного* – за програмування синтезу протеїнів на клітинних рибосомах і за використання енергетичних ресурсів мітохондрій. Віруси вводять у клітину лише свою генетичну інформацію, що успішно конкурує з клітинною ДНК, незважаючи на надзвичайно малі розміри вірусних геномів (на 5–6 порядків менші за молекулярною масою від геному клітини). Тому і рівень внутрішньоклітинного паразитизму у вірусів цілком інакший, ніж в інших внутрішньоклітинних паразитів (рикетсій, хламідій чи найпростіших): ***віруси є облігатними (абсолютними) внутрішньоклітинними паразитами на генетичному рівні.***

Коли в зараженій клітині накопичиться велика кількість молекул вірусної нуклеїнової кислоти і вірусних протеїнів, вони під дією міжмолекулярних сил об'єднуються, формуючи віріони потомства, які покидають клітину. Отже, спосіб розмноження вірусів докорінно відрізняється від розмноження клітинних організмів (наприклад, бінарний поділ, брунькування чи утворення спор). Віруси не ростуть, не діляться, їхнє розмноження

називається *диз'юнктивною (роз'єднаною) репродукцією*. Це означає, що окремі компоненти вірусу синтезуються відносно незалежно один від одного, в різних місцях клітини і в різний час, а потім об'єднуються, формуючи зрілі віріони.

Чи є вірус організмом (індивідом)? Обґрунтовуючи концепцію «вірус як організм», спеціалісти поступово дійшли висновку, що загалом це закономірно, оскільки в повноцінному віріоні міститься вся генетична інформація, необхідна для відтворення вірусного потомства. Якщо віріон проникає в чутливу клітину, відбувається розпад його оболонок, і в зараженій клітині починає функціонувати вірусний геном. Саме він являє собою внутрішньоклітинну форму вірусу як індивіда.

Проте існують *три групи вірусів*, для яких поняття «індивід» не підходить: 1) із фрагментованим геномом; 2) із роз'єднаним геномом; 3) віруси, що зумовлюють інтеграційну інфекцію.

До ***вірусів із фрагментованим геномом*** належать *ортоміксо-, арена-, ханта-, найро-, перібун'я-, фенуї, рео-, бірна-* і *пікобірнавіруси*. Їхній геном складається з кількох фрагментів, які знаходяться в одному віріоні. Безперечно, такий віріон є індивідом. Однак якщо в клітину проникли багато віріонів, то розвиток інфекції забезпечує повний комплект фрагментів, незалежно від того, звідки він узятий: з одного чи кількох віріонів. Більше того, серед популяції вірусів із фрагментованим геномом трапляються дефектні віріони, які мають неповні комплекти фрагментів геному. Вони не здатні самостійно репродукуватися. Проте якщо суміш кількох дефектних віріонів, що проникли в клітину, містить сумарно повний генетичний набір, інфекція буде забезпечена.

Ще менше підходить поняття «індивід» до ***вірусів із роз'єднаним геномом***, що характерно для вірусів рослин. Геном у них не лише фрагментований, але й роз'єднаний: знаходиться в різних вірусних частках. Тому популяція такого вірусу являє собою суміш 3–4 типів часток (їх не можна назвати віріонами, тобто вірусними особами, індивідами), причому тільки повний їхній набір здатний забезпечити інфекцію.

Поняття «індивід» абсолютно втрачає доречність стосовно ***вірусів, які зумовлюють інтеграційну інфекцію*** внаслідок фізичного об'єднання геномів вірусу і клітини. Здатність до інтеграції з клітинним геномом виявлена як у ДНК-, так і РНК-вмісних вірусів.

У ДНК-геномних вірусів *(адено-, папілома-, поліома-, герпес-* і *гепаднавіруси, помірні бактеріофаги)* спостерігається два типи взаємодії з клітинами. В одних випадках розвивається звичайна інфекція, в процесі якої вірус

проходить повний цикл репродукції з утворенням дочірнього потомства, що закінчується загибеллю клітин. В інших випадках вірусна ДНК об'єднується з клітинною, реплікується і функціонує як складова частина клітинного геному. Інтегрувати може як повний вірусний геном, так і його фрагмент. Вірусні нуклеотидні послідовності в складі клітинного геному називаються *провірусом,* або *ДНК-провірусом*. Отже, вірус «зникає», перетворюється в групу клітинних генів і передається дочірнім клітинам за законом Менделя. Однак оскільки в заражених клітинах з'явилася додаткова генетична інформація, вони набувають нових властивостей. У бактеріальних клітинах можуть виникнути нові ензими або токсини, яких не було до інтеграції фагової ДНК. Наприклад, здатність виробляти токсини збудниками дифтерії, правця і ботулізму зумовлена генами помірних бактеріофагів, які інтегрують свій геном у бактеріальну хромосому. Клітини тваринного організму неопластично трансформуються і набувають здатності до необмеженого поділу внаслідок порушення регуляторних механізмів. Так виникають пухлини. Під впливом різних факторів (обробка клітин УФ-променями, гормонами тощо) вірусна ДНК може «вирізатися» з хромосоми клітини і почати автономне існування, пройшовши звичайний цикл репродукції з утворенням дочірнього потомства.

Для РНК-геномних ретровірусів *(віруси лейкозів і сарком тварин, Т-лімфотропні віруси приматів)* інтеграція їхнього геному з клітинним є обов'язковою стадією репродукції. У складі ретровірусів міститься унікальний ензим – зворотна транскриптаза (ревертаза). Цей ензим здійснює передавання генетичної інформації з вірусної одноланцюгової РНК на дволанцюгову ДНК, яка вбудовується в клітинний геном. Здатність вірусів до інтеграції з клітинним геномом є крайнім ступенем їхнього генетичного паразитизму.

Серед вірусних популяцій виявлено *дефектні види вірусів*, які не можуть самостійно репродукуватися. Типовими їхніми представниками є ***віруси-сателіти***, що розмножуються лише в присутності вірусів-помічників. Наприклад, класичний сателіт – *вірус гепатиту дельта.* Він містить кільцеву одноланцюгову РНК, яка асоційована з двома протеїнами та оточена оболонкою, що складається з поверхневого антигену вірусу гепатиту В. Зрозуміло, що репродукція вірусу гепатиту дельта повністю залежить від наявності вірусу гепатиту В. Асоціацію цих обох збудників виявляють за найтяжчих уражень печінки (хронічний активний гепатит і цироз печінки).

Наведені дані свідчать про обмеженість, а точніше, про неправомірність застосовування поняття «індивід» щодо вірусів і про неможливість

поставити знак «дорівнює» між змістом понять «віріон» та «індивід» у тварин, рослин та інших клітинних організмів.

Окрім класичних вірусів, які представлені віріонами, існують *вірусоподібні структури:* плазміди, віроїди і пріони.

Плазміди *(син.: епісоми, епівіруси)* паразитують у цитоплазмі бактерій. На відміну від вірусів, вони не мають протеїнової оболонки, а складаються лише з молекули кільцевої дволанцюгової ДНК, розміри якої становлять 1–3% від розміру геному бактерії. Кількість плазмід в одній бактеріальній клітині коливається від однієї до кількох десятків і навіть сотень. Гени плазмід кодують протеїни, які не є їхнім структурним компонентом, а виконують різні функції, як правило, корисні для бактеріальної клітини. Так, R-плазміди кодують синтез ензимів, які руйнують антибіотики, що зумовлює стійкість бактерій до лікарських препаратів. Плазміди реплікуються автономно незалежно від бактеріальної хромосоми, регулюючи власну реплікацію. Вони можуть інтегруватися з клітинним геномом і реплікуватися синхронно з хромосомою. Плазміди зумовлюють нестабільність генетичних ознак у бактерій. Їх виявлено також у дріжджів і плісеневих грибів.

Ще більш своєрідними вірусоподібними структурами є ***віроїди*** – збудники інфекційних хвороб рослин (хризантем, цитрусових, огірків, томатів, картоплі). Як і плазміди, віроїди не мають протеїнової оболонки, складаються лише з молекули кільцевої одноланцюгової РНК, яка не кодує жодних протеїнів. Реплікація віроїдів відбувається за участю ензимів рослинної клітини.

І, нарешті, зовсім незвичайними є ***пріони*** – збудники трансмісивних губчастоподібних енцефалопатій (ТГЕ) тварин і людини, що характеризуються прогресуючим руйнуванням нервових клітин, унаслідок чого головний мозок набуває губчастої структури. Пріони складаються лише з протеїнів, не мають нуклеїнової кислоти. Звідси походить їхня назва, аналогічна віріону класичних вірусів: від англ. protein infectious particle – протеїнова інфекційна частка. Термін «пріон» запропонував у 1982 р. американський невролог, біохімік і вірусолог *С. Прузінер*, лауреат Нобелівської премії 1997 р. за аргументовані докази пріонної концепції збудників ТГЕ.

Згідно з цією гіпотезою, ген пріона знаходиться в ДНК клітин здорових тварин і людини та продукує нормальний пріонний протеїн – абсолютно ідентичний патогенному пріону, з тим самим набором амінокислот, тільки з іншою конфігурацією спіралі. Після проникнення в організм інфекційний пріон не розпізнається імунною системою, досягає нейронів, вступає у взаємодію з нормальним пріонним протеїном, який змінює

конфігурацію спіралі й перетворюється в патогенний. Таким чином відбувається ланцюгова реакція, нейрони вакуолізуються і руйнуються, мозкова тканина набуває вигляду губки.

Підводячи підсумки дискусії, чи є вірус організмом, можна зробити такий *висновок про природу вірусів*. Відсутність власних систем синтезу протеїнів, диз'юнктивний спосіб розмноження, інтеграція з клітинним геномом, існування дефектних вірусів (з неповним геномом і вірусів-сателітів), а також вірусоподібних структур (плазмід, віроїдів і пріонів) – усе це мало вкладається в уявлення про віруси як організми.

Так що ж таке віруси? Це є ***автономні генетичні структури, що здатні функціонувати і репродукуватися лише в чутливих до них клітинах тварин, рослин, грибів, найпростіших, бактерій та архей.*** Не будучи організмами, віруси водночас є своєрідною формою життя, зберігають основні ознаки живої матерії, в тому числі таку кардинальну, як здатність до еволюції.

Питання про походження вірусів дотепер є дискусійним. Існує *три основні гіпотези* щодо походження вірусів.

Згідно з першою гіпотезою (автори: російські вірусологи А.О. Смородінцев, В.М. Жданов, 1953), *віруси є потомками древніх доклітинних форм життя – протобіонтів*, які збереглися до наших днів як примітивні організми і навіть прогресували внаслідок переходу до паразитичного існування. Протобіонти дали початок, з одного боку, клітинам, а з другого – вірусам, які з часом поселилися в клітинах і пристосувалися до існування в них. Очевидно, РНК-геномні віруси є найдревнішими, а ДНК-геномні – утворилися пізніше. Більшість вірусів рослин містять РНК, а рослини, як відомо, з'явилися на Землі раніше, ніж тварини. У подальшому віруси еволюціонували разом зі своїми хазяями або змінювали їх. Цим і пояснюється різноманітність відомих сьогодні вірусів, а також їхня пристосованість до паразитування в організмах певних видів.

Згідно з другою гіпотезою (автор: австралійський вірусолог та імунолог Ф. Бернет, 1943), *віруси є потомками бактерій*, які зазнали регресивної еволюції: бактерія → фільтрівна форма бактерії → фільтрівний вірус. Розмножуючись у клітинах хазяїна і дістаючи готове живильне середовище, бактерії спрощували свою організацію та втрачали як непотрібні окремі ензимні системи і здатність до самостійного метаболізму. Рикетсії та хламідії, будучи внутрішньоклітинними паразитами, становлять перехідну ланку між бактеріями і вірусами.

Згідно з третьою гіпотезою (автори: американські вірусологи С. Лурія і Дж. Дарнелл, 1967), *віруси походять від компонентів клітини*, зокрема

генів або клітинних органел, що набули відносної автономності та стали внутрішньоклітинними паразитами. Ця гіпотеза, яку назвали гіпотезою «блукаючих, або оскаженілих, генів», має найбільше прихильників. Різні віруси могли утворитися від нуклеїнових кислот, епісом, хлоропластів, мітохондрій. Однак вони виникали й еволюціонували разом із клітинними формами життя. Будучи, з одного боку, автономними генетичними структурами, а з другого – нездатними розмножуватися поза клітинами, віруси впродовж біологічної еволюції пройшли настільки різноманітними шляхами свого розвитку, що існуючі в наш час різні таксономічні групи вірусів поліфілогенетичного походження, тобто не мають єдиного спільного предка. Проте універсальність генетичного коду поширюється і на віруси. Це свідчить, що віруси є породженням органічного світу на Землі.

Розуміння природи вірусів як автономних генетичних структур зближує гіпотези їхнього походження і дає можливість зробити два важливі *висновки. По-перше,* вірусам належить істотна роль чинників еволюції органічного світу. Долаючи видові бар'єри, віруси можуть переносити окремі гени або групи генів та інтегруватися з геномом клітини. *По-друге,* є всі підстави визнати не лише продовження еволюції вже існуючих таксономічних груп вірусів, але й припустити можливість виникнення в наш час або принаймні в недалекому історичному минулому нових вірусів. Це мимоволі спадає на думку при дослідженні таких вірусних інфекцій, як грип, ВІЛ-інфекція, геморагічна гарячка Ебола, SARS, MERS, COVID-19, а також трансмісивних губчастоподібних енцефалопатій.

1.1.3. Роль вірусів у інфекційній патології людини і тварин та завдання сучасної вірусології

Постійне вдосконалення діагностичної техніки і методів вірусологічних досліджень відкрило надзвичайну різноманітність вірусів, що спричинюють гострі, хронічні, латентні й повільні інфекції людини і тварин.

На нинішній день відомо понад 300 вірусів, патогенних для людини, які об'єднані в 30 родин і 51 рід та можуть спричинити різні епідемічні процеси: від спорадичних захворювань та епідемічних спалахів до епідемій і пандемій.

У загальній структурі інфекційних захворювань людини 60–70 % припадає на *грип* і *гострі респіраторні вірусні інфекції*, у виникненні яких беруть участь різні збудники: респіровіруси 1 і 3, орторубулавіруси 2 і 4, ортопневмовірус, рео-, рино-, ентеро-, корона- і мастаденовіруси тощо. Друге місце серед збудників масових інфекцій людини посідають *кишкові віруси*, які

спричинюють гастроентерити і гастроентероколіти: насамперед ротавіруси, а також мастадено-, корона-, каліці- та мамастровіруси. До масових інфекцій належать також кір, герпетична інфекція, вірусні гепатити А, В, С і Е, енцефаліти і гарячки арбовірусної етіології.

Виняткова гострою є проблема емерджентних і реемерджентних вірусних інфекцій, які можуть створити надзвичайні епідемічні ситуації локального або міжнаціонального (глобального) характеру. До цих інфекцій належать, зокрема, ВІЛ-інфекція, пандемічний грип А, геморагічні гарячки Ебола і з нирковим синдромом, енцефаліти Хендра і Ніпах, гарячка Західного Нілу, тяжкі гострі респіраторні синдроми SARS і MERS і, нарешті, COVID-19. Пандемія COVID-19, оголошена ВООЗ 11 березня 2020 р., за 10 місяців охопила 213 країн світу. Станом на 11 жовтня 2020 р. у світі заразилися 37,2 млн. людей і померли 1,07 млн.

За ступенем небезпеки всі віруси, патогенні для людини, поділяються на *чотири групи*.

І група – збудники особливо небезпечних вірусних інфекцій (14 видів): еболавіруси (5 видів), марбургвірус Марбург (родина *Filoviridae*); маммаренавіруси Ласса, Мачупо, Гуанаріто, аргентинський, бразилійський (родина *Arenaviridae*); вірус натуральної віспи, вірус віспи мавп (родина *Poxviridae*); альфагерпесвірус макак 1 (родина *Herpesviridae*).

ІІ група – понад 70 видів, в основному збудники висококонтагіозних епідемічних вірусних хвороб, зокрема: арбовіруси з родин *Togaviridae*, *Flaviviridae, Peribunyaviridae, Hantaviridae, Nairoviridae, Phenuiviridae, Reoviridae* і *Rhabdoviridae*; маммаренавірус лімфоцитарного хоріоменінгіту (родина *Arenaviridae*); ліссавірус сказу (родина *Rhabdoviridae*); вірус гепатиту В (родина *Hepadnaviridae*); гепацівірус С (збудник гепатиту С) (родина *Flaviviridae*); вірус гепатиту дельта (рід *Deltavirus*); ортогепевірус А (збудник гепатиту Е) (родина *Hepeviridae*); віруси імунодефіциту людини 1 і 2, Т-лімфотропні віруси приматів 1, 2, 3 (родина *Retroviridae*); вірус ящуру (родина *Picornaviridae*); коронавірус тяжкого гострого респіраторного синдрому, коронавірус гострого респіраторного синдрому Близького Сходу, коронавірус тяжкого гострого респіраторного синдрому 2 (родина *Coronaviridae*); *пріони* (збудники трансмісивних губчастоподібних енцефалопатій).

ІІІ група – 11 видів: віруси грипу А, В, С (родина *Orthomyxoviridae*); ентеровірус С (збудник поліомієліту), гепатовірус А (збудник гепатиту А) (родина *Picornaviridae*); альфагерпесвіруси людини 1, 2, 3, 4, 5, 6 (родина *Herpesviridae*).

ІV група – 42 види – збудники вірусних септицемій, менінгітів, пневмоній, ентеритів, зокрема: мастаденовіруси людини А, В, С, D, E, F, G

(родина *Adenoviridae*); ортореовірус ссавців, ротавіруси А, В, С (родина *Reoviridae*); коронавіруси людини 229E, NL63 (родина *Coronaviridae*); вірус Норволк (родина *Caliciviridae*); ентеровіруси А, В, D, риновіруси А, В, С, кардіовірус А (родина *Picornaviridae*); респіровіруси людини 1, 3, орторубулавіруси людини 2, 4, орторубулавірус епідемічного паротиту, морбіллівірус кору, ортоавулавірус птахів 1 (збудник ньюкаслської хвороби) (родина *Paramyxoviridae*); ортопневмовірус людини (родина *Pneumoviridae*); вірус краснухи (родина *Matonaviridae*); везикуловіруси Індіана, Алагоас, Кокал, Нью-Джерсі (родина *Rhabdoviridae*); віруси віспи корів, псевдовіспи корів, орф, ектромелії, контагіозного молюска, пухлин мавп Яба, віспи Тана (родина *Poxviridae*).

Роботу з вірусами І і ІІ груп можна проводити лише в спеціалізованих вірусологічних лабораторіях, які мають дозвіл спеціальної режимної комісії з питань біобезпеки і біозахисту. У вірусологічних лабораторіях дозволяється робота з вірусами тільки ІІІ і ІV груп.

Щодо вірусних захворювань тварин, згідно з інформацією МЕБ, перелік інфекцій, обов'язкових для декларування у ВООЗ в 2017 р., включає 61 вірусну хворобу різних видів тварин (у тому числі риб, молюсків, ракоподібних і земноводних). До *особливо небезпечних (карантинних) вірусних хвороб тварин* належать 11 нозологічних одиниць: ящур, везикулярний стоматит, везикулярна хвороба свиней, чума ВРХ, чума дрібних жуйних, блутанг, віспа овець і кіз, класична чума свиней, африканська чума свиней, чума (високопатогенний грип) птиці, ньюкаслська хвороба.

У ветеринарній практиці в господарствах промислового типу поширені й завдають значних економічних збитків масові *респіраторно-кишкові інфекції телят,* що виникають на тлі стресових факторів та неоднорідного імунологічного статусу. Захворюваність за пневмоентеритів телят становить 55–94 %, смертність – 15–20 %. За діарей новонароджених телят захворюваність досягає 95–100 %, а відхід – 30–40 % і більше. Етіологія цих захворювань комплексна. У виникненні їх беруть участь різні віруси (респіровірус ВРХ 3, ортопневмовірус ВРХ, альфагерпесвірус ВРХ 1, пестівіруси А і В, мастаденовіруси ВРХ А, В і С, атаденовірус ВРХ D, ротавіруси А, В і С, бетакоронавірус 1 та ін.), які спричинюють здебільшого асоційовані інфекції з нашаруванням бактеріальної мікрофлори, що ускладнює діагностику і профілактику.

Значний інтерес становлять дослідження *тератогенних властивостей* вірусів. Вони є однією з причин внутрішньоутробної патології людини. У медичній практиці особливо небезпечним є вірус краснухи, який

спричинює аборти, мертвонародженість, вроджені дефекти (класичний синдром – катаракта, глухота, пороки серця; крім того, ураження ЦНС). Внутрішньоутробну патологію плоду в людини можуть спричинити альфагерпесвіруси людини 1, 2, 3, 5, маммаренавірус лімфоцитарного хоріоменінгіту, ентеровіруси людини A, B, мастаденовіруси людини B, D.

Тератогенна дія вірусів спостерігається також в інфекційній патології тварин. Так, пестівірус С (збудник класичної чуми свиней) та альфагерпесвірус свиней 1 (збудник хвороби Ауєскі) спричинюють аборти, муміфікацію плоду, мертвонародження, а пестівіруси А і В (збудники вірусної діареї ВРХ), окрім зазначених аномалій, – гіпоплазію мозочка в новонароджених телят, гідроцефалію, деформацію скелетних м'язів. Аборти можуть спричинювати вірус ящуру, альфагерпесвірус ВРХ 1, альфагерпесвірус коней 1. Коронавірус птахів є причиною патологічної форми яєць.

Велику увагу науковці приділяють дослідженню *екології вірусів*, на яку істотно впливають антропогенні фактори (зокрема, забруднення довкілля промисловими відходами). Спільність збудників вірусних інфекцій тварин і людини особливо яскраво проявляється серед екологічної групи *арбовірусів*, що передаються через укуси кровосисних членистоногих. Понад 100 арбовірусів є патогенними для людини (наприклад, віруси жовтої гарячки, кліщового енцефаліту, японського енцефаліту, геморагічної гарячки Крим – Конго, венесуельського, східного і західного енцефаломієлітів коней). Винятково важливе значення в резервації арбовірусів у природних вогнищах і транспортуванні їх на величезні віддалі належать мігрувальним птахам. Від птахів та їхніх ектопаразитів виділено понад 100 арбовірусів.

Птахи відіграють важливу роль у циркуляції *вірусу грипу А*, будучи основним його резервуаром у природі. Відомо близько 50 антигенних варіантів вірусу грипу А, якому властива унікальна мінливість поверхневих антигенів H і N. Завдяки антигенному дрейфу кожні 2–3 роки виникають нові епідемічні штами. Пандемічні штами вірусу грипу А з'являються за рахунок обміну генами між штамами вірусу, що уражають ссавців і птахів (антигенний шифт). У зв'язку з міжвидовою міграцією вірусу грипу А в популяції свійських і диких тварин проблема грипу перетворилася із суто медичної на медико-ветеринарну.

Особлива увага вчених спрямована на дослідження *імунопатології вірусних інфекцій*. Зокрема, за багатьох захворювань має місце імунологічна недостатність (імунодефіцит), що пов'язано зі здатністю вірусів розмножуватися в імунокомпетентних клітинах і спричинювати пошкодження

лімфоїдної тканини. Сильна імунодепресивна дія характерна для збудників хвороби Марека, інфекційної бурсальної хвороби, інфекційної анемії курчат, вірусної діареї ВРХ.

Серед захворювань людини класичним прикладом різко вираженої імунологічної недостатності організму є ВІЛ-інфекція/СНІД, що вперше зареєстровано в 1981 р. у США. За даними ВООЗ, з початку епідемії у світі заразилося 74,9 млн. людей і померли 36,2 млн. Наприкінці 2018 р. у світі налічувалося з ВІЛ-інфекцією 37,9 млн. людей (у тому числі 1,7 млн. дітей віком до 15 років), з них 79 % знали про свій статус. Станом на червень 2019 р. лікування в рамках антиретровірусної терапії приймали 24,5 млн. людей. Упродовж року в 3–5 % ВІЛ-інфікованих пацієнтів розвивається власне СНІД із неминучим летальним наслідком.

Важливою проблемою сучасної епідеміології й епізоотології є *вірусна персистенція*, що характеризується тривалим перебуванням збудника в організмі та проявляється в різних формах – латентній, хронічній і повільній інфекціях. Механізми вірусної персистенції різноманітні: від інтеграції вірусного геному з клітинною ДНК (у ретровірусів) до імунопатологічних реакцій організму (наприклад, за інфекційної анемії коней, африканської чуми свиней, алеутської хвороби норок). Персистенцію вірусів можна трактувати як одну з можливостей уникнути дії захисних факторів організму з метою збереження їх як біологічних видів.

Одним із найбільш яскравих прикладів вірусної персистенції є *повільні інфекції*, що характеризуються тривалим інкубаційним періодом (іноді десятки років), подальшим поступовим прогресуючим розвитком симптомів захворювання і неминуче летальним наслідком. Повільну інфекцію – підгострий склерозивний паненцефаліт – може спричинити морбіллівірус кору через 1,5–18 років після захворювання, проникнувши через гематоенцефалічний бар'єр. Вірус краснухи здатний індукувати прогресуючий паненцефаліт як пізнє ускладнення вродженої інфекції за внутрішньоутробного зараження плоду. Сказ може протікати у вигляді повільної інфекції з інкубаційним періодом від 8 міс до 3 і більше років. До повільних вірусних інфекцій належать ВІЛ-інфекція, імунодефіцит мавп і котів, вісна/меді.

Серйозну увагу фахівців привертає група повільних інфекцій тварин і людини пріонної етіології – *трансмісивні губчастоподібні енцефалопатії*, що характеризуються дистрофічним ураженням ЦНС із відповідним симптомокомплексом і неминуче летальним наслідком. Пріони здатні долати видовий бар'єр, що змушує звертати особливу увагу на фактори ризику зараження людей при контакті з хворими тваринами, через

продукти харчування або фармацевтичні й косметичні препарати, виготовлені з тваринницької сировини. Особливу небезпеку становить губчастоподібна енцефалопатія ВРХ, яка має безпосередній зв'язок із виникненням хвороби Крейтцфельдта – Якоба в людей.

В останні десятиліття досягнуто серйозних успіхів у з'ясуванні *вірусної етіології пухлин* і досліджені механізмів вірусного канцерогенезу. Встановлено, що багато вірусів, як ДНК-, так і РНК-геномних, можуть індукувати онкогенну трансформацію клітин у ссавців і птахів. У природних умовах доброякісні пухлини спричинюють, наприклад, збудники міксоматозу і фіброми кролів, а злоякісні – збудники папіломатозу ВРХ і кролів, лейкозу ВРХ, хвороби Марека, саркоми Рауса і лейкозу птахів. Доведено участь папіломавірусів людини у виникненні раку сечостатевих органів, шкіри і гортані. Папіломавірусну ДНК виявляють у 70 % випадків раку шийки матки і в 25 % випадків раку зовнішніх статевих органів у жінок. Встановлено зв'язок між альфагерпесвірусом людини 2 з розвитком раку шийки матки в жінок. Альфагерпесвірус людини 4 спричинює такі злоякісні захворювання людини, як лімфома Беркітта, карцинома носоглотки та імунобластоїдна лімфома кісткового мозку. Вірус гепатиту В є основним етіологічним фактором у виникненні гепатоцелюлярної карциноми людини. Встановлено, що серед носіїв вірусу гепатиту В гепатома трапляється в 223 рази частіше. Онкогенні властивості має також вірус гепатиту С.

У зв'язку з повсюдним поширенням вірусів і надзвичайно широким спектром спричинюваних ними захворювань важливим завданням вірусології є розробка нових і вдосконалення існуючих методів лабораторної діагностики та засобів імунопрофілактики вірусних інфекцій людини і тварин.

Лабораторна діагностика вірусних хвороб людини і тварин зробила за останні десятиліття великий крок уперед. На зміну загальноприйнятим серологічним реакціям (РН, РЗГА, РНГА, РЗК, РДП) впроваджено високочутливі й експресні методи імуноензимного, імунохроматографічного та радіоімунного аналізу, молекулярно-генетичні методи.

Заміна в традиційних діагностикумах поліклональних антитіл на моноклональні є прогресом на шляху створення діагностичних препаратів нового покоління. Моноклональні антитіла широко застосовують не лише для вдосконалення методів лабораторної діагностики, але й у технології виготовлення вакцин, для вивчення антигенної структури вірусів, патогенезу та імуногенезу за вірусних інфекцій. За розробку методу отримання моноклональних антитіл *Дж. Келеру* (Німеччина) і *Ц. Мільштейну* (Велика Британія) присуджено в 1984 р. Нобелівську премію.

Останнім часом значна увага приділяється розробці діагностикумів на основі *імунохроматографічного аналізу* (ІХА). Вони не вимагають спеціального обладнання, можуть використовуватися безпосередньо в умовах господарства чи виробництва і реалізації харчових продуктів, кормів для тварин та ін. ІХА широко застосовують у багатьох країнах світу для експрес-діагностики COVID-19.

Для експрес-діагностики вірусних інфекцій інтенсивно розробляються метод *ДНК-зондів* і *полімеразна ланцюгова реакція* (ПЛР), які ґрунтуються на індикації вірусних геномів безпосередньо в досліджуваному матеріалі. Важливою перевагою цих методів є можливість виявити вірусні нуклеїнові кислоти в тих пробах, в яких вірус уже втратив інфекційні та антигенні властивості. Методи незамінні для індикації вірусів, що не культивуються в лабораторних умовах, а також персистувальних вірусів і провірусів (інтегрованих у клітинний геном вірусних ДНК). ПЛР особливо цінна при дослідженні зразків харчових продуктів та проб із об'єктів довкілля, які сильно контаміновані різноманітними мікроорганізмами. *Мюлліс К.* (США), який розробив ПЛР, був удостоєний у 1993 р. Нобелівської премії.

У лабораторній діагностиці вірусних інфекцій людини і тварин перспективним є *рестрикційний аналіз* у поєднанні з *методом секвенування*. Вони дають змогу скласти фізичні карти вірусних геномів із точністю до одного нуклеотиду, що гарантує точну типізацію близькоспоріднених вірусів. Рестрикційний аналіз має велику цінність для стандартизації та контролю біопрепаратів.

За останні десятиліття відбувся значний прогрес в імунопрофілактиці вірусних інфекцій. Окрім традиційних живих та інактивованих цільновіріонних вакцин, створено *субодиничні вакцини*, що складаються лише з протективних вірусних антигенів. Широкі перспективи для розробки і промислового виробництва вірусних вакцин відкриває генна інженерія. На основі технології рекомбінантної ДНК розроблено різні типи *генноінженерних вакцин:* реасортантні, рекомбінантні (субодиничні, векторні), ДНК-вакцини і рослинні (з трансгенних рослин).

Технологія рекомбінантної ДНК відкриває широкі можливості для конструювання *асоційованих* і *змішаних вакцин*. Отримано рекомбінант вірусу віспавакцини, який містить гени протективних протеїнів вірусів гепатиту В, грипу А та альфагерпесвірусів людини 1 і 2. У плазмідну ДНК можна вбудувати гени протективних протеїнів кількох вірусів і гени цитокінів, що регулюють імунну відповідь. На думку фахівців, технологія рекомбінантної

ДНК дасть можливість сконструювати змішані вакцини проти 12 і більше хвороб, у тому числі вірусних, бактеріальних і паразитарних.

Окрім розробки нових методів лабораторної діагностики та засобів імунопрофілактики, важливими напрямками в розвитку вірусології є дослідження: 1) персистенції вірусів; 2) вірусіндукованої трансформації клітин, тератогенної та мутагенної дії вірусів; 3) нозогеографії та екології вірусів; 4) емерджентних та реемерджентних інфекцій (надзвичайних епізоотичних ситуацій за участю вірусів).

Вагомий внесок у становлення і розвиток ветеринарної вірусології зробив видатний російський вірусолог В.М. Сюрін. Важливий вклад у розвиток ветеринарної вірусології зробили українські вчені: М.В. Рево, І.Й. Кулеско, В.В. Нікольський, А.І. Собко, В.П. Онуфрієв, І.І. Панікар, П.П. Фукс, В.П. Романенко та багато інших.

Нині ветеринарна вірусологія в Україні інтенсивно розвивається. Технічний прогрес забезпечив можливість досліджень вірусів на молекулярному і субмолекулярному рівнях, що в поєднанні з класичними методами дає змогу конструювати і впроваджувати у практику ветеринарної медицини ефективні засоби діагностики та імунопрофілактики вірусних інфекцій тварин та мінімізувати небезпеку вірусів – збудників зооантропонозів для людини.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Розкажіть про історію відкриття вірусів. **2.** Охарактеризуйте основні періоди розвитку вірусології та становлення її як фундаментальної біологічної науки. **3.** Що таке віруси, які їхні кардинальні відмінності від клітинних форм життя? **4.** Чому віруси стали незамінною моделлю для молекулярної біології, генетики, генної інженерії, при вирішенні загальнобіологічних проблем? **5.** Чи є вірус організмом (індивідом)? **6.** Які вірусоподібні структури ви знаєте? **7.** Назвіть основні гіпотези походження вірусів. **8.** Яка роль вірусів у інфекційній патології людини і тварин? **9.** Розкажіть про досягнення і завдання вірусології в діагностиці та профілактиці вірусних інфекцій людини і тварин.

ТЕМА 1.2. СТРУКТУРНА ОРГАНІЗАЦІЯ ТА ХІМІЧНИЙ СКЛАД ВІРУСІВ

1.2.1. Фізична структура вірусів

Віруси є облігатними внутрішньоклітинними генетичними паразитами тварин, рослин, грибів, найпростіших, бактерій та архей. Вони здатні репродукуватися тільки в живих клітинах, куди вносять лише свою генетичну інформацію.

Віруси існують у *двох формах:* позаклітинній (віріон) і внутрішньоклітинній (вірусний геном).

Віріон – це неактивна форма існування вірусів. Розміри віріонів коливаються в широких межах: від 15 до 1400 нм (1 нанометр = 10^{-9} м). Найменші віруси (цирко-, парво-, пікорнавіруси) наближаються за величиною до протеїнових молекул, а найбільші (покс-, параміксо-, філовіруси) – близькі за розмірами до найдрібніших бактерій. Поксвіруси (зокрема, віруси віспи ссавців і птахів) видимі в світловому мікроскопі.

Формування віріонів підпорядковується точним математичним законам побудови просторових структур (від кристалів до архітектурних споруд), що ґрунтуються на утворенні структур із найменшим рівнем вільної енергії.

Віріон – це метаболічно інертна вірусна частка, в якій *нуклеїнова кислота*, що представляє геном (*ДНК* або *РНК*), оточена протеїновою оболонкою – *капсидом* (від лат. capsa – футляр). Капсид складається з найменших функціонально-еквівалентних *структурних одиниць*, до складу яких входить одна або кілька молекул протеїну (в останньому випадку структурна одиниця поділяється на *протеїнові субодиниці*). Група структурних одиниць утворює морфологічну одиницю – *капсомер*, яку можна виявити в електронному мікроскопі.

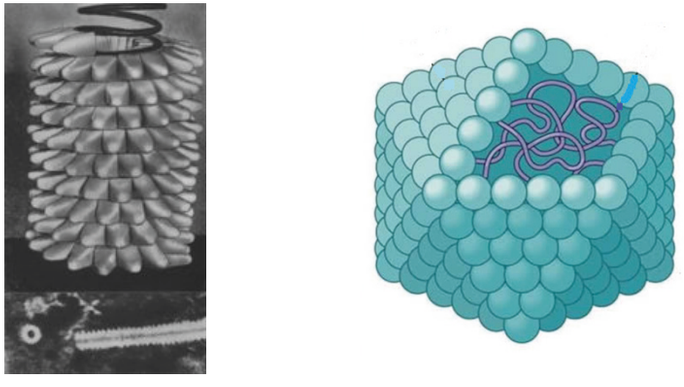
Нуклеїнова кислота разом із капсидом утворює *нуклеокапсид.* У просто організованих вірусів віріони представлені лише нуклеокапсидами. У складно організованих вірусів нуклеокапсид оточений зовнішньою ліпопротеїновою оболонкою – *суперкапсидом*, або *пеплосом* (від грец. peplos – покрив, мантія).

До складу суперкапсиду входять ліпіди і вуглеводи клітини-хазяїна, причому глікопротеїни формують на поверхні віріона морфологічні субодиниці – *пепломери*, видимі в електронному мікроскопі. Пепломери

виглядають як ості (шипи) завдовжки 7–10 нм різної форми. Так, у пневмовірусів ості мають форму пляшки, а в коронавірусів вони булавоподібні.

Деякі складно організовані віруси, крім суперкапсиду, мають ще одну проміжну оболонку – *протеїнову мембрану,* утворену М-протеїном (матриксний, або мембранний, протеїн), яка оточує нуклеокапсид і формує разом з ним *нуклеоїд*, або *серцевину*. Окремі віруси, незалежно від складності їхньої організації, містять серцевину, представлену нуклеїновою кислотою в комплексі з внутрішніми протеїнами.

Вірусні капсиди мають надзвичайно впорядковану організацію. Існує *два типи будови капсидів* віріонів, які забезпечують утворення структур із мінімумом вільної енергії: спіральний та ікосаедральний (ізометричний, кубічний) типи симетрії (рис. 1.1).



а) б)

Рис. 1.1. Структура просто організованих вірусів зі спіральним (а) та ікосаедральним (б) типами симетрії капсидів

(Дяченко С.С. та ін., 1974; http://virologia.sites.uff.br/wp-content/uploads/sites/236/2017/11/aula-1-introdução.pdf)

Спіральний тип симетрії характеризується розміщенням капсомерів у вигляді спіралі навколо молекули нуклеїнової кислоти. Протеїнові субодиниці вкладені в спіраль так, що відносно поздовжньої осі всі вони (за винятком кінцевих) знаходяться в однаковому положенні. При цьому капсомери утворюють трубку, всередині якої дуже компактно упакована нуклеїнова кислота. Її довжина значно перевищує розміри віріона. Наприклад, довжина вірусу тютюнової мозаїки становить 300 нм, а його РНК сягає 4000 нм. При цьому РНК настільки міцно зв'язана з капсидом, що

її не можна звільнити, не пошкодивши капсид. Спіральний тип симетрії забезпечує максимально регулярну взаємодію між протеїновими субодиницями капсиду і нуклеїновою кислотою.

Віріони зі спіральним нуклеокапсидом мають паличкоподібну або ниткоподібну форму. Це стосується вірусів рослин. Серед вірусів тварин спіральний тип симетрії властивий складно організованим вірусам з одноланцюговою РНК. Форма віріонів у таких вірусів сферична. Виняток становлять рабдовіруси (наприклад, ліссавірус сказу), що мають кулеподібну форму, а також філовіруси (марбург- та еболавіруси), яким властива ниткоподібна форма.

За ***ікосаедрального (ізометричного, кубічного) типу симетрії*** капсомери вкладаються у формі геометричної фігури – *ікосаедра* (20-гранника), утворюючи порожнисту ізометричну структуру, в центрі якої знаходиться нуклеїнова кислота. При цьому не існує регулярної взаємодії між нуклеїновою кислотою та кожною протеїновою субодиницею. Ікосаедр сформований 20 рівносторонніми трикутниками. Він має 12 вершин, до кожної з яких сходяться кути 5 трикутників, і 30 ребер, де з'єднуються сторони сусідніх трикутників. Такі віріони є симетричними в трьох взаємно перпендикулярних напрямках.

Серед вірусів тварин ікосаедральний тип симетрії властивий майже всім ДНК-геномним вірусам (за винятком поксвірусів) і багатьом РНК-геномним вірусам, незалежно від складності їхньої організації. Реовіруси мають два ікосаедральні капсиди. Ізометричні віріони просто організованих вірусів мають форму ікосаедра або сферичну, а складно організованих – сферичну, а також ікосаедральну (асфар- та ірідовіруси).

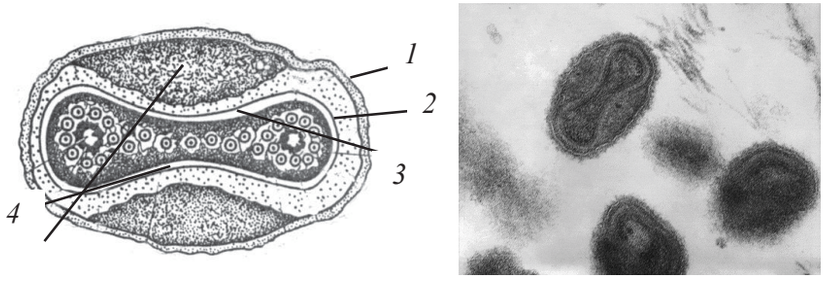
Існують віруси зі ***складним (комбінованим) типом симетрії:*** поксвіруси, ретровіруси, бактеріофаги.

Поксвіруси мають порівняно з іншими вірусами неканонічну будову (рис. 1.2). Зовнішня оболонка віріона огортає серцевину у вигляді двовгнутого диска, по боках якого знаходяться овальні структури – латеральні тільця. Серцевина містить дволанцюгову ДНК, оточену внутрішньою гладкою мембраною та зовнішнім шаром із циліндричних субодиниць.

У *ретровірусів* є два типи симетрії: суперкапсидна оболонка вкриває серцевину, яка складається з ікосаедрального капсиду і розміщеного всередині спірального нуклеопротеїнового комплексу, що містять дві молекули одноланцюгової РНК (рис. 1.3).

Два типи симетрії спостерігаються також у бактеріофагів колідизентерійної групи (Т-парних, рис. 1.4). Так, бактеріофаг Т2 складається

з головки і відростка. Головка утворена білковими молекулами, які формують ікосаедр, і містить усередині дволанцюгову ДНК. Відросток являє собою порожнистий стрижень, оточений чохлом, що здатний скорочуватися подібно до м'язів. Чохол складається з протеїнових субодиниць, розміщених за спіральним типом симетрії. Відросток закінчується шестигранною базальною пластинкою із шістьома зубцями, від яких відходять нитки – фібрили, що забезпечують адсорбцію бактеріофага на бактеріальній клітині.

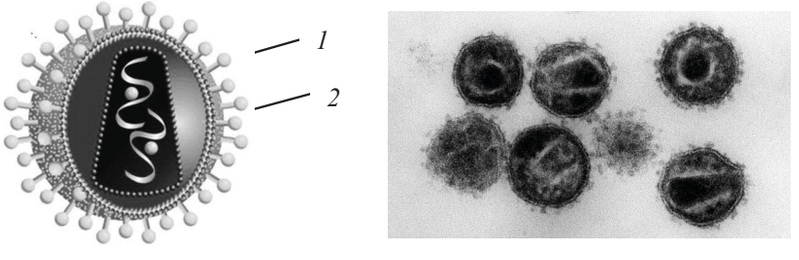


а) б)

Рис. 1.2. Структура поксвірусів:

1 – зовнішня оболонка; 2 – серцевина;
3 – дволанцюгова ДНК; 4 – латеральні тільця

(Сюрін В.М., Фоміна Н.В., 1979; https://m.polit.ru/news/2014/07/10/ps_smallpox/)

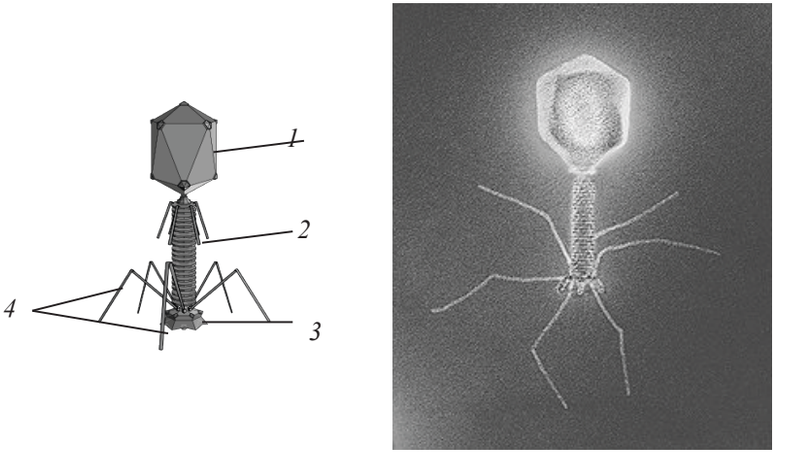


а) б)

Рис. 1.3. Структура ретровірусів:

1 – суперкапсид; 2 – ікосаедральний капсид;
3 – спіральний нуклеопротеїновий комплекс з одноланцюговими РНК

(http://realmindfulness.ru/2012/02/meditaciya-osoznannosti-i-vich-infekciya/, https://www.dw.com/en/hiv-drugs-stop-sexual-transmission-of-aids-virus-say-doctors/a-48588767)



а) б)

Рис. 1.4. Структура Т-парних бактеріофагів:

1 – головка; 2 – відросток; 3 – базальна пластинка; 4 – фібрили

(https://ru.wikipedia.org/wiki/Бактериофаги, https://www.kommersant.ru/doc/1867165)

1.2.2. Хімічний склад вірусів

Нуклеїнові кислоти

На відміну від клітинних форм життя, в складі віріонів вірусів знаходиться лише один тип нуклеїнової кислоти – ДНК або РНК. Відповідно всі віруси поділяються на ДНК-вмісні (ДНК-геномні) і РНК-вмісні (РНК-геномні). Саме існування РНК-геномних вірусів свідчить про те, що вірусна РНК, так само як і ДНК, є носієм спадкової інформації, причому більшість вірусів людини і тварин (близько 80 %) – РНК-вмісні. Вірусний геном гаплоїдний, за винятком ретровірусів, які мають диплоїдний геном, представлений двома ідентичними молекулами одноланцюгової РНК.

Молекулярна маса вірусних нуклеїнових кислот коливається в широких межах: у ДНК-вмісних вірусів від 1,5 МДа (парвовіруси) до 250 МДа (покс- та ірідовіруси); у РНК-вмісних вірусів – від 2,4 МДа (пікорнавіруси) до 20 МДа (реовіруси). Вірусні геноми становлять від 0,5–3 % (параміксовіруси) до 19–32 % (парвовіруси) маси віріона.

Вірусні нуклеїнові кислоти характеризуються надзвичайною різноманітністю форм (рис. 1.5).

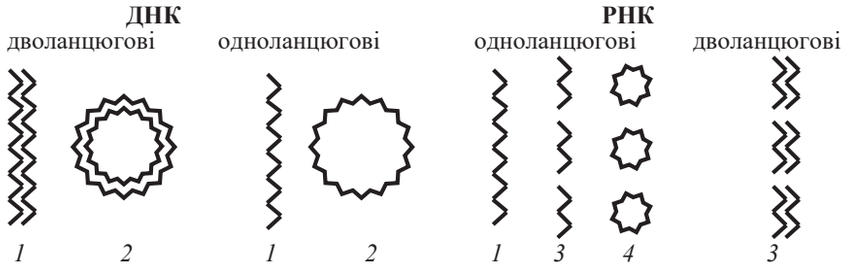


Рис. 1.5. Типи і форми вірусних нуклеїнових кислот:
1 – лінійна; 2 – кільцева; 3 – фрагментована; 4 – фрагментована кільцева

Вірусні ДНК бувають одно- і дволанцюговими, лінійними та кільцевими.

У вірусних *дволанцюгових ДНК*, на відміну від клітинної ДНК, генетична інформація закодована, як правило, на обох нитках. Це свідчить про максимальну економію генетичного матеріалу у вірусів, що є невід'ємною властивістю їх як генетичних паразитів.

Структура ДНК в основному унікальна: більшість нуклеотидних послідовностей трапляється лише один раз. Однак на кінцях молекул бувають повтори, коли в кінцевому фрагменті ДНК дублюється її початкова ділянка. У цих повторах закладена потенційна здатність до утворення *кільцевої форми,* що має важливе значення для вірусів. Кільцева форма забезпечує стійкість нуклеїнової кислоти до нуклеаз-ензимів, які послідовно відщеплюють нуклеотиди з кінців полінуклеотидного ланцюга. Крім того, стадія утворення кільцевої форми є обов'язковою для процесу інтеграції вірусної ДНК із клітинним геномом. Кільцеву дволанцюгову ДНК мають папілома-, поліома- і гепаднавіруси.

ДНК багатьох вірусів має деякі специфічні особливості. Так, у покс- та асфарвірусів обидва ланцюги ДНК ковалентно замкнені на кінцях. Кільцева ДНК папілома- й поліомавірусів надспіралізована і за своєю конфігурацією подібна до хромосоми клітини. У гепаднавірусів плюс-нитка кільцевої ДНК дефектна – на 20–50 % коротша за мінус-нитку*.

Одноланцюгова ДНК характерна для парво-, цирко-, анелло-, смако-, геномо- і редондовірусів, причому буває лінійною (парвовіруси) або кільцевою (цирко-, анелло- смако-, геномо- і редондовіруси). Одноланцюгова ДНК має негативну полярність, лише в парвовірусів у частини віріонів (1–50 %) виявляють плюс-нитки.

* *Плюс-нитка* вірусної ДНК або РНК має таку саму послідовність нуклеотидів, що й вірусна іРНК, а *мінус-нитка* – комплементарна іРНК.

Вірусні РНК, так само як і ДНК, дуже різноманітні. Вони бувають одно- і дволанцюговими, лінійними, фрагментованими та кільцевими.

Для *одноланцюгової РНК* характерна полярність. Віруси, що містять одноланцюгову РНК, поділяються на дві групи: плюс-нитчасті (або віруси з позитивним геномом) і мінус-нитчасті (або віруси з негативним геномом).

У *плюс-нитчастих вірусів* віріонна РНК виконує функцію іРНК, тобто здатна безпосередньо переносити генетичну інформацію на рибосоми. Позитивний геном мають корона-, артері-, тобан-, флаві-, тога-, матона-, оліфо-, пікорна-, каліці-, астро-, гепе- і нодавіруси, причому в нодавірусів плюс-нитка РНК фрагментована (2 фрагменти). Плюс-нитчастими є також ретровіруси, але вони реалізують свою генетичну інформацію через комплементарну ДНК-копію.

У *мінус-нитчастих вірусів* віріонна РНК не має властивостей іРНК. У таких вірусів на матриці мінус-нитки РНК синтезується комплементарна їй іРНК за участю вірусного ензиму транскриптази, який входить до складу віріонів. Негативний геном мають параміксо-, пневмо-, рабдо-, філо-, борна-, ньямі-, сун-, ортоміксо-, амноон-, арена-, ханта-, найро-, перібун'я-, фенуї- та дельтавіруси.

Одноланцюгова РНК є фрагментованою в ортоміксовірусів (складається з 6–8 фрагментів) та амноонвірусів (10 фрагментів). Арена-, ханта-, найро-, перібун'я- і фенуївіруси також містять одноланцюгову фрагментовану РНК (2 фрагменти в аренавірусів і 3 фрагменти в інших), причому кожен фрагмент має кільцеву форму. Одноланцюгова РНК вірусу гепатиту дельта кільцевої форми.

Для *дволанцюгової РНК* характерна фрагментованість. Цей тип нуклеїнової кислоти властивий реовірусам (10–12 фрагментів), бірнавірусам (2 фрагменти) і пікобірнавірусам (2 фрагменти).

Нуклеїнові кислоти зумовлюють інфекційні властивості вірусів.

Протеїни

Вірусні протеїни, як і клітинні, побудовані з амінокислот і являють собою поліпептидні ланцюги, сформовані у вторинні та третинні структури. Деякі вірусні протеїни, зокрема капсидні, мають ще й четвертинну структуру. Молекулярна маса вірусних поліпептидів коливається в межах від 8 до 275 кДа.

У заражених клітинах вірусний геном кодує синтез *двох груп протеїнів:* 1) структурні, які входять до складу віріонів потомства; 2) неструктурні

(ензими), що забезпечують процес репродукції вірусу на різних етапах, але до складу віріонів не входять.

Структурні протеїни становлять 57–90 % маси віріона. Їхня кількість коливається в широких межах і залежить від складності організації віріона. Так, вірус тютюнової мозаїки містить усього один протеїн, деякі бактеріофаги – 2–3 протеїни, просто організовані віруси тварин – від 1 (цирковіруси) до 3–4 протеїнів (парвовіруси). Зі збільшенням складності організації віріона кількість структурних протеїнів зростає: у вірусу грипу А їх є 7, в аденовірусів – 10–14, у герпесвірусів – 20–32, в асфарвірусів – понад 50, у поксвірусів – 100.

Структурні протеїни поділяються на *двіосновні групи:* капсидні та суперкапсидні.

Капсидні протеїни формують капсид, який оточує вірусну нуклеїнову кислоту. У просто організованих вірусів з ікосаедральною симетрією вони становлять 50–80 % маси віріона, а у вірусів зі спіральною симетрією – 90–98 %.

Основним принципом будови капсиду є *субодиничність*. Це означає, що капсидна оболонка складається з протеїнових субодиниць, які утворені ідентичними поліпептидними ланцюгами. Протеїнові субодиниці (1–6 молекул поліпептидів) формують капсомери, що розміщені за спіральним або ікосаедральним типами симетрії. Завдяки принципу субодиничності досягається величезна економія генетичного матеріалу.

Правильно збудовані капсиди віріонів виникають завдяки здатності вірусних протеїнів до самоскладання (впорядкованої агрегації), що забезпечує утворення протеїнової структури з мінімумом вільної енергії. Самоскладання вірусних протеїнів можна порівняти з кристалізацією.

Вірусний капсид виконує важливі функції. Основна його функція – *захисна*, спрямована на захист вірусного геному від несприятливих зовнішніх чинників і насамперед від численних нуклеаз організму. У зв'язку з цим вірусні капсиди мають високу стійкість до фізико-хімічних факторів, зокрема до протеолітичних ензимів, що виробилося в процесі еволюції. Це досягається завдяки певному укладанню поліпептидних ланцюгів, унаслідок чого пептидні зв'язки стають недоступними для дії ензимів. Разом з тим, капсидні протеїни здатні змінювати свою конформацію та набувати чутливості до клітинних протеаз на ранніх стадіях репродукції. Це призводить до розпаду капсиду і звільнення вірусного геному, що є обов'язковою умовою розвитку вірусної інфекції.

До складу капсиду просто організованих вірусів входять *прикріплювальні протеїни*, які здійснюють *адреснуфункцію*, що виробилася в процесі

еволюції. Ці протеїни взаємодіють зі специфічними рецепторами плазмолеми і забезпечують адсорбцію віріона на клітині. Отже, завдяки прикріплювальним протеїнам вірус розпізнає чутливу клітину, яка здатна забезпечити продукцію повноцінного вірусного потомства. Кожний вірус уражає лише певні біологічні види і типи клітин багатоклітинного організму.

У просто організованих вірусів деякі капсидні протеїни беруть участь у *злитті* капсидної оболонки і плазмолеми, що забезпечує проникнення вірусу в клітину.

Капсид окремих вірусів (незалежно від складності їхньої організації) містить *геномні протеїни*, які ковалентно з'єднані з кінцем вірусної нуклеїнової кислоти. Функції їх нерозривно зв'язані з функціями геному та їхньою регуляцією.

Капсид багатьох складно організованих вірусів містить *ензими*, які беруть участь у репродукції вірусів, зокрема здійснюють транскрипцію та реплікацію вірусного геному.

Капсидні протеїни мають *антигенні властивості*, тобто індукують синтез специфічних антитіл.

Суперкапсидні протеїни знаходяться в зовнішній ліпопротеїновій оболонці складно організованих вірусів, пронизуючи подвійний ліпідний шар. Вони представлені *глікопротеїнами*, в яких вуглеводні ланцюги прикріплені до певних амінокислот поліпептиду. Глікозилювання здійснюють клітинні ензими. Тому один і той самий вірус, який репродукується в різних типах клітин, може мати неоднакові вуглеводні залишки. У більшості вірусів глікопротеїни формують на поверхні віріона ості – *пепломери*.

Глікопротеїни виконують дві важливі функції, що забезпечує проникнення вірусу в клітину. Одні з них є *прикріплювальними протеїнами*, які взаємодіють зі специфічними рецепторами плазмолеми і зумовлюють адсорбцію віріона на плазмолемі клітини, тобто здійснюють адресну функцію. Інші глікопротеїни є *протеїнами злиття*, що забезпечують проникнення вірусу в клітину шляхом злиття суперкапсидної оболонки з плазмолемою. Крім того, глікопротеїни є *основними антигенами*, до яких утворюються вірусонейтралізувальні антитіла.

У деяких складно організованих вірусів на внутрішній поверхні суперкапсидної оболонки міститься проміжний структурний шар, сформований *матриксним*, або *мембранним*, *протеїном (М-білок).* Це гідрофобний протеїн, який стабілізує структуру віріона та є медіатором складання віріонів потомства, опосередковуючи взаємодію суперкапсидних і капсидних протеїнів.

Неструктурні вірусні протеїни вивчені значно менше, ніж структурні, у зв'язку з великими труднощами їхнього очищення і диференціації від компонентів клітини-хазяїна. До них належать, зокрема, ензими синтезу вірусних нуклеїнових кислот (ДНК- і РНК-полімерази), регулятори експресії вірусного геному, ензими модифікацій вірусних протеїнів (протеїнази і протеїнкінази), інгібітори біосинтезу та індуктори руйнування клітин.

Ліпіди

Ліпіди знаходяться в складі суперкапсидної оболонки складно організованих вірусів. Вони формують подвійний ліпідний шар суперкапсиду, який пронизаний вірусними глікопротеїнами. Вміст ліпідів у різних вірусів коливається в широких межах. Так, у складно організованих РНК-вмісних вірусів ліпіди становлять 15–35 % маси віріона. У складно організованих ДНК-вмісних вірусів вміст ліпідів варіює від 4 % (вірус вісповакцини) до 22 % (альфагерпесвіруси людини 1 і 2). Приблизно 50–60 % ліпідів представлено фосфоліпідами, а 20–30 % – холестерином.

Вірусні ліпіди, як правило, мають клітинне походження, за винятком поксвірусів. У більшості РНК-вмісних вірусів ліпіди включаються в склад віріонів на пізніх стадіях репродукції, коли віріони потомства формуються і виходять із клітини брунькуванням через плазматичну мембрану. При цьому сформовані нуклеокапсиди або серцевини, проходячи через плазмолему, огортаються нею і набувають таким чином зовнішньої оболонки. Отже, суперкапсидна оболонка більшості РНК-вмісних вірусів утворюється з плазмолеми, з якої клітинні протеїни витіснені вірусними глікопротеїнами. Тому ліпідний склад вірусів близький до вмісту ліпідів клітинної плазматичної мембрани.

Деякі РНК-вмісні віруси (перібун'я-, ханта-, найро-, фенуї-, корона-, артері- та флавівіруси) брунькуються через мембрани ендоплазматичної сітки і комплексу Гольджі, тому в їхньому складі виявляють ліпіди цих мембран.

Зі складно організованих ДНК-вмісних вірусів ліпіди клітинної плазматичної мембрани містять асфар- та ірідовіруси, яким властиве брунькування через плазмолему. Для герпесвірусів характерне брунькування через ядерну мембрану, тому в їхньому складі містяться ліпіди ядерної оболонки. Аллогерпесвіруси брунькуються через ядерну мембрану й остаточно – через мембрани комплексу Гольджі. Гепаднавіруси містять ліпіди мембран ендоплазматичної сітки, через які відбувається брунькування

віріонів потомства. У поксвірусів ліпіди вірусоспецифічні: синтезуються в цитоплазмі заражених клітин.

У зв'язку з клітинним походженням загальний склад ліпідів та їхніх окремих компонентів у одного і того ж самого вірусу може істотно відрізнятися залежно від клітини-хазяїна, де відбувається його репродукція. І навпаки, якщо різні віруси репродукуються в однакових клітинах, ліпідний склад їх дуже подібний.

Ліпіди мають важливе значення для вірусів. Вони стабілізують структуру віріонів, забезпечують взаємодію глікопротеїнів у складі суперкапсиду, ізолюють внутрішні компоненти віріонів (нуклеокапсиди або серцевини)від гідрофільних речовин оточуючого середовища.

Вуглеводи

Вуглеводи знаходяться в складі глікопротеїнів суперкапсиду складно організованих вірусів. Це короткі олігосахариди, що складаються, як правило, з 2–4 залишків, прикріплених до певних амінокислот поліпептиду за допомогою клітинних ензимів. Вміст вуглеводів досягає 10–13 % маси віріона. У складі глікопротеїнів виявляють такі цукрові залишки, як фруктоза, сахароза, маноза, галактоза, нейрамінова кислота і глюкозамін. Хімічна специфічність вуглеводного компонента вірусів повністю визначається ензимами клітини-хазяїна.

Вуглеводи відіграють важливу роль у структурі та функції вірусних протеїнів. Вони є каркасом для локальних ділянок глікопротеїнів, забезпечуючи таким чином збереження конформації протеїнових молекул, а також зумовлюють їхній захист від протеолітичних ензимів і мають вплив на антигенні властивості.

Компоненти клітини-хазяїна

Крім клітинних ліпідів і вуглеводів, які є обов'язковою складовою частиною суперкапсидної оболонки вірусів, у структурі віріонів виявляють інші компоненти клітини-хазяїна. Вони можуть включатися до складу віріонів потомства випадково, проте частіше – закономірно, виконуючи певні функції.

У суперкапсидній оболонці вірусів нерідко знаходяться *клітинні протеїни*, які маскують поверхневі вірусні антигени, що призводить до зниження імунної відповіді та перехресних імунологічних реакцій.

Деякі складно організовані віруси містять протеїн цитоскелету *актин* і клітинні ензими (наприклад, *протеїнкінази*). Надспіралізована ДНК папілома- і поліомавірусів асоціюється з клітинними *гістонами*, утворюючи міні-хромосому. У вірусу імунодефіциту людини 1 (ВІЛ-1) клітинний протеїн циклофілін А становить понад 30 % усіх вірусних протеїнів. Формування віріонів потомства ВІЛ-1 за відсутності циклофіліну А призводить до появи неінфекційних вірусних часток. До складу ретровірусів входить одна з клітинних *тРНК*, яка специфічна для конкретного виду вірусу і відіграє важливу роль в експресії вірусного геному.

Аренавіруси завжди містять клітинні *рибосоми*, які надають віріонам зернистої (піщаної) структури. Звідси походить назва вірусів: від лат. arena, arenosus – пісок, піщаний. Рибосоми не відіграють жодної ролі в розмноженні аренавірусів. Вони включаються до складу віріонів на кінцевих стадіях репродукції, очевидно, в результаті їхнього значного скупчення в місцях формування вірусного потомства і плеоморфізму віріонів.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Охарактеризуйте фізичну структуру вірусів. **2.** Які ви знаєте типи симетрії капсидів вірусів і чим вони зумовлені? **3.** Охарактеризуйте нуклеїнові кислоти вірусів, їхні функції та структурні особливості. **4.** Дайте характеристику вірусним протеїнам та їхнім функціям. **5.** Яку роль відіграють ліпіди і вуглеводи в складі вірусів та їхнє походження? **6.** Які компоненти клітини-хазяїна бувають у складі вірусів та їхні функції?

ТЕМА 1.3. КЛАСИФІКАЦІЯ ТА НОМЕНКЛАТУРА ВІРУСІВ

1.3.1. Основи класифікації вірусів

Відкриття вірусів ґрунтувалося на вимірі їхньої єдиної фізико-хімічної характеристики – фільтрівності. Це був один з основних критеріїв (поряд з абсолютним внутрішньоклітинним паразитизмом), що відділяв віруси від бактерій. Тому перші спроби класифікації вірусів наприкінці 1940-х рр. ґрунтувалися на схожості патогенних властивостей, органотропності, спільності екологічного статусу. У 1950-х рр. зроблено перші спроби розділити віруси на групи з латинізованими назвами на основі їхніх фізико-

хімічних властивостей. У той час було відкрито багато нових вірусів тварин і людини та створено різні класифікаційні схеми, часто взаємовиключні.

Для виправлення ситуації в 1966 р. у Москві на IX Міжнародному мікробіологічному конгресі організовано Міжнародний комітет із таксономії вірусів. МКТВ прийняв за основу фізико-хімічні критерії, запропоновані французькими науковцями *А. Львовом* та ін. у 1962 р., але вирішив створювати класифікацію вірусів поступово в міру накопичення достатньої інформації. У період 1966–1970 рр. сформовано роди вірусів. Наступний період 1971–1975 рр. характеризувався створенням родин і підродин та розробкою більш детальних критеріїв для таксономічних рангів. Починаючи з 1990 р., окремі родини вірусів об'єднано в порядки, а у 2018–2019 рр. для РНК- і ДНК-геномних вірусів створено нові таксони: регіони, царства, типи, підтипи, класи, підпорядки, підроди.

Віруси належать до домену *Viruses*. Сучасна класифікація вірусів є універсальною для вірусів хребетних, безхребетних, рослин, грибів, найпростіших, бактерій та архей. Вона ґрунтується на фундаментальних властивостях вірусів, з яких провідними є ознаки, що характеризують нуклеїнову кислоту, механізм реплікації та морфологію віріона.

В основу сучасної класифікації вірусів покладено такі *основні критерії:* 1) тип нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК), її структура (кількість ниток, конформація, фрагментованість, полярність); 2) наявність зовнішньої ліпопротеїнової оболонки; 3) тип симетрії капсиду, кількість капсомерів; 4) розміри і морфологічні особливості віріона; 5) стратегія вірусного геному (механізм реплікації); 6) форми генетичних взаємодій; 7) антигенні властивості; 8) спектр сприйнятливих хазяїв; 9) патогенність, у тому числі цитопатичні зміни в клітинах; 10) механізм передавання; 11) географічне поширення.

На основі перелічених ознак віруси поділяються на такі таксономічні ранги (або категорії), як *регіони, царства, типи, підтипи, класи, порядки, підпорядки, родини, підродини, роди, підроди* і *види.* Формування родин проводиться за критеріями, викладеними в пунктах 1–5. Поділ на підродини, роди і види ґрунтується на основі решти ознак. Порядки об'єднують родини вірусів зі схожою організацією геному та єдиним механізмом реплікації.

Для впорядкування найменувань як таксономічних рангів, так і окремих видів вірусів, МКТВ виробив певні правила. Номенклатура має бути міжнародною та універсальною для всіх вірусів. Назва регіону закінчується на «*viria*», царства – «*virae*», типу – «*viricota*», підтипу – «*viricotina*», класу – «*viricetes*», порядку – «*virales*», підпорядку –»*virineae*», родини – «*viridae*», підродини – «*virinae*», роду і підроду – «*virus*».

У видових назвах вірусів не було єдиного принципу. Спроби дати їм біномінальні латинізовані назви зустріли великі труднощі, оскільки раніше існуючі найменування міцно вкоренилися. Вірусам присвоювали назви хвороб (віруси поліомієліту, віспи, сказу, ящуру), імена дослідників (віруси саркоми Рауса, фіброми Шоупа), географічні найменування (віруси лісу Семліки, Західного Нілу, Ебола, Марбург), буквені скорочення (ECHO – enteric cytopathogenic human orphan, REO – respiratory enteric orphan), цифри (SV40 – Simian virus 40). Зараз МКТВ запроваджує біномінальну номенклатуру, тобто найменування вірусів мають складатися з родової та видової назви, як і для всіх інших форм життя.

Нині відомо понад 4400 видів вірусів хребетних, безхребетних, рослин, грибів, найпростіших, бактерій та архей.

Згідно з інформацією МКТВ 2020 р., віруси хребетних (1878 видів) входять до домену Viruses, 4 регіонів, 5 царств, 10 типів, 2 підтипів, 20 класів, 26 порядків, 3 підпорядків, 45 родин (15 – ДНК-геномні та 30 – РНК-геномні), 33 підродин, 345 родів і 49 підродів.

Окремі родини, крім вірусів хребетних, містять віруси безхребетних і рослин, зокрема:

- родини *Poxviridae, Iridoviridae, Parvoviridae, Circoviridae, Smacoviridae, Genomoviridae, Rhabdoviridae, Nyamiviridae, Peribunyaviridae, Phenuiviridae, Nairoviridae, Nodaviridae, Reoviridae* і *Birnaviridae* – віруси комах;
- родини *Genomoviridae, Rhabdoviridae, Phenuiviridae* і *Reoviridae* – віруси рослин;
- родина *Nyamiviridae* – віруси соєвих нематод, цестод, сипункулідів і голкошкірих;
- родина *Rhabdoviridae* – віруси нематод;
- родина *Reoviridae* – реовірус китайських мохнаторуких крабів;
- родина *Birnaviridae* – віруси двостулкових молюсків і коловерток.

Родина ДНК-геномних *Anelloviridae* (14 родів, 76 видів) не входить до жодного регіону, як і некласифікований РНК-геномний рід *Deltavirus* (1 вид). Родина *Birnaviridae* не класифікована в межах царства *Orthornavirae*. Родина ДНК-геномних *Hepadnaviridae* включена до регіону *Riboviria* на підставі того, що реплікація гепаднавірусів відбувається через стадію РНК за принципом зворотної транскрипції, як і в ретровірусів.

Таксономічні ранги вірусів людини і тварин наведено в табл. 1.1 і 1.2, а таксономічні ознаки родин – на рис. 1.6 і 1.7 та в табл. 1.3. і 1.4 (за інформацією МКТВ випуску в липні 2019 р., ратифікація в березні 2020 р.).

Таблиця 1.1

Таксономічні ранги ДНК-геномних вірусів людини і тварин

Типи	Класи	Порядки	Родини, кількість підродин, родів і видів
Домен *Viruses*			
Регіон *Duplodnaviria*			
Царство *Heunggongvirae*			
Peploviricota	*Herviviricetes*	*Herpesvirales*	*Herpesviridae* 3 підродини, 13 родів, 107 видів
			Alloherpesviridae 4 роди, 13 видів
Регіон *Varidnaviria*			
Царство *Bamfordvira*			
Nucleocytoviricota	*Megaviricetes*	*Pimascovirales*	*Iridoviridae* 1 підродина, 3 роди, 11 видів
	Pokkesviricetes	*Asfuvirales*	*Asfarviridae* 1 рід, 1 вид
		Chitovirales	*Poxviridae* 1 підродина, 18 родів, 52 види
Preplasmiviricota	*Tectiliviricetes*	*Rowavirales*	*Adenoviridae* 5 родів, 80 видів
Регіон *Monodnaviria*			
Царство *Shotokuvirae*			
Cossaviricota	*Insthoviricetes*	*Zurhausenvirales*	*Papillomaviridae* 2 підродини, 53 роди, 133 види
	Papovaviricetes	*Sepolyvirales*	*Polyomaviridae* 4 роди, 102 види
	Quintoviricetes	*Piccovirales*	*Parvoviridae* 1 підродина, 10 родів, 77 видів
Cressdnaviricota	*Arfiviricetes*	*Cirlivirales*	*Circoviridae* 2 роди, 80 видів
		Cremevirales	*Smacoviridae* 5 родів, 40 видів
		Recrevirales	*Redondoviridae* 1 рід, 2 види
	Repensiviricetes	*Geplafuvirales*	*Genomoviridae* 8 родів, 61 вид

Таблиця 1.2

Таксономічні ранги РНК-геномних вірусів людини і тварин

Типи, підтипи	**Класи**	**Порядки, підпорядки**	**Родини, кількість підродин, родів, підродів і видів**
1	2	3	4
Домен *Viruses*			
Регіон *Riboviria*			
Царство *Orthornavirae*			
Duplornaviricota	*Resentoviricetes*	*Reovirales*	*Reoviridae* 2 підродини, 6 родів, 55 видів
Kitrinoviricota	*Alsuviricetes*	*Hepelivirales*	*Hepeviridae* 2 роди, 5 видів
		Martellivirales	*Matonaviridae* 1 рід, 1 вид
	Flasuviricetes	*Amarillovirales*	*Flaviviridae* 4 роди, 89 видів
	Magsaviricetes	*Nodamuvirales*	*Nodaviridae* 2 роди, 5 видів
Negarnaviricota Підтип *Haploviricotina*	*Monjiviricetes*	*Mononegavirales*	*Paramyxoviridae* 4 підродини, 17 родів, 77 видів
			Pneumoviridae 2 роди, 5 видів
			Rhabdoviridae 12 родів, 87 видів
			Filoviridae 6 родів, 11 видів
			Bornaviridae 3 роди, 11 видів
			Nyamiviridae 1 рід, 3 види
			Sunviridae 1 рід, 1 вид
Negarnaviricota Підтип *Polyploviricotina*	*Ellioviricetes*	*Bunyavirales*	*Arenaviridae* 4 роди, 50 видів
			Peribunyaviridae 2 роди, 93 види
			Hantaviridae 4 підродини, 7 родів, 48 видів
			Nairoviridae 1 рід, 15 видів
			Phenuiviridae 3 роди, 84 види

Закінчення таблиці 1.2

1	2	3	4
Negarnaviricota Підтип *Polyploviricotina*	*Insthoviricetes*	*Articulavirales*	*Orthomyxoviridae* 7 родів, 9 видів
			Amnoonviridae 1 рід, 1 вид
Pisuviricota	*Duplopiviricetes*	*Durnavirales*	*Picobirnaviridae* 1 рід, 3 види
	Pisoniviricetes	*Nidovirales* підпорядок *Arnidovirineae*	*Arteriviridae* 6 підродин, 13 родів, 11 підродів, 23 види
			Olifoviridae 1 підродина, 1 рід, 1 вид
		підпорядок *Cornidovirineae*	*Coronaviridae* 2 підродини, 5 родів, 26 підродів, 46 видів
		підпорядок *Tornidovirineae*	*Tobaniviridae* 4 підродини, 8 родів, 12 підродів, 15 видів
		Picornavirales	*Picornaviridae* 63 роди, 147 видів
			Caliciviridae 11 родів, 13 видів
	Stelpaviricetes	*Stellavirales*	*Astroviridae* 2 роди, 22 види
–	–	–	*Birnaviridae* 3 роди, 5 видів
Царство *Pararnavirae*			
Artverviricota	*Revtraviricetes*	*Blubervirales*	*Hepadnaviridae* 2 роди, 18 видів
Царство *Pararnavirae*			
Artverviricota	*Revtraviricetes*	*Blubervirales*	*Hepadnaviridae* 2 роди, 18 видів
		Ortervirales	*Retroviridae* 2 підродини, 11 родів, 68 видів

1.3.2. Основні таксономічні ознаки родин вірусів людини і тварин

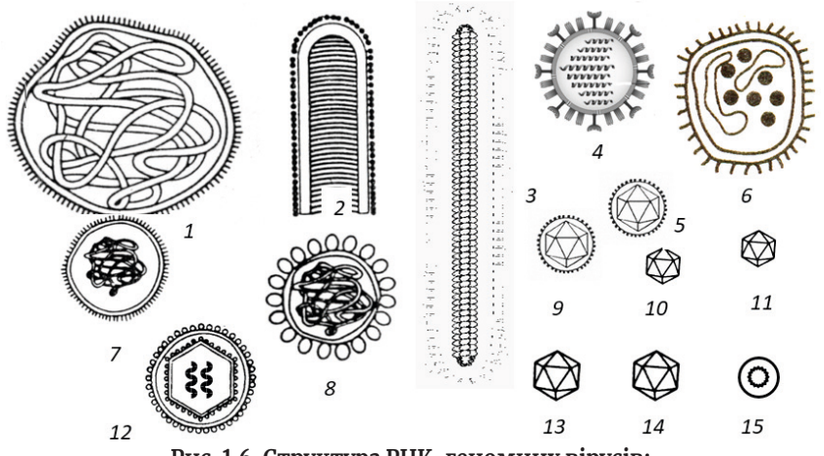


Рис. 1.6. Структура РНК-геномних вірусів:

1 – параміксовіруси, пневмовіруси, борнавіруси, ньямівіруси, сунвіруси; 2 – рабдовіруси; 3 – філовіруси; 4 – ортоміксовіруси; 5 – амноонвіруси; 6 – аренавіруси; 7 – перібун'явіруси; хантавіруси; найровіруси, фенуївіруси; 8 – коронавіруси, тобанвіруси; 9 – артерівіруси, тогавіруси, флавівіруси, матонавіруси, оліфовіруси; 10 – пікорнавіруси, каліцівіруси, астровіруси, гепевіруси; 11 – нодавіруси; 12 – ретровіруси; 13 – реовіруси; 14 – бірнавіруси, пікобірнавіруси; 15 – дельтавірус.

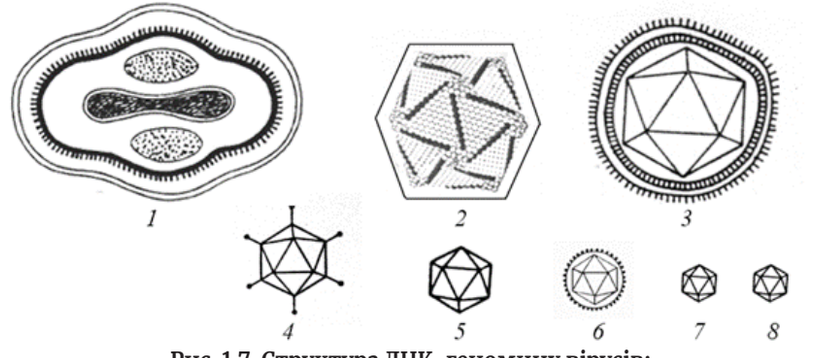


Рис. 1.7. Структура ДНК-геномних вірусів:

1 – поксвіруси; 2 – асфарвіруси, ірідовіруси; 3 – герпесвіруси, аллогерпесвіруси; 4 – аденовіруси; 5 – папіломавіруси, поліомавіруси; 6 – гепаднавіруси; 7 – парвовіруси; 8 – цирковіруси, анелловіруси, смаковіруси, геномовіруси, редондовіруси.

Таблиця 1.3

Основні таксономічні ознаки ДНК-геномних вірусів людини і тварин

Родина	ДНК		Форма віріона	Розміри віріона (нм)	Зовнішня ліпопротеїнова оболонка	Тип симетрії капсиду
	Структура	Полярність				
Poxviridae (поксвіруси)	2л (л)		Циглино-подібна, овоїдна	300–450× 170–260	є	–
Asfarviridae (асфарвіруси)	2л (л)		Сферична, ікосаедральна	175–215	є	Ікосаедральний
Iridoviridae (ірідовіруси)	2л (л)		Ікосаедральна, сферична	120–200 до 350	Немає, є	Ікосаедральний
Herpesviridae (герпесвіруси)	2л (л)		Сферична	85–300	є	Ікосаедральний
Alloherpesviridae (аллогерпесвіруси)	2л (л)		Сферична	150–200	є	Ікосаедральний
Adenoviridae (аденовіруси)	2л (л)		Ікосаедральна	70–90	Немає	Ікосаедральний
Papillomaviridae (папіломавіруси)	2л (к)		Ікосаедральна	55	Немає	Ікосаедральний
Polyomaviridae (поліомавіруси)	2л (к)		Ікосаедральна	40–45	Немає	Ікосаедральний
Hepadnaviridae (гепаднавіруси)	2л (к)		Сферична	42–47	є	Ікосаедральний
Parvoviridae (парвовіруси)	1л (л)	– і +	Ікосаедральна	18–26	Немає	Ікосаедральний
Circoviridae (цирковіруси)	1л (к)	–	Ікосаедральна	15–25	Немає	Ікосаедральний
Anelloviridae (анелловіруси)	1л (к)	–	Ікосаедральна	30–32	Немає	Ікосаедральний
Smacoviridae (смаковіруси)	1л (к)	–	Ікосаедральна	Н.д.	Немає	Ікосаедральний
Genomoviridae (геномовіруси)	1л (к)	–	Сферична	20	Немає	Ікосаедральний
Redondoviridae (редондовіруси)	1л (к)	–	Ікосаедральна	Н.д.	Немає	Ікосаедральний

Примітка: 1л – одноланцюгова; 2л – дволанцюгова; л – лінійна; к – кільцева; Н.д. – немає даних.

Таблиця 1.4

Основні таксономічні ознаки РНК-геномних вірусів людини і тварин

Родина	ДНК		Форма віріона	Розміри віріона (нм)	Зовнішня ліпопротеїнова оболонка	Тип симетрії капсиду
	Структура	Полярність				
1	2	3	4	5	6	7
Paramyxoviridae (параміксовіруси)	1л (л)	–	Плеоморфна, сферична	120–350	Є	Спіральний
Pneumoviridae (пневмовіруси)	1л (л)	–	Сферична, ниткоподібна	80 – 140 250–600 2000 × 70 – 190	Є	Спіральний
Rhabdoviridae (рабдовіруси)	1л (л)	–	Кулеподібна	130–380 × 60–80	Є	Спіральний
Bornaviridae (борнавіруси)	1л (л)	–	Сферична	80 – 100	Є	Спіральний
Nyamiviridae (н'ямівіруси)	1л (л)	–	Сферична	100–130	Є	Спіральний
Sunviridae (сунвіруси)	1л (л)	–	Сферична	Н.д.	Є	Спіральний
Orthomyxoviridae (ортоміксовіруси)	1л (ф)	–	Плеоморфна, сферична	80 – 120	Є	Спіральний
Amnoonviridae (амноонвіруси)	1л (ф)	–	Сферична	55 – 100	Є	Ікосаедральний
Arenaviridae (аренавіруси)	1л (фк)	–	Плеоморфна, сферична	50 – 300	Є	Спіральний
Peribunyaviridae (перібун'явіруси)	1л (фк)	–	Сферична	80 – 120	Є	Спіральний
Hantaviridae (хантавіруси)	1л (фк)	–	Сферична	80 – 120	Є	Спіральний
Nairoviridae (найровіруси)	1л (фк)	–	Сферична	80 – 120	Є	Спіральний

Закінчення таблиці 1.2

1	2	3	4	5	6	7
Phenuiviridae (фенуївіруси)	1л (фк)	–	Сферична	80 – 120	Є	Спіральний
Coronaviridae (коронавіруси)	1л (л)	+	Плеоморфна, сферична	80 – 220	Є	Спіральний
Tobaniviridae (тобанвіруси)	1л (л)	+	Плеоморфна, сферична	120–140	Є	Спіральний
Arteriviridae (артерівіруси)	1л (л)	+	Сферична	50 – 70	Є	Ікосаедральний
Togaviridae (тогавіруси)	1л (л)	+	Сферична	65 – 70	Є	Ікосаедральний
Flaviviridae (флавівіруси)	1л (л)	+	Сферична	40 – 60	Є	Ікосаедральний
Matonaviridae (матонавіруси)	1л (л)	+	Сферична	50 – 70	Є	Ікосаедральний
Olifoviridae (оліфовіруси)	1л (л)	+	Сферична	Н.д.	Є	Ікосаедральний
Picornaviridae (пікорнавіруси)	1л (л)	+	Сферична	20 – 32	Немає	Ікосаедральний
Caliciviridae (каліцівіруси)	1л (л)	+	Сферична, ікосаедральна	27 – 40	Немає	Ікосаедральний
Astroviridae (астровіруси)	1л (л)	+	Сферична	28 – 30	Немає	Ікосаедральний
Hepeviridae (гепевіруси)	1л (л)	+	Сферична	27 – 34	Немає	Ікосаедральний
Retroviridae (ретровіруси)	1л (л)	+	Сферична	80 – 100	Є	Ікосаедральний
Reoviridae (реовіруси)	2л (ф)		Сферична	60 – 80	Немає	Ікосаедральний
Birnaviridae (бірнавіруси)	2л (ф)		Ікосаедральна	60 – 70	Немає	Ікосаедральний
Picobirnaviridae (пікобірнавіруси)	2л (ф)		Сферична	33 – 37	Немає	Ікосаедральний
Deltavirus (дельтавірус)	1л (к)	–	Сферична	36 – 43	Є	–

Примітка: 1л – одноланцюгова; 2л – дволанцюгова; ; л – лінійна; к – кільцева; ф – фрагментована; Н.д. – немає даних.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. На яких принципах базувалися ранні класифікації вірусів? **2.** Коли запропоновано проєкт універсальної класифікації вірусів та які критерії сучасної класифікації вірусів? **3.** Назвіть таксономічні ранги ДНК- і РНК-геномних вірусів. **4.** Охарактеризуйте номенклатуру вірусів. **5.** Дайте таксономічну характеристику родин ДНК-геномних вірусів людини і тварин. **6.** Дайте таксономічну характеристику родин РНК-геномних вірусів людини і тварин.

ТЕМА 1.4. РЕПРОДУКЦІЯ ВІРУСІВ

1.4.1. Особливості репродукції вірусів

Віруси є автономними генетичними структурами, що не мають власних систем синтезу протеїнів. Тому вони здатні розмножуватися тільки в чутливих клітинах різних організмів (від бактерій до людини), куди вносять лише свою генетичну інформацію. Вірусам властивий унікальний спосіб розмноження – ***диз'юнктивна репродукція***. Це означає, що в зараженій клітині синтез вірусних структурних компонентів роз'єднаний у часі та просторі, відбувається відносно незалежно один від одного, а віріони потомства формуються за принципом самоскладання.

Усі процеси репродукції вірусів відбуваються в клітині за рахунок її сировинних та енергетичних ресурсів і протеїносинтезувального апарату. Вірусні нуклеїнові кислоти синтезуються з нуклеотидів клітини. Синтез вірусних протеїнів здійснюється на рибосомах із використанням клітинних амінокислот і тРНК. Джерелом енергії для біосинтетичних процесів при репродукції вірусів слугує аденозинтрифосфорна кислота (АТФ), що виробляється в мітохондріях клітини.

Синтез нуклеїнових кислот вірусів здійснюють ензими – ***полімерази***. Залежно від типу нуклеїнової кислоти, що синтезується, розрізняють *ДНК-полімеразу* (ДНК-залежну ДНК-полімеразу) та *РНК-полімеразу,* яка має кілька *різновидів:* 1) ДНК-залежна РНК-полімераза (транскриптаза) – синтезує іРНК на матриці ДНК; 2) РНК-залежна РНК-полімераза (транскриптаза) – синтезує іРНК на матриці РНК; 3) РНК-залежна РНК-полімераза (репліказа) – здійснює реплікацію РНК у плюс-нитчастих вірусів.

У РНК-вмісних мінус-нитчастих вірусів із родин, що входять до порядку *Mononegavirales,* функцію реплікази виконує віріонна транскриптаза. У РНК-вмісних мінус-нитчастих вірусів із фрагментованим геномом реплікацію здійснюють синтезовані полімеразні протеїни. У РНК-вмісних вірусів із дволанцюговою фрагментованою РНК реплікація відбувається за участю новосинтезованої транскриптази, що функціонує як репліказа.

Унікальний ензим містять ретровіруси – *зворотну транскриптазу (ревертазу)*, що має різні ферментативні властивості та синтезує ДНК на матриці РНК.

У деяких випадках синтез вірусних нуклеїнових кислот відбувається за участю клітинних полімераз. Проте частіше цей процес забезпечують вірусоспецифічні полімерази. Вони поділяються на *віріонні*, які знаходяться в складі віріонів і разом з ними проникають у клітину, і *вірусіндуковані*, що синтезуються на рибосомах зараженої клітини згідно з генетичною інформацією вірусу. Полімерази характеризуються високою специфічністю.

Процес репродукції вірусів складається з двох етапів.

Перший етап включає такі *стадії:* 1) адсорбція віріонів на плазмолемі клітини; 2) проникнення віріонів у клітину; 3) депротеїнізація (роздягання) віріонів. Початкові стадії репродукції спрямовані на те, щоб вірус проник у відповідні структури клітини і його нуклеїнова кислота звільнилася від суперкапсидної та капсидної оболонок.

Як тільки ця мета досягнута, починається ***другий етап*** репродукції, під час якого відбувається експресія вірусного геному, синтез вірусних компонентів і відтворення інфекційного потомства. На цьому етапі виділяють *дві фази:*

1) *екліпс-фаза* – це інтервал між зникненням батьківських віріонів унаслідок дезінтеграції та появою вірусного потомства;

2) *фаза дозрівання* – період, що супроводжується формуванням і накопиченням віріонів потомства в клітині або поза нею.

Другий етап включає такі *стадії:* 1) транскрипція вірусного геному; 2) трансляція вірусних іРНК; 3) реплікація вірусного геному; 4) формування віріонів; 5) вихід віріонів із клітини.

Віріони потомства, що нараховуються десятками тисяч, опинившись у екстрацелюлярному середовищі, заражають сусідні клітини, і в кожній із них цикл репродукції повторюється від початку до кінця.

1.4.2. Адсорбція і проникнення віріонів у клітину

Репродукція вірусів починається з процесу ***адсорбції*** – прикріплення віріонів до плазмолеми клітини. Перший контакт вірусу з клітиною виникає в результаті випадкового зіткнення за типом броунівського руху, причому ранні етапи адсорбції мають неспецифічний характер. В основі їх лежить *електростатична взаємодія* між певними угрупованнями на поверхні вірусу і клітини, а саме: позитивно зарядженими амінними групами вірусного протеїну і негативно зарядженими кислими фосфатними, сульфатними й карбоксильними групами клітинної плазмолеми. Проте тільки *високоспецифічна взаємодія* між вірусними прикріплювальними протеїнами і рецепторами плазмолеми забезпечує адсорбцію вірусу.

Прикріплювальні протеїни, які впізнають специфічні клітинні рецептори, знаходяться в капсидній чи суперкапсидній оболонці вірусу (залежно від складності його організації). Вони можуть входити до складу унікальних органел, таких як фібрили в аденовірусів або Т-парних бактеріофагів. У багатьох складно організованих вірусів прикріплювальні протеїни (глікопротеїни) формують виступи – пепломери.

Клітинні рецептори, з якими зв'язуються віруси, представлені глікопротеїнами. Їхня кількість на одну клітину коливається зазвичай у межах від 10^4 до 10^5, а іноді досягає і 500 тис. Наявність специфічних рецепторів зумовлює *чутливість клітин* до вірусів. Клітинні рецептори висококонсервативні, й заміна амінокислот у них може призвести до втрати інфекційності або зміни тропізму вірусу (наприклад, людські штами вірусу грипу А стають патогенними для птахів і навпаки). Клітинні рецептори слугують не лише для прикріплення вірусу, але й для подальшого його внутрішньоклітинного транспортування в певні ділянки цитоплазми та ядра, де відбувається його дезінтеграція.

Процес адсорбції складається з двох послідовних ***стадій***: *зворотної* та *незворотної*. Спочатку виникає поодинокий зв'язок між віріоном і рецептором. Проте таке прикріплення неміцне, і віріон може легко відірватися від клітинної поверхні. Для настання незворотної адсорбції мають з'явитися *множинні зв'язки* між віріоном і численними молекулами рецепторів. Їхня кількість у ділянках адсорбції може досягати 3000. Таке мультивалентне прикріплення виникає внаслідок вільного переміщення молекул рецепторів у подвійному ліпідному шарі плазмолеми. *Збільшення текучості ліпідів* – одна з найбільш ранніх подій при взаємодії вірусу з клітиною.

Крім того, адсорбція вірусу супроводжується також іншими структурними і функціональними змінами плазмолеми, такими як агрегація внутрішньомембранних часток і збільшення її проникливості.

Тривалість адсорбції залежить від кількісного співвідношення вірусу і клітин, pH, температури, концентрації іонів позаклітинного середовища. Наприклад, вірус ящуру адсорбується в культурі клітин нирки свині при 2–4 °С і 37 °С. Однак за низької температури адсорбція є зворотною, тоді як при 37 °С через 80–90 хв настає незворотна адсорбція.

Кількість адсорбованого вірусу та інфікованих клітин залежить в основному від множинності зараження і тривалості адсорбції. До однієї клітини може приєднатися від 20 до 15 тисяч віріонів. Більшість адсорбованих віріонів елююється, при цьому вони можуть утратити здатність до повторної адсорбції на інших клітинах. Решта віріонів проникає в клітину і дезінтегрується. Незначна кількість адсорбованих віріонів залишається інтактною.

Адсорбовані віріони проникають у клітину *двома шляхами:* 1) рецепторний ендоцитоз; 2) злиття оболонки віріона з плазмолемою (рис. 1.8). Обидва механізми проникнення вірусів у клітини не є альтернативними, а доповнюють один одного.

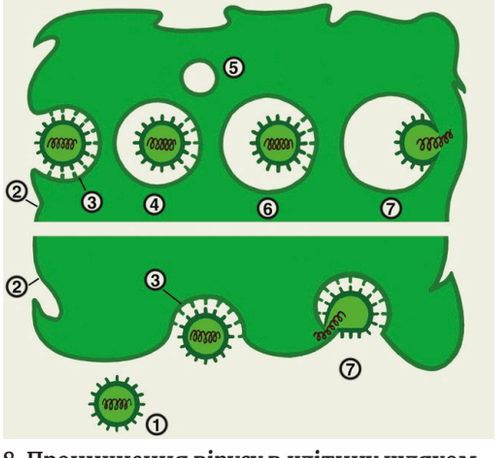


Рис. 1.8. Проникнення вірусу в клітину шляхом рецепторного ендоцитозу (а) і злиття оболонки віріона з плазмолемою (б)

1 – віріон; 2 – плазмолема; 3 –ямка з рецепторами;
4 – цитоплазматична вакуоля з віріоном; 5 – вакуоля; 6 – рецептосома;
7 – вихід внутрішнього компонента віріона в цитоплазму
(https://pjkjnfdbyf.ucoz.ru/index/quot_virusy_ehto_samozvanye_diktatory_quot/0–61)

Рецепторний ендоцитоз – добре налагоджений механізм, який забезпечує швидке проникнення в клітину необхідних для її життєдіяльності речовин. Цей процес відбувається на спеціалізованих ділянках плазмолеми, де розміщені *спеціальні ямки* зі специфічними рецепторами, вистелені з боку цитоплазми високомолекулярним білком – *клатрином.* У місцях адсорбції плазмолема швидко вгинається і виникає *ендоцитарна вакуоля*, яка зливається з іншими внутрішньоклітинними вакуолями, утворюючи *рецептосому* – велику короткоживучу вакуолю, що містить віріон. Потім рецептосома зливається з клітинними мембранами (в тому числі з ядерною), звільняючи віріон (точніше його внутрішній компонент, як побачимо далі) у відповідних ділянках клітини.

Отже, рецепторний ендоцитоз забезпечує проникнення і внутрішньоклітинне транспортування віріонів. Саме цим шляхом потрапляють у чутливі клітини більшість вірусів, незалежно від складності їхньої організації.

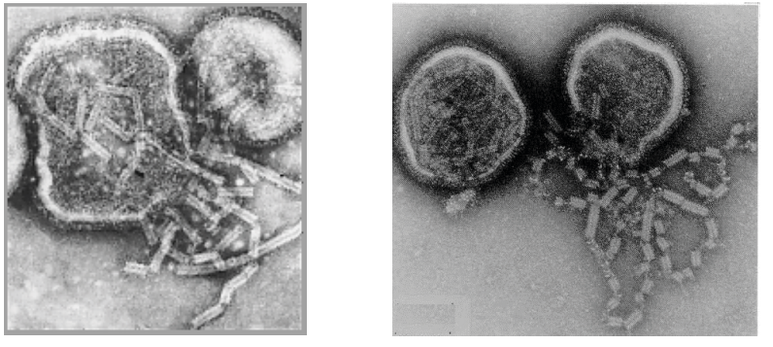
Інший механізм проникнення вірусів у клітини – ***злиття оболонки віріона з плазматичною мембраною***. У результаті суперкапсидна чи капсидна оболонка вірусу інтегрує з плазмолемою, а внутрішній компонент віріона (серцевина, нуклеокапсид або нуклеїнова кислота – сама чи в комплексі з геномними білками) проникає в цитоплазму. У складно організованих вірусів цей процес зумовлений *взаємодією протеїнів злиття з ліпідами плазмолеми.* У просто організованих вірусів цю функцію виконують деякі капсидні протеїни. Процес злиття вірусної оболонки з плазмолемою потребує низьких значень pH (5,0–5,75), що пов'язано з конформаційними змінами вірусних протеїнів злиття.

Швидкість проникнення вірусу залежить не лише від pH, але й від температури. Так, проникнення вірусу ящуру в клітину триває 30 сек при 37 °С, 6 хв при 20 °С, а при 15 °С майже повністю припиняється.

1.4.3. Депротеїнізація (роздягання) віріонів

Для того, щоб спричинити інфекційний процес, віріони повинні позбутися своїх оболонок (суперкапсидної та капсидної), які перешкоджають експресії вірусного геному. Цей процес називається ***депротеїнізацією***, або ***роздяганням***. У результаті звільняється *внутрішній компонент віріона* (рис. 1.9): серцевина, нуклеокапсид, нуклеїнова кислота в комплексі з геномними протеїнами або сама нуклеїнова кислота залежно від морфології вірусу. Саме ці структури ініціюють наступну стадію репродукції вірусу – *транскрипцію*. Для експресії вірусного геному зовсім не

обов'язкове повне звільнення його від протеїнів. Усе залежить від структурної організації вірусу.



а) б)

Рис. 1.9. Депротеїнізація респіровірусу людини 1
(Stannard L.M., 2005)

Депротеїнізація нерозривно пов'язана з проникненням і внутрішньоклітинним транспортуванням вірусів. Вона відбувається в *різних ділянках клітини:* рецептосомах, лізосомах, комплексі Гольджі, навколоядерному просторі, порах ядерної мембрани, ядрі. Депротеїнізація різних вірусів має свою специфіку. У вірусів, які потрапляють у клітину шляхом злиття оболонки віріона з плазмолемою, проникнення і депротеїнізація – єдиний нерозділький процес. У рецептосомах відбувається злиття оболонки віріона зі стінками вакуолі, внаслідок чого вірус роздягається і його внутрішній компонент опиняється в цитоплазмі. У разі злиття рецептосоми з ядерною оболонкою вірусна ДНК опиняється в ядрі, а вірусні протеїни залишаються в цитоплазмі.

Депротеїнізація є багатоетапним процесом, який відбувається поступово в результаті послідовних реакцій. У ньому беруть участь ***клітинні протеази***. Наявність у клітинах відповідних ензимів, здатних забезпечити роздягання вірусу, є важливим фактором (поряд зі специфічними рецепторами), що зумовлює їхню чутливість до вірусу. У роздяганні деяких вірусів (зокрема поксвірусів) беруть участь не лише клітинні ензими, але й *вірусоспецифічні протеїни*, що синтезуються на ранніх стадіях репродукції.

При порушенні внутрішньоклітинного транспортування до місць роздягання віріони потрапляють у лізосоми і руйнуються їхніми гідролітичними ферментами, які є одним із захисних чинників клітини від вірусів. Однак, наприклад, реовіруси успішно використовують саме ці ензими

для депротеїнізації. Роздягання реовірусів у лізосомах починається через 20–30 хв після проникнення і завершується впродовж 2–3 год. Швидкість цього процесу залежить від температури: при 37 °С роздягання відбувається втричі швидше, ніж при 20 °С, а при 4 °С практично припиняється.

Отже, початковий етап взаємодії вірусу з клітиною завершується його дезінтеграцією та звільненням вірусного геному.

1.4.4. Транскрипція вірусних геномів

Стратегія вірусного геному спрямована на те, щоб ефективно реалізувати свою генетичну інформацію і переключити сировинні й енергетичні ресурси клітини та її протеїносинтезувальний апарат на синтез вірусоспецифічних молекул. Ключовим моментом у репродукції вірусів є використання для синтезу власних протеїнів клітинних рибосом, яким вірус повинен передати свою генетичну інформацію через посередника – іРНК. Цей процес переписування генетичної інформації з вірусного геному на іРНК називається ***транскрипцією***.

У ***ДНК-вмісних вірусів***, незалежно від структури ДНК, передавання генетичної інформації відбувається за такою самою схемою, як і в клітині:

ДНК —(клітинна або віріонна транскриптаза)→ іРНК → рибосоми → протеїни

Більшість ДНК-вмісних вірусів реплікується в ядрі, тому вони успішно використовують для синтезу іРНК клітинну транскриптазу. Реплікація покс- та асфарвірусів відбувається в цитоплазмі, де немає клітинної транскриптази. Тому ці віруси мають власні ензими для синтезу іРНК, які входять до складу віріонів.

У ***РНК-вмісних вірусів із позитивним геномом,*** у яких віріонна РНК виконує функцію іРНК, передавання генетичної інформації здійснюється просто:

РНК → рибосоми → протеїни

Так реалізують свою генетичну інформацію корона-, артері-, тобан-, тога-, флаві-, матона-, оліфо-, пікорна-, каліці-, астро-, гепе- і нодавіруси. У них фактично немає транскрипції як самостійної стадії репродукції.

Інакша справа у РНК-вмісних вірусів, геном яких не може виконувати функцію іРНК. До них належать дві групи вірусів: з ***одноланцюговою мінус-нитчастою РНК*** (параміксо-, пневмо-, рабдо-, філо-, борна-, н'ямі-, сун-, ортоміксо-, амноон-, арена-, ханта-, найро-, перібун'я-

і фенуївіруси) і з ***дволанцюговою РНК*** (рео-, бірна- і пікобірнавіруси). Передавання генетичної інформації в цих вірусів відбувається за такою схемою:

РНК —(транскриптаза)→ іРНК → рибосоми → протеїни

У клітині немає ензимів, які можуть здійснити транскрипцію вірусного РНК-геному. Цей вірусоспецифічний ензим *РНК-залежна РНК-полімераза* (або *транскриптаза*) знаходиться в складі віріонів і разом з ними проникає в клітину.

Серед РНК-вмісних вірусів є ***родина ретровірусів***, які мають унікальний шлях передавання генетичної інформації – з РНК на ДНК:

РНК —(зворотна транскриптаза (ревертаза))→ ДНК —(інтеграза)→ клітинний геном →
клітинна транскриптаза → іРНК → рибосоми → протеїни

У складі ретровірусів є особливий ензим – *зворотна транскриптаза* (або *ревертаза*), що переписує генетичну інформацію з одноланцюгової РНК на дволанцюгову ДНК. Цей процес називається *зворотною транскрипцією*. Після утворення кільцевої форми вірусоспецифічна ДНК інтегрує з клітинним геномом (за участю вірусного ензиму *інтегрази*) і, будучи його складовою частиною, переписується на іРНК за участю клітинної транскриптази. Оскільки іРНК ретровірусів ідентична віріонній РНК, ретровіруси належать до плюс-нитчастих вірусів.

Коли було розкрито механізми реалізації генетичної інформації у вірусів, утратив актуальність такий головний у свій час критерій для визначення природи вірусів, як наявність у них лише однієї нуклеїнової кислоти. Як бачимо, всі ДНК-геномні віруси індукують у зараженій клітині синтез вірусоспецифічних іРНК. Такий самий процес відбувається у РНК-вмісних вірусів із негативним геномом і дволанцюговою РНК. У РНК-вмісних плюс-нитчастих вірусів віріонна РНК виконує функцію іРНК. Ретровіруси синтезують на матриці геномної РНК комплементарну ДНК. Отже, ці факти не дають змоги використовувати критерій «наявність лише однієї нуклеїнової кислоти» для визначення кардинальної відмінності вірусів від клітинних форм життя.

Транскрипція вірусного геному жорстко контролюється впродовж інфекційного циклу як вірусоспецифічними, так і клітинними механізмами. Новосинтезовані вірусні іРНК транспортуються до рибосом, де передається генетична інформація і здійснюється синтез вірусних протеїнів.

1.4.5. Трансляція вірусних іРНК

Трансляція – це переведення генетичної інформації з іРНК на послідовність амінокислот у поліпептидному ланцюгу протеїну.

Стратегія вірусного геному спрямована на те, щоб переключити протеїносинтезувальний апарат клітини на продукцію вірусних протеїнів. Це здійснюють вірусоспецифічні ініціювальні фактори (особливі протеїни), які блокують зв'язування клітинних іРНК із рибосомами та стимулюють трансляцію вірусних іРНК.

Геном вірусів тварин кодує синтез від 1 до 100 і більше протеїнів (структурних і неструктурних). Стратегія вірусного геному щодо реалізації генетичної інформації розрахована на *два основні механізми синтезу вірусних протеїнів*.

У ДНК-вмісних і більшості РНК-вмісних вірусів (за винятком плюс-нитчастих) на батьківській матриці синтезуються внаслідок вибіркової транскрипції одного гена короткі моноцистронні* іРНК, кожна з яких несе інформацію про один протеїн. Вони транслюються на рибосомах з утворенням зрілих вірусних протеїнів (рис. 1.10).

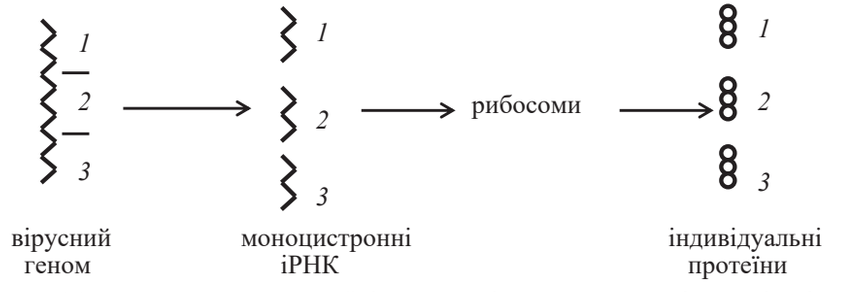


Рис. 1.10. Схема синтезу протеїнів ДНК-вмісних та РНК-вмісних вірусів із негативним геномом і дволанцюговою РНК

(цифрами 1, 2, 3 умовно позначені окремі гени та продукти їхньої експресії)

У РНК-вмісних плюс-нитчастих вірусів віріонна РНК здатна функціонувати як іРНК. Вона транслюється на рибосомах з утворенням гігантського поліпептиду-попередника (поліпротеїну), який потім послідовно нарізується на зрілі функціонально активні протеїни (рис. 1.11).

* *Цистрон* – синонім гена.

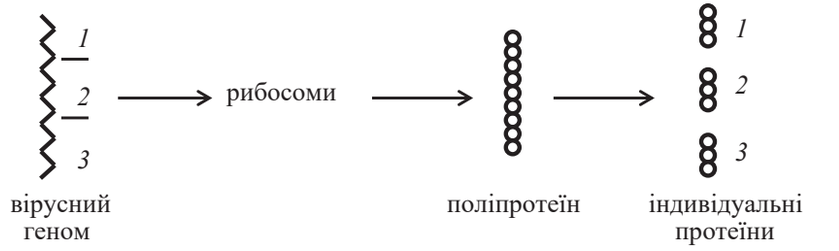


Рис. 1.11. Схема синтезу протеїнів РНК-вмісних вірусів із позитивним геномом

(цифрами 1, 2, 3 умовно позначені окремі гени та продукти їхньої експресії)

За аналогічною схемою синтезуються протеїни *ретровірусів* після транскрипції ДНК-провірусу, інтегрованого з клітинним геномом (рис. 1.12).

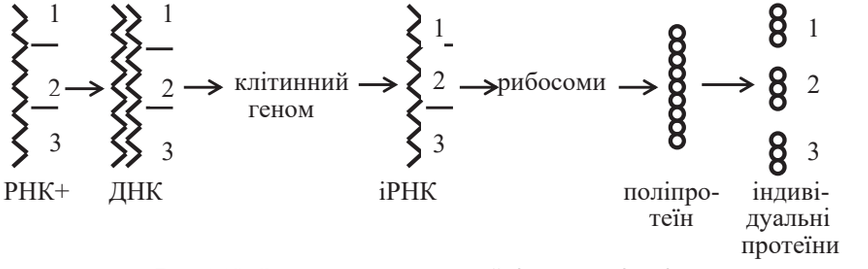


Рис. 1.12. Схема синтезу протеїнів ретровірусів

(цифрами 1, 2, 3 умовно позначені окремі гени та продукти їхньої експресії)

Оскільки довжина вірусних іРНК коливається в широких межах залежно від способу трансляції, розміри *вірусоспецифічних полісом* теж різні: від 3–4 до кількох десятків рибосом на одній нитці іРНК. Великі полісоми формуються в процесі репродукції РНК-вмісних плюс-нитчастих вірусів, у яких індивідуальні протеїни утворюються після нарізання поліпротеїну, наприклад, агрегати з 20–60 рибосом у випадку пікорнавірусів.

Послідовність і кількість синтезованих протеїнів регулюється на рівні транскрипції, а в деяких випадках – і на рівні ініціації трансляції.

Вірусні протеїни зазнають численних *посттрансляційних модифікацій*, які потрібні для експресії їхньої біологічної активності. Це – глікозилювання, сульфування, ацилювання, метилювання, фосфорилювання і протеолітичне нарізання. Зокрема, фосфорилювання геномних протеїнів відіграє регулювальну роль у транскрипції й трансляції вірусних іРНК,

впізнаванні їх рибосомами, а також специфічному впізнаванні синтезованих протеїнів і нуклеїнових кислот на стадії складання віріонів потомства.

Багато вірусних протеїнів (насамперед глікопротеїни) набувають функціональної активності лише після того, як відбудеться їхнє нарізання в специфічних точках. Це потрібно для формування функціонально активних протеїнів прикріплення і злиття, які забезпечують адсорбцію та проникнення вірусу в клітину. Протеолітичне нарізання відбувається зазвичай за участю клітинних протеаз, а в деяких випадках – і вірусоспецифічних.

1.4.6. Реплікація вірусних геномів

Реплікацією називається синтез нуклеїнових кислот – точних копій геному. Реплікацію вірусного геному здійснюють ензими, що характеризуються високою специфічністю: *ДНК-полімераза* (ДНК-залежна ДНК-полімераза) і *репліказа* (РНК-залежна РНК-полімераза). Джерела їх різні. Такі ДНК-вмісні віруси, як папілома-, поліома-, парво-, цирко-, анелло-, смако-, геномо- і редондовіруси використовують клітинну ДНК-полімеразу. Гепаднавіруси мають свою власну ДНК-полімеразу, що входить до складу віріонів. ДНК-полімераза покс-, асфар-, ірідо-, герпес-, аллогерпес- та аденовірусів і репліказа РНК-вмісних плюс-нитчастих вірусів синтезуються на початкових етапах експресії вірусного геному. У вірусів із родин, що входять до порядку *Mononegavirales* (параміксо-, пневмо-, рабдо-, філо-, борна-, н'ямі- і сунвіруси), функцію реплікази виконує віріонна транскриптаза, яка переключається на реплікацію вірусного геному, коли синтез вірусних протеїнів досягає максимального рівня. У РНК-вмісних мінус-нитчастих вірусів із фрагментованим геномом (ортоміксо-, амноон-, арена-, перібун'я-, ханта-, найро- і фенуївіруси) реплікацію здійснюють синтезовані полімеразні протеїни. У РНК-вмісних вірусів із дволанцюговою фрагментованою РНК (рео-, бірна- і пікобірнавіруси) реплікація відбувається за участю новосинтезованої транскриптази, що функціонує як репліказа. У реплікації ретровірусів беруть участь віріонні ензими *зворотна транскриптаза (ревертаза), інтеграза,* а також клітинна транскриптаза.

Реплікація дволанцюгових ДНК. Механізм реплікації вірусних дволанцюгових ДНК подібний до реплікації клітинного геному (рис. 1.13). Для ініціації цього процесу потрібний попередній синтез на матриці ДНК коротких ділянок РНК – *затравок*, або *праймерів*, які потім швидко видаляються з нарощуваної нитки ДНК. Реплікація відбувається на розплетених ділянках ДНК і йде одночасно на обох нитках, на кожній з яких із нуклеотидів клітини будується друга комплементарна нитка (А – Т, Г – Ц). У результаті утворюються дві нові спіралі ДНК, які складаються з батьківського і новосинтезованого ланцюга.

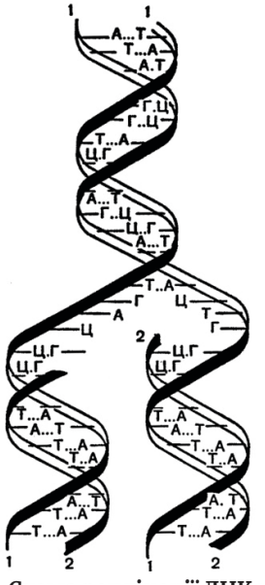


Рис. 1.13. Схема реплікації ДНК клітини
(Букрінська А.Г., 1986)

Реплікацію *покс-*, *асфар-*, *ірідо-*, *герпес-*, *аллогерпес-* та *аденовірусів* здійснює вірусоспецифічний ензим ДНК-полімераза, що синтезується в зараженій клітині. Схема реплікації ДНК цих вірусів представлена на рис. 1.14.

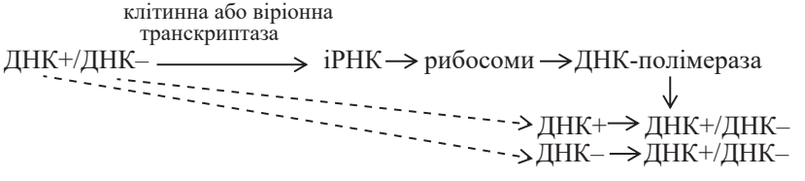


Рис. 1.14. Схема реплікації ДНК-вмісних вірусів із дволанцюговою лінійною ДНК

Для транскрипції геному ірідо-, герпес-, аллогерпес- та аденовіруси використовують клітинну транскриптазу, а покс- та асфарвіруси мають

власну транскриптазу. На одній із ниток ДНК під впливом транскриптази синтезується іРНК*, яка транслюється на рибосомах з утворенням вірусоспецифічної ДНК-полімерази. Далі за участю цього ензиму на кожній із ниток батьківської ДНК будується друга комплементарна нитка. У результаті виникають дві нові молекули дволанцюгової ДНК. Процес реплікації триває до того часу, доки в клітині не накопичиться достатня кількість молекул ДНК, потрібна для численного вірусного потомства.

Дволанцюгова ДНК *поліома-* і *папіломавірусів* – кільцева надспіралізована. Реплікація її відбувається за участю клітинної ДНК-полімерази. Для ініціації цього процесу в поліомавірусів обов'язково потрібний синтез вірусоспецифічного неструктурного протеїну – Т-антигену, який з'являється в зараженій клітині внаслідок ранньої транскрипції під впливом клітинної транскриптази (рис. 1.15). Реплікація поліома- і поліомавірусів відбувається на розкручених ділянках ДНК, проходить одночасно на обох нитках з утворенням дволанцюгових дочірніх молекул (рис. 1.16).

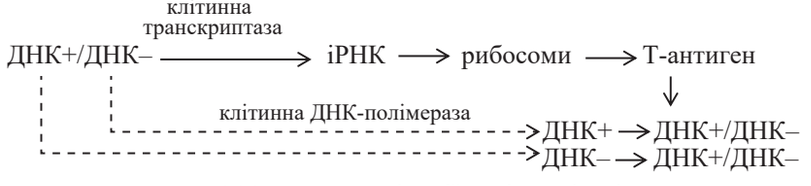


Рис. 1.15. Схема реплікації поліомавірусів

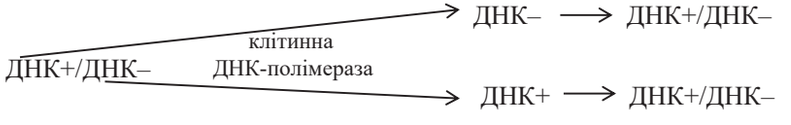


Рис. 1.16. Схема реплікації папіломавірусів

Унікальний механізм реплікації властивий *гепаднавірусам* (рис. 1.17). Дволанцюгова кільцева ДНК гепаднавірусів має дефект плюс-нитки (на 20–50 %), яку добудовує віріонна ДНК-полімераза. Потім під впливом клітинної транскриптази на матриці вірусної ДНК синтезується комплементарна РНК двох типів: іРНК, що кодує вірусні протеїни, і плюс-нитка РНК, яка слугує матрицею для синтезу мінус-нитки ДНК. іРНК транслюється на рибосомах з утворенням *ДНК-полімерази*, що має властивості

* іРНК у вірусів із дволанцюговою ДНК позначається як плюс- і мінус-нитки, оскільки вони синтезуються на обох нитках ДНК.

зворотної транскриптази. За участю цього ензиму відбувається *зворотна транскрипція*, аналогічна механізму реплікації ретровірусів. На матриці плюс-нитки РНК синтезується комплементарна мінус-нитка ДНК, і виникає *гібридна дволанцюгова молекула* – РНК/ДНК. Причому в процесі синтезу ДНК поступово розщеплюється нитка РНК під дією рибонуклеази Н. Далі на матриці мінус-нитки ДНК під впливом новосинтезованої ДНК-полімерази синтезується плюс-нитка ДНК, і в результаті утворюється дволанцюгова ДНК.

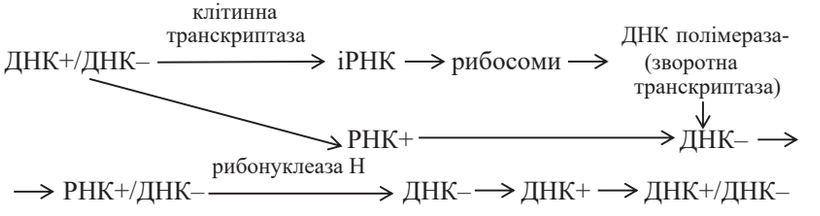


Рис. 1.17. Схема реплікації гепаднавірусів

Реплікація одноланцюгових ДНК. Реплікація одноланцюгових ДНК парво-, цирко-, анелло-, смако-, геномо- і редондовірусів відбувається за участю *клітинної ДНК-полімерази* і дуже залежить від клітинних функцій. Для цього процесу необхідно, щоб заражена клітина знаходилася в S-фазі, коли відбувається реплікація її ДНК. Названі віруси мають мінус-нитчасту ДНК, яка слугує матрицею для синтезу комплементарної плюс-нитки ДНК. У результаті виникає проміжна реплікативна форма – дволанцюгова ДНК. Далі на матриці новосинтезованної плюс-нитки ДНК утворюється багато копій мінус-ниток (рис. 1.18).

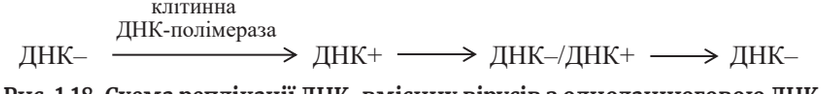


Рис. 1.18. Схема реплікації ДНК-вмісних вірусів з одноланцюговою ДНК

Частина віріонів парвовірусів (1–50 %) може містити ДНК із позитивною полярністю. Реплікація плюс-ниток ДНК відбувається аналогічно з утворенням проміжної реплікативної форми.

Реплікація одноланцюгових РНК. Віруси, що містять одноланцюгову РНК, поділяються на плюс-нитчасті (з позитивним геномом) і мінус-нитчасті (з негативним геномом).

У ***вірусів із позитивним геномом*** (корона-, артері-, тобан-, тога-, флаві-, матона-, оліфо-, пікорна-, каліці-, астро-, гепе- і нодавіруси) віріонна РНК виконує дві функції: іРНК і матриці для реплікації. Після проникнення і депротеїнізації вірусу плюс-нитчаста РНК переносить генетичну інформацію на рибосоми, де відбувається синтез вірусних протеїнів, у тому числі *реплікази*. За участю цього ензиму на матриці віріонної плюс-нитки РНК синтезується комплементарна мінус-нитка. У результаті утворюється проміжна реплікативна форма – дволанцюгова РНК. Далі під впливом реплікази на матриці новосинтезованої мінус-нитки РНК синтезуються плюс-нитки (рис. 1.19).

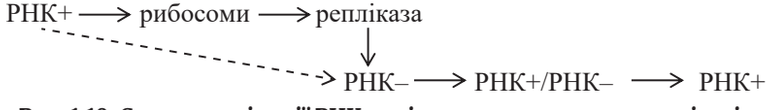


Рис. 1.19. Схема реплікації РНК-вмісних плюс-нитчастих вірусів

Реплікація одноланцюгової фрагментованої РНК нодавірусів відбувається одночасно на двох фрагментах.

У *вірусів із негативним геномом* віріонна РНК функціонує як матриця і для транскрипції, і для реплікації. Проте за транскрипції зчитуються певні ділянки геному, а за реплікації – весь геном. У вірусів із родин, що входять до порядку *Mononegavirales* (параміксо-, пневмо-, рабдо-, філо-, борна-, н'ямі- і сунвіруси), спочатку під впливом вірусного ензиму *транскриптази* на матриці віріонної мінус-нитки РНК синтезуються комплементарні плюс-нитки – моноцистронні іРНК, які транслюються на рибосомах з утворенням вірусних протеїнів. Коли їхня кількість досягає максимального рівня, транскриптаза переключається на реплікацію вірусного геному. За участю цього ензиму на матриці віріонної мінус-нитки РНК синтезується плюс-нитка, яка у свою чергу слугує матрицею для синтезу мінус-ниток РНК (рис. 1.20).

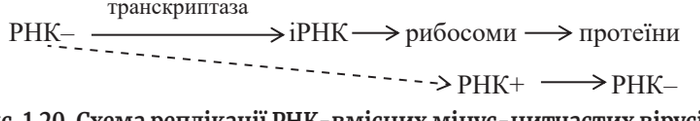


Рис. 1.20. Схема реплікації РНК-вмісних мінус-нитчастих вірусів із родин порядку *Mononegavirales*

Реплікація одноланцюгової фрагментованої РНК відбувається за участю синтезованих *полімеразних протеїнів*, йде одночасно на всіх фрагментах:

6–8 фрагментів у ортоміксовірусів, 10 фрагментів у амноонвірусів, 3 фрагменти в ханта-, найро-, перібун'я- і фенуївірусів і 2 фрагменти в аренавірусів (рис. 1.21).

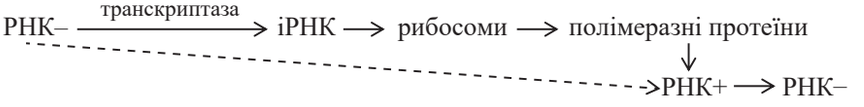


Рис. 1.21. Схема реплікації РНК-вмісних мінус-нитчастих вірусів із фрагментованим геномом

Реплікація дволанцюгових РНК. На матриці дволанцюгової РНК під впливом віріонного ензиму *транскриптази* транскрибується лише мінус-нитка. У результаті синтезуються комплементарні плюс-нитки РНК, які виконують дві функції. Частина з них функціонує як іРНК, транслюючись на рибосомах з утворенням вірусних протеїнів, у тому числі транскриптази. Друга частина плюс-ниток РНК слугує матрицею для синтезу комплементарних мінус-ниток за участю новосинтезованої транскриптази (що функціонує як репліказа), внаслідок чого виникають молекули дволанцюгової РНК (рис. 1.22).

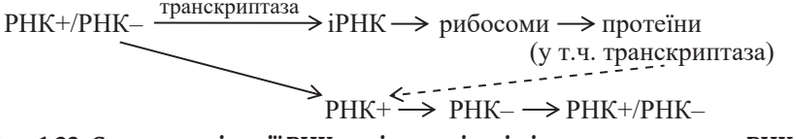


Рис. 1.22. Схема реплікації РНК-вмісних вірусів із дволанцюговою РНК

Вірусна дволанцюгова РНК є фрагментованою (10–12 фрагментів у реовірусів, 2 фрагменти в бірна- і пікобірнавірусів), тому транскрипція та реплікація відбуваються одночасно на всіх фрагментах.

Реплікація ретровірусів. Ретровіруси – єдині віруси, геном яких диплоїдний: представлений двома ідентичними молекулами одноланцюгової плюс-нитчастої РНК. У складі ретровірусів міститься унікальний ензим – *зворотна транскриптаза*, або *ревертаза*, що має три ензимні властивості. Цей ензим функціонує як РНК-залежна ДНК-полімераза, ДНК-залежна ДНК-полімераза і рибонуклеаза Н. Ретровіруси мають також ензим *інтегразу*.

Обов'язковою стадією репродукції ретровірусів є інтеграція їхнього геному з клітинним. Для цього потрібно перетворити вірусний РНК-геном у комплементарну ДНК-копію, що відбувається за участю ревертази. Затравкою для транскрипції слугує клітинна тРНК, яка знаходиться в складі

віріона і специфічна для конкретного вірусу. Під впливом ревертази на матриці плюс-нитки РНК синтезується комплементарна їй мінус-нитка ДНК. У результаті виникає *гібридна дволанцюгова молекула* – РНК/ДНК, причому в процесі синтезу ДНК рибонуклеза Н гідролізує РНК у гібридній молекулі. Далі на матриці мінус-нитки ДНК, що залишилася після розщеплення РНК, ревертаза синтезує комплементарну плюс-нитку ДНК. У результаті утворюється дволанцюгова ДНК, яка повністю переписала генетичну інформацію з вірусного РНК-геному. Ця ДНК-копія називається *провірусом* (син.: *провірусна ДНК, ДНК-провірус*). Після замикання в кільце провірус інтегрує з клітинним геномом за участю інтегрази. Якщо відбувається експресія, інтегрований ДНК-провірус слугує матрицею для транскрипції під впливом клітинної транскриптази, причому генетична інформація переписується з мінус-нитки ДНК. У результаті синтезуються плюс-нитки РНК, які включаються до складу віріонів потомства (рис. 1.23).

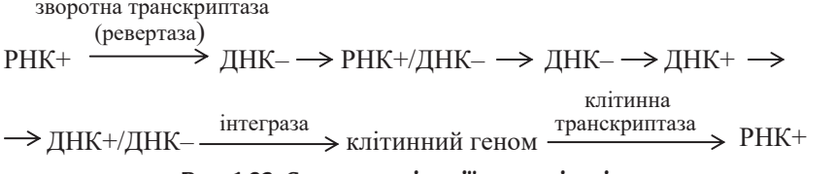


Рис. 1.23. Схема реплікації ретровірусів

1.4.7. Формування і вихід віріонів із клітини

У заражених клітинах синтез вірусних компонентів роз'єднаний і відбувається в різних структурах ядра й цитоплазми. Наприклад, у герпесвірусів молекули ДНК синтезуються в ядрі, протеїни – в цитоплазмі на рибосомах, а складання віріонів відбувається на ядерній мембрані. За такого диз'юнктивного способу репродукції формування віріонів потомства можливе лише в тому разі, якщо синтезовані вірусні компоненти мають властивість впізнавати один одного серед різноманітності клітинних протеїнів і нуклеїнових кислот та самовільно з'єднуватися.

Отже, в основі формування віріонів потомства лежить ***процес самоскладання***, який полягає у *високоспецифічній взаємодії молекул вірусних протеїнів і нуклеїнової кислоти.* Специфічне протеїново-нуклеїнове і протеїн-протеїнове впізнавання відбувається за рахунок виникнення гідрофобних, сольових і водневих зв'язків, а також стеричної комплементарності. *Яким чином вірусні протеїнии впізнають нуклеїнову кислоту?* У некодувальній частині

вірусного геному міститься невелика ділянка з унікальними послідовностями нуклеотидів. Саме з впізнавання цієї ділянки капсидними протеїнами починається процес складання віріона. Об'єднання вірусних протеїнів із нуклеїновою кислотою відбувається спонтанно як чисто фізико-хімічна реакція агрегації, що потребує участі додаткових факторів (pH, іонної сили, осмосу тощо).

Загальні принципи формування віріонів

1. У просто організованих вірусів спочатку формуються *провіріони*, що внаслідок модифікацій протеїнів перетворюються у віріони, причому складання ДНК-вмісних вірусів відбувається в ядрі, а РНК-вмісних – у цитоплазмі заражених клітин. У складно організованих вірусів спочатку формуються *нуклеокапсиди* або *серцевини*, з якими взаємодіють суперкапсидні протеїни.

2. Формування вірусів із суперкапсидною оболонкою (за винятком покс- і гепаднавірусів) відбувається на *клітинних мембранах:* ядерній, якщо вірус реплікується в ядрі, або плазматичній, ендоплазматичної сітки чи комплексу Гольджі, якщо вірус реплікується в цитоплазмі. До цих мембран транспортуються незалежно один від одного всі компоненти віріона. Суперкапсидна оболонка вірусів формується з фрагментів клітинних мембран (модифікованих за рахунок включення вірусних глікопротеїнів) на стадії виходу віріонів потомства з клітини шляхом брунькування.

3. Деякі складно організовані віруси (зокрема РНК-вмісні мінус-нитчасті параміксо-, рабдо-, борна- та ортоміксовіруси) мають *матриксний*, або *мембранний, протеїн (М-протеїн)*. Він є медіатором складання віріонів: виконує посередницьку функцію між суперкапсидною оболонкою та нуклеокапсидом, утворюючи разом з ним серцевину. М-білок мають також РНК-вмісні плюс-нитчасті корона- і ретровіруси.

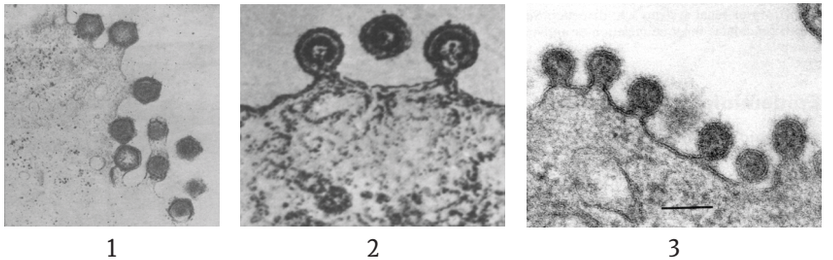
4. Формування нуклеокапсидів, серцевин, провіріонів і віріонів відбувається в спеціальних структурах, що називаються *вірусні «фабрики»*, *тільця-включення.* Ці структури локалізуються в ядрі або цитоплазмі інфікованих клітин і є продуктами кооперативних процесів клітини та вірусу. Зазвичай, це місця синтезу вірусних компонентів і формування віріонів потомства. У вірусних «фабриках» виявляють різні клітинні структури – рибосоми (полісоми), мембрани, мікротрубочки, осміофільні волокна та ін.

5. Складно організовані віруси (іноді просто організовані) для побудови своїх віріонів використовують *матеріал клітини-хазяїна*, наприклад, ліпіди, вуглеводи, протеїнкінази, гістони, актин, тРНК (у ретровірусів), рибосоми (в аренавірусів). Клітинні елементи виконують певні функції в складі віріона, хоч у деяких випадках вони є результатом випадкової контамінації.

Завершальною стадією репродукції вірусів, що тісно пов'язана з формуванням зрілих вірусних часток, є вихід віріонів потомства з клітини. Це здійснюється *двома шляхами*: вибухом і брунькуванням. У деяких вірусів брунькування поєднується з екзоцитозом.

Вибухоподібний механізм звільнення віріонів пов'язаний із деструкцією (лізисом) зараженої клітини, внаслідок чого вірусне потомство опиняється в позаклітинному просторі. Такий спосіб виходу властивий просто організованим вірусам, які дозрівають та набувають інфекційної активності всередині клітини. Пригнічення метаболізму макромолекул (зниження синтезу клітинних нуклеїнових кислот і протеїнів) та наступна деструкція зараженої клітини здійснюється неструктурними протеїнами цих вірусів.

Вихід із клітини ***брунькуванням*** *через плазматичну мембрану* властивий більшості складно організованих вірусів. При цьому сформовані нуклеокапсиди (або серцевини) зв'язуються із суперкапсидними протеїнами, включеними в плазмолему. Це призводить до випинання ділянок плазмолеми та утворення «бруньки», що поступово відокремлюється від клітини з формуванням зрілого віріона. Такий механізм поєднує формування зрілих віріонів з одночасним звільненням їх із клітини (рис. 1.24). Це найефективніший спосіб виходу, оскільки не залежить від деструкції зараженої клітини. При цьому клітина може тривалий час зберігати життєздатність і продукувати вірусне потомство, доки не відбудеться повне виснаження її ресурсів.



1 2 3

Рис. 1.24. Вихід віріонів із клітини брунькуванням через плазмолему:
1 – вірус африканської чуми свиней; 2 – вірус лейкозу мишей; 3 – вірус грипу А
(Феннер Ф. та ін., 1977; https://medread.ru/patogeneticheskaya-mikrobiologiya-3/34/)

Деяким РНК-геномним вірусам властиве брунькування *через мембрани ендоплазматичної сітки* і *комплексу Гольджі* всередину цитоплазматичних вакуолей. Такі віруси (перібун'я-, ханта-, найро-, фенуї-, корона-, артеріта флавіруси) звільняються із зараженої клітини ***шляхом екзоцитозу:*** вакуолі зливаються з плазмолемою, а віріони потомства опиняються в позаклітинному просторі. За допомогою екзоцитозу виходять із клітини ДНК-вмісні герпесвіруси, які брунькуються *через ядерну мембрану* і транспортуються до поверхні клітини в мембранних везикулах. Аллогерпесвіруси брунькуються через ядерну мембрану й остаточно – через мембрани комплексу Гольджі та виходять із клітини шляхом екзоцитозу. Гепаднавіруси брунькуються через мембрани ендоплазматичної сітки та виходять із клітини шляхом екзоцитозу. Звільнення з клітини механізмом екзоцитозу властиве також поксвірусам, які транспортуються в чохлах, сформованих із мембран комплексу Гольджі.

Деякі віруси здатні виходити з клітини та уражати сусідні, обминаючи позаклітинний простір, що дає змогу їм уникати нетралізувальної дії специфічних антитіл. Наприклад, герпесвіруси можуть проникати з однієї клітини в іншу по цистернах ендоплазматичної сітки, які з'єднують ядерну мембрану з плазмолемою.

Тривалість циклу репродукції вірусів – від моменту адсорбції до виходу з клітини – різна. Так, у пікорнавірусів цей процес триває 5–10 год, в ортоміксовірусів – 6–8 год, у реовірусів – 8–10 год, в аденовірусів – 14–24 год, у герпесвірусів – від 12 год до 70 год і більше. *Швидкість* репродукції вірусів колосальна. Наприклад, кількість інфекційного потомства одного віріона вірусу грипу через 8 год досягає 10^3, а до кінця першої доби – 10^{27}. *Урожай вірусу*, тобто загальна кількість віріонів на одну заражену клітину, коливається в широких межах. Зокрема, в пікорнавірусів цей показник становить 25 тис.– 100 тис., у аденовірусів – 10 тис.– 1 млн.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Які особливості репродукції вірусів? **2.** Назвіть етапи і стадії репродукції вірусів. **3.** Охарактеризуйте механізм адсорбції вірусу на плазмолемі клітини. **4.** Якими шляхами відбувається проникнення вірусу всередину клітини? **5.** У чому полягає депротеїнізація вірусу? **6.** Як здійснюється реалізація генетичної інформації у ДНК- і РНК-вмісних вірусів? **7.** Назвіть основні механізми синтезу вірусних протеїнів. **8.** У чому полягають посттрансляційні модифікації вірусних протеїнів? **9.** Як здійснюється реплікація вірусних нуклеїнових кислот? **10.** Які езими беруть участь у транскрипції та реплікації вірусних геномів? **11.** Як здійснюється вихід віріонів потомства з клітини?

ТЕМА 1.5. ПОПУЛЯЦІЙНА ГЕНЕТИКА ВІРУСІВ

1.5.1. Структурна організація вірусного геному

Вірусам, як і клітинним формам життя, притаманні *спадковість* та *мінливість.* Дослідженням саме цих властивостей займається ***генетика вірусів.*** Зміст і специфіка цього наукового розділу визначається біологічними особливостями вірусів, з яких найважливішими є відносна простота організації, надзвичайна різноманітність генетичного матеріалу і популяційна структура.

Вірус, який репродукується в організмі хазяїна або *in vitro*, в біологічному розумінні є не механічним скупченням віріонів, а певною спілкою з ознаками і властивостями популяції. У вірусів *популяційний рівень* знаходиться вище рівня організації індивідуальної вірусної частки. Тому центральним об'єктом генетичного дослідження вірусів здебільшого є не окремий віріон і його геном, а величезна за чисельністю вірусна популяція та генетичні явища, що відбуваються в ній. Еволюція, гомеостаз, регуляція чисельності та інші важливі процеси, що відбуваються у вірусних популяціях, здійснюються на основі біологічних і генетичних законів. Ці закони вивчає спеціальний розділ генетики вірусів – ***популяційна генетика.***

Генетичний апарат вірусів, на відміну від клітинного геному, надзвичайно різноманітний. Він представлений як ***ДНК***, так і ***РНК***, які бувають *одно- і дволанцюговими, лінійними, фрагментованими і кільцевими, плюс-нитчастими і мінус-нитчастими* (детальну характеристику вірусних нуклеїнових кислот наведено в підпункті 1.2.2. «Хімічний склад вірусів», див. с. 41). Геном вірусів тварин ***гаплоїдний.*** Виняток становлять *ретровіруси*, які мають *диплоїдний геном*, представлений двома ідентичними молекулами одноланцюгової плюс-нитчастої РНК, що з'єднані між собою водневими зв'язками.

У спадковому апараті вірусів, як і в клітинних організмів, використовується ***триплетний генетичний код.*** Це означає, що три нуклеотиди в одноланцюгових молекулах або три пари нуклеотидів у дволанцюгових молекулах нуклеїнової кислоти утворюють *триплет (кодон)* і кодують одну амінокислоту. А 1500 нуклеотидів чи їхніх пар кодують вірусний поліпептид середньої величини, який складається з 500 амінокислот і має молекулярну масу 50 кДа.

Кодувальна здатність вірусного геному визначається його молекулярною масою, яка коливається в межах 1,5–250 МДа для ДНК і 2,4–20 МДа для РНК.

Найдосконалішим генетичним матеріалом у вірусів є *дволанцюгова ДНК*. Подвійний запис генетичного коду забезпечує глибокий консерватизм спадковості та створює передумови для збереження основних видових властивостей. Окрім того, ланцюги ДНК характеризуються високою міцністю й утворюють відносно великі молекули, які вміщують більше генетичної інформації порівняно з РНК.

Максимальні розміри молекули РНК обмежені відносно низькою фізичною та хімічною стабільністю, а також механізмом взаємодії з рибосомами. Збільшення ємності геному РНК-вмісних вірусів еволюційно йшло не за рахунок зростання розмірів молекули РНК, а завдяки структурним змінам. Результатом цього процесу є *фрагментована будова* і відносно більша кодувальна здатність геному ортоміксо-, арена-, ханта-, найро-, перібун'я-, фенуї-, амноон-, рео-, бірна- і пікобірнавірусів. Перевага фрагментованого геному полягає в тому, що в кількох фрагментах РНК, кожен з яких не досягає критичного розміру, міститься такий об'єм спадкової інформації, збереження якої не може забезпечити ціла молекула РНК. Окрім того, наявність фрагментів створює передумови для здійснення рекомбінацій, в основі яких лежить обмін великими блоками спадкового матеріалу. Цей унікальний механізм слугує для РНК-вмісних вірусів із фрагментованим геномом могутнім джерелом спадкової мінливості.

Ген у вірусів – це одиниця структурної та функціональної спадковості, яка представляє собою ділянку ДНК або РНК, що кодує, як правило, один протеїн. Продуктами генів є структурні й неструктурні вірусні протеїни, в тому числі ензими, які входять до складу віріона або утворюються в зараженій клітині та беруть участь в інфекційному циклі.

Сукупність усіх генів вірусу називається ***геномом***. Незважаючи на те, що вірусний геном за молекулярною масою в 10^5 – 10^6 разів менший від клітинної ДНК, він успішно конкурує та примушує клітину функціонувати за генетичною програмою вірусу.

Кількість генів у ДНК-вмісних вірусів коливається від 3 до 160, а у РНК-вмісних – від 5 до 15. У вірусів із фрагментованим геномом кожний фрагмент представляє собою один ген.

У багатьох вірусів існують спеціальні механізми, які дають змогу отримати розгорнуту генетичну інформацію за максимальної економії спадкового матеріалу. Такі механізми виробилися в процесі еволюції вірусів як генетичних паразитів. У вірусів порушується класичний принцип «один ген – одна молекула РНК – один протеїн», і один вірусний ген може

кодувати два протеїни. Наприклад, геном вірусу грипу А представлений одноланцюговою мінус-нитчастою фрагментованою РНК, яка містить 8 генів, із них 7-й і 8-й гени кодують по два протеїни.

Механізми збільшення генетичної інформації у вірусів різноманітні. Це, зокрема, зрушення рамки трансляції на 1–2 нуклеотиди, внаслідок чого утворюються нові триплети, з'являється новий генетичний код і синтезуються протеїни з унікальними амінокислотними послідовностями.

У генах закодована інформація про всі властивості вірусів, які називаються ***генетичними ознаками***. Вони поділяються на групові, видові, внутрішньовидові та внутрішньоштамові.

Основними є *групові й видові ознаки,* до яких належать: 1) тип нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК), її структура; 2) розміри і морфологія віріона; 3) тип симетрії капсиду, кількість капсомерів; 4) антигенна специфічність; 5) стійкість до органічних розчинників і детергентів; 6) наявність нейрамінідази та антигенів клітини-хазяїна; 7) гемаглютинувальні властивості; 8) патогенність для тварин певного виду, курячих ембріонів, цитопатичний ефект у відповідній культурі клітин.

Сукупність генетичних ознак (або генетичної інформації) вірусу називається ***генотипом***. Він визначається структурою спадкового матеріалу – ДНК або РНК, тобто послідовністю нуклеотидів у молекулі нуклеїнової кислоти. Генотип є постійною властивістю вірусу, проте він може змінюватися внаслідок мутацій, що відбуваються в геномі.

Сукупність генетичних ознак вірусу, які проявляються в конкретних умовах навколишнього середовища, називається ***фенотипом***. Фенотип не є постійною властивістю вірусу, він може змінюватися як у процесі репродукції вірусу, так і внаслідок мутацій. Наприклад, *патогенність* – це генетична ознака вірусу, а фенотиповим її проявом є *вірулентність* – ступінь патогенності. Ця ознака значно варіює в різних біологічних системах, що залежить від особливостей штаму вірусу і методу його підтримання в лабораторних умовах. Так, вірус жовтої гарячки пантропний і високовірулентний для людини й мавп, але за серійних пасажів у ЦНС білих мишей стає нейротропним і непатогенним для природних хазяїв.

1.5.2. Характеристика популяційної структури вірусів

Центральним об'єктом генетичного дослідження вірусів є ***вірусна популяція***. Це вірус певного виду, що репродукується в природній або експериментальній чутливій біологічній системі, проходить у ній значну кількість

генерацій, упродовж яких між окремими віріонами відбуваються генетичні й негенетичні взаємодії.

Вірусні популяції є важливою ланкою в структурі виду і виконують роль основних одиниць еволюції. Вони характеризуються високою *генетичною неоднорідністю*. Треба розрізняти такі поняття, як *штам, серотип, варіант, мутант, клон*. Усі ці терміни в загальному означають вірус, який генотипово відрізняється від батьківського дикого типу (природного ізоляту), що представляє природну вірусну популяцію.

Штам – це вірус, виділений із природної вірусної популяції від заражених хазяїв або об'єктів навколишнього середовища. Фактично штамами називають різні дикі типи одного виду вірусу, які адаптовані до лабораторних умов. Наприклад, штами ліссавірусу сказу fixe, Flüri-Hep, ERA, CVS, штами пестівірусу А і В (збудників вірусної діареї ВРХ) Oregon C 24V, NADL, Singer.

Серотип – це вірус того самого виду, що відрізняється за нейтралізацією інфекційної активності. Наприклад, вірус блутанга має 24 серотипи, вірус африканської чуми коней – 9, вірус ящуру – 7. Серотипи вірусів визначають у РН.

Варіант – це вірус, який відрізняється від дикого типу за фенотиповими ознаками, але разом з тим генотипова основа цієї відмінності невідома. Наприклад, варіанти вірусу з нейтралізації імунними сироватками.

Мутант відрізняється від дикого типу за відомими генетичними ознаками.

Клон – це вірус, популяція якого походить від одного віріона і є сукупністю генетично однорідних вірусних часток.

Природні вірусні популяції можуть добре адаптуватися до зовнішніх умов і за постійності середовища залишатися стабільними впродовж тривалого часу. Проте у разі зміни факторів довкілля передумовою існування вірусної популяції є не збереження її в незмінному вигляді, а перебудова спадкової структури, що забезпечує пристосування до нового середовища. Ця перебудова може здійснюватися лише за наявності в популяції запасу генетичної мінливості генотипово різних варіантів.

Генетичний склад вірусної популяції називається ***генофондом***. Іншими словами, *генофонд вірусної популяції* – це сукупність усіх генів, які є у віріонах, що складають конкретну популяцію. Генофонд, так само як і вірусний геном, пристосований для виконання певних життєвих функцій. Спадкова інформація, що міститься в геномі, забезпечує відтворення вірусу, а генотипова різноманітність генофонду дає змогу вірусам пристосовуватися і виживати в мінливих умовах навколишнього середовища.

1.5.3. Механізми спадкової мінливості вірусів

Віруси змінюють свої властивості як у природних, так і в експериментальних умовах, причому мінливість у них виражена значно інтенсивніше, ніж в інших організмів. Це пов'язано з надзвичайно коротким життєвим циклом вірусів порівняно з їхніми хребетними хазяями і колосальною чисельністю вірусних популяцій.

В основі спадкової мінливості вірусів лежать такі *процеси:* 1) мутації; 2) рекомбінації; 3) включення у вірусний геном клітинних генів; 4) потік генів. Саме з цих джерел створюється і поповнюється генофонд вірусних популяцій.

Перед тим як розглядати процеси, що лежать в основі спадкової мінливості вірусів, треба зупинитися на ***модифікаціях***. Це фенотипові зміни у вірусів, які зумовлені клітиною-хазяїном і не передаються за спадковістю. Модифікації можуть бути зумовлені включенням до складу віріонів потомства *компонентів клітини*, наприклад, ліпідів на кінцевій стадії репродукції вірусу, коли формується суперкапсидна оболонка. Вміст вуглеводів у складі віріонів визначається клітинними ензимами, що здійснюють глікозилювання вірусних протеїнів. Зовнішня ліпопротеїнова оболонка вірусу може містити клітинні протеїни, що змінює антигенні властивості збудника. При переміні клітини-хазяїна змінюється і вміст клітинних компонентів у складі віріонів потомства.

Модифікації лежать в основі адаптації вірусу до нового хазяїна і подолання залежного від нього обмеження. Модифіковані віруси набувають здатності більш ефективно заражати клітини, аналогічні тим, в яких вони модифікувалися. Отже, клітина-хазяїн може істотно впливати на фенотип вірусу.

Мутації – це спадкові зміни у вірусів, які полягають у порушенні генетичного коду. *Молекулярні механізми* мутацій різноманітні. Можливі заміни, випадіння (делеції), вставки і перестановки нуклеотидів або їхніх пар в одно- і дволанцюгових молекулах нуклеїнової кислоти. Ці порушення можуть обмежуватися окремими нуклеотидами або охоплювати значні ділянки вірусного геному.

Розрізняють *спонтанні* та *індуковані* мутації. Спонтанні мутації виникають у природі під дією на генетичний матеріал вірусів різних природних мутагенних факторів, а індуковані – з'являються в експерименті. Конкретні причини спонтанних мутацій частіше всього залишаються нез'ясованими.

Деякі віруси дають значну частину мутантів при пасажуванні в біологічних об'єктах за відсутності будь-яких відомих мутагенів. Ці спонтанні мутації накопичуються в геномах вірусів і призводять до фенотипової мінливості, яка є об'єктом селективного тиску в ході еволюції вірусу. Частота спонтанного мутагенезу особливо висока у РНК-геномах і становить 10^{-3} – 10^{-4} на кожний включений нуклеотид, тоді як у ДНК-вмісних вірусів – 10^{-8} – 10^{-11}. Це зумовлено відносно низькою точністю реплікації РНК, що пов'язано, очевидно, з відсутністю в репліказ коригувальної активності, яка властива ДНК-полімеразам.

При класифікації мутацій використовують два різні підходи: 1) за зміною генотипу; 2) за зміною фенотипу.

За *зміною генотипу* мутації поділяються на *генні (крапкові)*, що локалізуються в індивідуальних генах, і *делеційні*, які займають значні ділянки вірусного геному.

До генних мутантів належать *температурочутливі мутанти* (*ts-мутанти*, від англ. temperature sensitive), які втратили здатність розмножуватися за підвищеної температури (38–41 °С), але репродукуються при звичайних умовах культивування (36–37 °С). Існують *холодові мутанти* вірусу грипу А, які не розмножуються при 37 °С, а лише при 32–34 °С, що дає змогу використовувати їх у ролі живих вакцин. Є *термостабільні мутанти*, які здатні репродукуватися при 41°С і характеризуються високою вірулентністю.

У природних умовах крапковими мутаціями генів Н і N зумовлений *антигенний дрейф* вірусу грипу А, який полягає в поступовій зміні поверхневих антигенів, що призводить до появи епідемічних штамів збудника.

Делеційні мутанти представлені *дефектними інтерферувальними частками (ДІ-частками)*. Вони утворюються у вірусних популяціях спонтанно за високої множинності зараження. Втрата ДІ-частками значних ділянок геному (іноді до 90 % і більше) призводить до летального ефекту, що виражається в нездатності їх до репродукції. Відтворення ДІ-часток здійснюється за допомогою функцій, які кодуються геномом інфекційного вірусу. ДІ-частки інтерферують з інфекційним вірусом і гальмують його розмноження, використовуючи продукти його генів, зокрема полімеразу. ДІ-частки можуть контамінувати вірусні препарати і здійснювати негативний вплив на біологічну активність вірусу.

При класифікації мутацій за *зміною фенотипу* вказують на генетичну ознаку, фенотиповий прояв якої змінюється внаслідок мутації, або на порушену функцію вірусу. За зміною фенотипу основними є мутації за такими *ознаками:* 1) морфологія бляшок у культурі клітин; 2) термочутливість

циклу репродукції; 3) стійкість до прогрівання; 4) стійкість до інгібіторів репродукції; 5) спектр патогенності.

Більшість мутантів, які виділені в процесі дослідження вірусів тварин, отримано з популяції дикого типу внаслідок обробки *мутагенами.* За механізмом дії вони поділяються на *дві основні групи*: 1) мутагени, які впливають на нуклеїнову кислоту в складі віріона (азотиста кислота, гідроксиламін, алкілувальні сполуки); 2) мутагени, які взаємодіють із нуклеїновою кислотою в процесі її реплікації (аналоги основ, інтеркалувальні речовини, УФ-промені).

Не всі мутації, що виникли під дією мутагену, однаково стабільні. Більшості індукованих мутацій властива здатність повернення до дикого типу – *реверсії.* Можливі *справжні реверсії*, коли зворотна мутація відбувається в місці первинного пошкодження, і *псевдореверсії*, коли зворотна мутація відбувається в іншій ділянці дефектного гена або в іншому гені.

Кожна мутація має характерну частоту реверсій. Наприклад, мутанти, отримані під впливом УФ-променів, дають близько 20 % реверсій, а при дії профлавіну всі мутанти генетично стабільні, що залежить від ступеня пошкодження генетичного апарату вірусу. УФ-промені зумовлюють переважно заміну азотистих основ у молекулі вірусної нуклеїнової кислоти, а профлавін – їхні делеції або вставки.

При отриманні мутантів із заданими властивостями, наприклад, вакцинних вірусних штамів, треба рахуватися з можливою їхньою реверсією до дикого типу. В цьому разі доцільно використовувати мутагени, які зумовлюють глибокі зміни генетичного коду (делеції або вставки азотистих основ), оскільки такі мутанти мають стабільні спадкові властивості.

Мутації можуть мати різні *наслідки.* В одних випадках вони призводять до *зміни фенотипу* в нормальних умовах. Наприклад, змінюється розмір бляшок у культурі клітин, нейровірулентність для певного виду тварин, чутливість до хіміотерапевтичних препаратів. Мутації є *летальними*, якщо внаслідок них порушується синтез або функція життєво важливого вірусного протеїну, наприклад, вірусної полімерази. Іноді мутації є *умовно летальними* (ts-мутації), оскільки вірусний протеїн зберігає свої функції в оптимальних для нього умовах і втрачає цю здатність у нерозв'язних умовах.

Отже, внаслідок мутацій окремі віріони набувають нових властивостей. Мутовані гени постійно включаються в генофонд вірусної популяції та збільшують її генетичну неоднорідність. Подальша доля вірусів-мутантів залежить від природного добору, який зберігає популяцію, найбільш пристосовану до конкретних умов існування.

Рекомбінації – це обмін генетичним матеріалом, що відбувається між батьківськими вірусами в процесі змішаної інфекції. Можливий обмін як повними генами *(міжгенна рекомбінація)*, так і ділянками одного і того самого гена *(внутрішньогенна рекомбінація)*. Утворений вірус-рекомбінант має властивості, успадковані від різних батьків.

Рекомбінації описані в багатьох родин ДНК-вмісних вірусів (зокрема покс-, герпес-, адено- і поліомавіруси), а також у РНК-вмісних вірусів із фрагментованим геномом і деяких із лінійною РНК (зокрема ретровіруси). В основі рекомбінацій лежать *три основні механізми*, що залежать від структурної організації вірусного геному.

У ДНК-вмісних вірусів рекомбінація включає розрив та возз'єднання ковалентного зв'язку в нуклеїновій кислоті з утворенням дочірніх віріонів небатьківського типу *(внутрішньомолекулярна рекомбінація)*. У цьому процесі беруть участь ензими клітини-хазяїна і, можливо, вірусіндуковані ензими. Для ДНК-вмісних вірусів (за винятком поліомавірусів) характерна висока частота рекомбінацій – від 14 до 38 %.

Унікальний механізм рекомбінації властивий РНК-вмісним вірусам із фрагментованим геномом (ортоміксо-, амноон-, арена-, ханта-, найро-, перібунья-, фенуі- та реовіруси). Він полягає в обміні фрагментами геному між партнерами, при цьому ковалентні зв'язки в нуклеїновій кислоті не розриваються. Такий механізм рекомбінації називається *пересортуванням генів (реасортацією)*. Наслідком цього є обмін великими блоками спадкового матеріалу, що спричинює значну зміну властивостей вірусу. Наприклад, вірус грипу А може отримати в результаті рекомбінації нові підтипи H і N, що зумовлює антигенний шифт і призводить до виникнення пандемічних штамів. Частота рекомбінацій для РНК-вмісних вірусів із фрагментованим геномом становить від 18 до 50 %.

Механізм рекомбінації у РНК-вмісних ретровірусів полягає в обміні не генетичним матеріалом, а спадковою інформацією *(механізм вибіркового копіювання зі зміною матриці)*. Геном ретровірусів диплоїдний, утворений двома ідентичними плюс-нитками РНК і підлягає зворотній транскрипції. У ході цього процесу ревертаза може «перескакувати» з однієї нитки РНК на іншу, утворюючи гібридну матрицю ДНК. Якщо обидві молекули РНК ідентичні, це не призводить до наслідків. Однак за наявності вірусів-мутантів, які несуть різні молекули РНК, можлива поява рекомбінантів з іншими геномами. Подібний механізм опосередковує генетичну нестабільність у вірусу імунодефіциту людини. Для ретровірусів характерна висока частота рекомбінацій – 10–50 %.

Отже, рекомбінації призводять до утворення у вірусній популяції нових генотипів за рахунок перерозподілу вже існуючих генів.

Включення у вірусний геном клітинних генів. Це слугує джерелом спадкової мінливості в онкогенних РНК-вмісних ретровірусів, які на певній стадії репродукції вбудовують ДНК-копію геному в генетичний апарат клітини. При цьому в провірусну ДНК можуть включитися клітинні гени шляхом рекомбінації. Подальша транскрипція інтегрованого ДНК-провірусу призводить до появи у вірусному геномі клітинних генів, які підпадають під контроль вірусних регуляторних механізмів. Ці гени не потрібні для репродукції ретровірусів, але продукти їхньої експресії спричинюють трансформацію клітин, зумовлюючи таким чином онкогенні властивості вірусів. Тому ці гени називаються *трансформувальними генами (онкогенами)*, а їхні клітинні аналоги – *протоонкогенами*, які присутні в геномі кожної нормальної клітини та беруть участь у регуляції клітинного поділу і диференціації. У складі ретровірусів виявлено до 35 онкогенів клітинного походження.

Потік генів – це природні процеси зміщення вірусних популяцій, які призводять до порушення ізоляції та спричинюють одно- або двосторонній обмін генами. Внаслідок цього відбувається збільшення запасів спадкової мінливості конкретної вірусної популяції за рахунок надходження генів з іншого генофонду.

Стан ізоляції вірусної популяції, що створюється в організмі хазяїна і може тривати при наступному передаванні збудника, порушується за *двох обставин*: 1) повторне зараження організму; 2) змішування вірусу, який виділяється від різних хазяїв, у навколишньому середовищі та зараженні нових індивідів. Ці явища постійно відбуваються при циркуляції вірусів у епізоотичних (епідемічних) вогнищах інфекції та відіграють істотну роль у мінливості збудників.

1.5.4. Генетичні та негенетичні взаємодії вірусів

У природних та експериментальних умовах клітини можуть заражатися не одним віріоном, а багатьма віріонами одного штаму вірусу, генетично різними штамами і навіть неспорідненими вірусами. У процесі такої змішаної інфекції виникають різні форми взаємодій між вірусними геномами або продуктами генів. Між вірусними геномами можуть спостерігатися такі форми *генетичних взаємодій*, як рекомбінація, генетична реактивація, гетерозиготність. На рівні генних продуктів виникають *негенетичні взаємодії:*

комплементація, фенотипове змішування, інтерференція. Негенетичні взаємодії часто призводять до фенотипового маскування вірусного генотипу.

Рекомбінація детально висвітлена в підпункті 1.5.3. «Механізми спадкової мінливості вірусів» (див. с. 82). Нагадаємо, що це обмін генетичним матеріалом між батьківськими вірусами, внаслідок чого утворюється потомство з властивостями, успадкованими від обох батьків.

Генетична реактивація є окремим випадком рекомбінації, коли один або обидва партнери неінфекційні внаслідок пошкодження геному, але за змішаної інфекції дають повноцінне потомство з ознаками обох батьків. Це потомство є рекомбінантами, в яких інактивувальні пошкодження геному неінфекційного батьківського вірусу еліміновані. Розрізняють множинну і перехресну реактивації.

Множинна реактивація виникає між неінфекційними партнерами, коли клітина заражається кількома віріонами з пошкодженими геномами. Якщо інактивувальні пошкодження локалізовані в різних ділянках вірусного геному, відбувається рекомбінація, внаслідок чого відновлюється повний генетичний набір, необхідний для утворення повноцінного потомства. Зазвичай множинна реактивація відбувається між вірусами, інактивованими УФ-променями. Ефективність множинної реактивації залежить від багатьох факторів: ступеня пошкодження вірусного геному, множинності зараження, аутоінтерференції.

Перехресна реактивація (крос-реактивація) виникає між інфекційним та інактивованим вірусами. За змішаної інфекції відбувається рекомбінація непошкоджених ділянок геному інактивованого вірусу з геномом повноцінного вірусу, внаслідок чого з'являються штами з властивостями обох батьків.

Гетерозиготність полягає в тому, що за змішаної інфекції різними штамами вірусу утворюються віріони потомства, які містять у своєму складі два батьківські геноми *(повні гетерозиготи)* або принаймні один повний геном і частину іншого *(неповні гетерозиготи)*. Це явище зумовлено неправильним упакуванням геномів при формуванні віріонів складно організованих вірусів. Наприклад, потомство ортоавулавірусу птахів 1 (збудника ньюкаслської хвороби) може містити понад 10 % повних гетерозигот. Вони нестабільні й за наступної реплікації розділяються на батьківські форми, на одну з батьківських форм і певний рекомбінант або на два рекомбінанти. Гетерозиготність не властива просто організованим вірусам, у яких структурні обмеження при упакуванні роблять малоймовірним потрапляння двох геномів у один капсид.

Комплементація (негенетична реактивація) – це взаємодія генних продуктів двох вірусів, що стимулює їхнє розмноження, але не змінює генотипи. При цьому один вірус постачає іншому компоненти, яких бракує для здійснення повного циклу репродукції, зазвичай структурні або неструктурні протеїни.

Комплементація буває дво- та односторонньою. *Двостороння комплементація* виникає між дефектними вірусами, кожен з яких не здатний до самостійної репродукції. Обидва партнери забезпечують один одного потрібними генними продуктами. За *односторонньої комплементації* повноцінний вірус-помічник стимулює репродукцію залежного від нього дефектного вірусу-сателіта, надаючи йому потрібні протеїни. Наприклад, вірус гепатиту В є помічником для дефектного РНК-вмісного вірусу гепатиту дельта, надаючи йому свій поверхневий HBs-антиген для формування оболонки.

Комплементація поширена серед вірусів і тісно пов'язана з їхньою дефектністю, оскільки у вірусних популяціях завжди присутні ДІ-частки, які втратили частину генетичного матеріалу.

Фенотипове змішування – це явище, коли геном одного вірусу упаковується в капсид або суперкапсид, що складається повністю чи частково зі структурних протеїнів іншого вірусу. При цьому об'єднуються тільки вірусні протеїни, генетичної взаємодії між нуклеїновими кислотами не відбувається.

Фенотипове змішування досить поширене серед просто організованих вірусів, у яких спостерігається *транскапсидація* при вбудуванні дочірнього геному в гетерологічний капсид. Це виявлено, зокрема, у вірусу ящуру та ентеровірусу Е.

У деяких складно організованих вірусів може утворитися *псевдотип*, якщо нуклеокапсид одного вірусу оточує суперкапсидна оболонка іншого. Наприклад, везикуловіруси Індіана, Алагоас, Кокал і Нью-Джерсі (збудники везикулярного стоматиту) утворюють псевдотипи з пташиними штамами вірусу грипу А, альфагерпесвірусами людини 1 і 2, онкогенними ретровірусами птахів і мишей.

Фенотипове змішування є тимчасовим феноменом: у наступному поколінні віріони відтворюють ознаки того вірусу, чию нуклеїнову кислоту вони містять.

Інтерференція полягає в здатності одного вірусу пригнічувати репродукцію іншого. Залежно від спорідненості між вірусами-партнерами розрізняють *гомологічну інтерференцію*, яка проявляється тільки стосовно

гомологічного або близькоспорідненого вірусу, і *гетерологічну інтерференцію*, що виникає між вірусами різних таксономічних груп. Інтерференція між вірусами може виявлятися на різних стадіях репродукції внаслідок конкуренції за синтезовані вірусоспецифічні макромолекули, а також за рахунок утворення особливого протеїну – інтерферону, який виробляється клітинами у відповідь на вірусну інфекцію та має виражену противірусну активність.

Однією з форм гомологічної інтерференції є *аутоінтерференція*, що виникає в процесі серійного пасажування вірусу за високої множинності зараження. У цих умовах сумарний урожай віріонів залишається відносно постійним, проте вміст інфекційного вірусу знижується. Отже, спостерігається інтерференція щодо зростання інфекційної частини вірусної популяції, яка містить велику кількість ДІ-часток. Ці делеційні мутанти інтерферують із розмноженням інфекційного вірусу, ефективно конкуруючи, наприклад, за полімеразу, що призводить до утворення всезростаючої частини ДІ-часток.

1.5.5. Загальні принципи генної інженерії

До цього часу мова йшла про генетичні процеси, які відбуваються за взаємодії біологічно та еволюційно близьких вірусів. Проте можливі генетичні взаємодії й неспоріднених вірусів, що є предметом дослідження ***генної інженерії***. Цей новий напрямок у генетиці та біотехнології виник завдяки успішному розвитку молекулярної біології. У 1972 р. у Національній академії наук США було представлено першу генноінженерну роботу *П. Берга* про створення *in vitro* химерної ДНК, яка не мала аналогів у природі: гібриду поліомавірусу макак-резусів 1 і бактеріофагу λ. Цей химерний геном був уведений у формі плазміди в *E. coli* та експресований з утворенням вірусоспецифічних протеїнів.

На відміну від класичної та молекулярної генетики, генна інженерія має своїм *об'єктом дослідження* не клітини, не віруси, а гени або їхні групи, оперуючи з ними не як із біологічними об'єктами, а як із молекулами або фракціями молекул. Генна інженерія *вивчає* закономірності конструювання *in vitro* нових генетичних структур – рекомбінантних (гібридних) ДНК та клонування їх у реципієнтній клітині. *Мета* генної інженерії – пересадження генів у гетерогенні системи, їхня експресія для отримання біологічно активних протеїнів (гормонів, ензимів, антигенів тощо). *Головним завданням* генної інженерії є вибір таких клітинних систем, які б забезпечили

економічно вигідну технологію виробництва біологічно активних речовин. *Основним об'єктом* при виборі клітинних систем, де вводяться гени і здійснюється їхня експресія, є прокаріоти (бактерії, насамперед *E. coli*) та найпростіші еукаріоти (дріжджі). У деяких випадках доцільно використовувати вищі еукаріотичні системи (клітини птахів і ссавців).

Основним інструментом генноінженерних робіт є певні ензими і насамперед ***рестриктази (рестрикційні ендонуклеази)***, які отримують із бактеріальних клітин. Рестриктази поширені серед прокаріотів і беруть участь у генетичних процесах. Вони захищають бактеріальні клітини від чужорідної ДНК, розщеплюючи ДНК бактеріофагів. Відомо понад 500 рестриктаз, які характеризуються високою специфічністю. При генноінженерних маніпуляціях за допомогою різних рестриктаз вдається отримати потрібні фрагменти геномів або окремі гени.

Чужорідний генетичний матеріал можна ввести в клітину за допомогою ***вектора***. Це молекула ДНК, яка здатна до автономної реплікації в реципієнтній клітині та забезпечує експресію вбудованих у неї чужорідних генів. Векторами можуть слугувати *плазміди*, *бактеріофаги*, *космід*и (гібриди плазмід і бактеріофагу λ). Зручними векторами для еукаріотичних клітин є деякі *віруси тварин:* із ДНК-вмісних – віруси вісповакцини, поліома-, папілома-, адено- та герпесвіруси; з РНК-вмісних – ретровіруси.

Створенням рекомбінантної ДНК із подальшим її клонуванням в реципієнтних клітинах завершується лише перший етап генноінженерних робіт. *Головна мета* – досягти експресії потрібного гена в прокаріотичних чи еукаріотичних клітинах і на основі сучасних методів молекулярної біології розробити технологію отримання протеїного продукту в умовах промислового виробництва.

Генна інженерія відкриває широкі можливості й перспективи для створення сучасних ***вірусних вакцин***. На основі технології рекомбінантної ДНК розроблено п'ять типів *генноінженерних вакцин:* реасортантні, рекомбінантні (субодиничні, векторні), ДНК-вакцини і рослинні (з трансгенних рослин).

Генноінженерні методи використовують також при розробці сучасних ***діагностикумів***. Так, для експрес-діагностики вірусних інфекцій із метою виявлення в патологічному матеріалі хворих і загиблих тварин вірусних геномів застосовують *метод ДНК-зондів*, які конструюють на основі плазмідного вектора.

Принципово новим діагностичним методом є *рестрикційний аналіз у* поєднанні з *методом секвенування*. Вони дають змогу скласти фізичні карти вірусних геномів із точністю до одного нуклеотиду, що гарантує

точну типізацію близькоспоріднених вірусів. Рестрикційний аналіз має велику цінність для стандартизації та контролю біопрепаратів.

Генна інженерія стала ядром сучасної біотехнології, і вклад її у виробництво з кожним роком зростає.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Охарактеризуйте структурну організацію вірусного геному. **2.** Що таке генетичні ознаки, генотип і фенотип вірусів? **3.** Охарактеризуйте вірусну популяцію, її генофонд та генетичну неоднорідність. **4.** Які процеси лежать в основі спадкової мінливості вірусів? **5.** Що таке модифікації вірусів? **6.** Охарактеризуйте мутації у вірусів, їхній механізм і наслідки. **7.** Назвіть генетичні та негенетичні взаємодії вірусів. **8.** Які завдання вирішує генна інженерія?

Висновки

1. Віруси – це автономні генетичні структури, що здатні функціонувати і репродукуватися лише в чутливих до них клітинах тварин, рослин, грибів, найпростіших, бактерій та архей.

2. Кардинальні відмінності вірусів від клітинних форм життя: неклітинна будова, надзвичайна різноманітність геному, відсутність власних протеїносинтезувальних систем, диз'юнктивна репродукція.

3. Сучасна класифікація вірусів є універсальною для вірусів хребетних, безхребетних, рослин, грибів, найпростіших, бактерій та архей і базується на таких основних критеріях, як тип і структура вірусного геному, механізм реплікації та морфологія віріона.

4. Віруси хребетних (1878 видів) входять до домену Viruses, 4 регіонів, 5 царств, 10 типів, 2 підтипів, 20 класів, 26 порядків, 3 підпорядків, 45 родин (15 – ДНК-геномні та 30 – РНК-геномні), 33 підродин, 345 родів і 49 підродів.

5. Репродукція вірусів відбувається в клітині за рахунок її сировинних та енергетичних ресурсів і протеїносинтезувального апарату і включає такі стадії: 1) адсорбція на плазмолемі клітини; 2) проникнення в клітину; 3) депротеїнізація (роздягання); 4) транскрипція; 2) трансляція; 3) реплікація; 4) формування віріонів; 5) вихід із клітини.

6. Центральним об'єктом генетичного дослідження вірусів є вірусні популяції, що характеризуються високою генетичною неоднорідністю і в межах яких існують штами, серотипи, варіанти, мутанти і клони.

7. В основі спадкової мінливості вірусів лежать такі процеси, як мутації, рекомбінації, включення у вірусний геном клітинних генів і потік генів. Саме з цих джерел створюється і поповнюється генофонд вірусних популяцій.

8. За змішаної вірусної інфекції виникають генетичні взаємодії між вірусними геномами (рекомбінація, генетична реактивація, гетерозиготність) або негенетичні взаємодії на рівні генних продуктів (комплементація, фенотипове змішування, інтерференція).

9. Генна інженерія відкриває широкі можливості й перспективи для конструювання і створення технологій виготовлення сучасних вірусних вакцин і діагностикумів.

Розділ II

ВІРУСНА ІНФЕКЦІЯ ТА ПРОТИВІРУСНИЙ ІМУНІТЕТ

Навчальні цілі розділу: мати чітке уявлення про особливості патогенезу вірусних інфекцій на рівні клітин та організму; знати цитопатологію вірусних інфекцій; засвоїти класифікацію вірусних інфекцій; знати екологію та основні механізми персистенції вірусів; пізнати особливості та механізми противірусного імунітету; мати уявлення про імунопатологію вірусних інфекцій; знати загальні принципи імунопрофілактики вірусних інфекцій, характеристику вірусних вакцин та сучасні засоби хіміотерапії вірусних інфекцій.

ТЕМА 2.1. ПАТОГЕНЕЗ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

2.1.1. Особливості патогенезу вірусних інфекцій

Вірусна інфекція – це сукупність процесів, що виникають при взаємодії вірусу з організмом хазяїна. Найяскравішою формою вірусної інфекції є *вірусна хвороба.* Динаміка реакцій взаємодії вірусу з організмом хазяїна називається *інфекційним процесом.*

Патогенез вірусних інфекцій – це сукупність процесів, які спричинюють захворювання при взаємодії вірусу з організмом хазяїна і визначають закономірність його розвитку.

Якщо в дуже загальних рисах охарактеризувати патогенез вірусних інфекцій, ми отримаємо таку картину. Для того, щоб спричинити захворювання, вірус повинен проникнути в організм хазяїна та досягнути чутливих тканин і клітин, де відбувається його репродукція. Внаслідок розмноження вірусу пошкоджуються численні клітини організму, що лежить в основі клінічного прояву захворювання. Крім того, необхідно, щоб вірус уникнув захисних реакцій організму, хоча в деяких випадках імунна відповідь хазяїна сприяє розвитку хвороби.

Патогенез вірусних інфекцій визначають такі ч*инники:* 1) тропізм вірусу; 2) швидкість репродукції вірусу і кількість інфекційних віріонів у потомстві; 3) реакція клітин на вірусну інфекцію; 4) реакція організму на зміни клітин і тканин, спричинені вірусною інфекцією.

У патогенезі вірусних інфекцій розрізняють такі *стадії:* 1) проникнення вірусів у організм; 2) первинна репродукція вірусів; 3) поширення вірусів у організмі; 4) локалізація вірусів у організмі; 5) деструкція чутливих клітин; 6) імунна відповідь організму; 7) персистенція вірусів у організмі.

Не всі віруси проходять зазначені стадії щоразу, коли заражають організм. Патогенез вірусних інфекцій багато в чому залежить від специфіки збудника і хазяїна, взаємовідносини яких на рівні організму проявляються по-різному.

Якщо в організмі встигають активізуватися клітинні й гуморальні чинники імунітету, перш ніж будуть уражені життєво важливі органи і розвинуться необоротні зміни, починається видужування. У процесі реконвалесценції організм поступово звільняється від збудника. Проте після видужання вірус може тривалий час зберігатися в організмі, що призводить до формування вірусної персистенції.

У зв'язку з тим, що віруси є облігатними внутрішньоклітинними генетичними паразитами, в основі їхньої взаємодії з організмом завжди лежить інфекційний процес на рівні клітини. Тому в патогенезі вірусних інфекцій спочатку потрібно розглянути клітинну патологію, спричинену вірусами.

2.1.2. Вірусна інфекція клітин

Який смисл вкладається в поняття «вірусна інфекція клітин»? Позаклітинний віріон біологічно інертний. Ця інертність зберігається доти, поки віріон не проникне в клітину і вірусний геном не почне функціонувати як автономна генетична структура. Лише з цього моменту проявляється своєрідність взаємовідносин вірусу і клітини. Отже, ***вірусна інфекція клітин*** – це сукупність процесів, які виникають при взаємодії клітин із вірусними геномами.

Зараження вірусом чутливих клітин не означає, що неминуче буде відбуватися його репродукція з формуванням інфекційного потомства. Розрізняють *два основні типи* вірусної інфекції клітин: *автономна* та *інтеграційна*.

Автономна інфекція характеризується реплікацією вірусного геному незалежно від клітинної ДНК. Поняття автономії відносне, обмежується лише відсутністю фізичного зв'язку між вірусним і клітинним геномами, хоч їхня взаємодія постійно відбувається впродовж інфекційного циклу. Цей тип інфекції характерний для всіх вірусів тварин, за винятком ретровірусів.

Інтеграційна інфекція виникає внаслідок фізичного об'єднання вірусного геному (або його фрагмента) з клітинним. При цьому вірусний геном реплікується і функціонує як складова частина клітинного геному. Інтегрований у клітинну ДНК вірусний геном (або субгеномний фрагмент) називається ***провірусом*** (син.: *ДНК-провірус, провірусна ДНК*). На цьому цикл репродукції вірусу може припинитися. Заражена клітина не продукує вірусне потомство, зберігає нормальні функції та при поділі передає дочірнім клітинам нуклеотидні послідовності вірусу. Інтеграційна інфекція може призвести до неопластичної трансформації клітин. Трансформовані клітини набувають здатності до необмеженого поділу через порушення регуляторних механізмів, унаслідок чого виникають пухлини. Здатність вірусу стимулювати розмноження заражених клітин називається ***цитопроліферативним (трансформувальним) ефектом***.

Інтеграційна інфекція можлива для деяких представників п'яти родин ДНК-вмісних вірусів тварин – *Adenoviridae, Papillomaviridae, Polyomaviridae, Herpesviridae* і *Hepadnaviridae* – та є обов'язковою для однієї родини РНК-вмісних вірусів – *Retroviridae*. У ретровірусів інтегрує з клітинним геномом дволанцюгова ДНК, яка синтезується на матриці віріонної одноланцюгової РНК за участю вірусного ензиму *зворотної транскриптази (ревертази)*. Ця ДНК-копія РНК-геному ретровірусів називається провірусом, який може бути як інтегрованим, так і неінтегрованим. Інтеграція відбувається за участю вірусного ензиму інтегрази. Якщо інтеграція відбувалася в геном гермінальних клітин, з яких формуються яйцеклітини і сперматозоїди, тоді вірус (точніше провірус) стає ендогенним, тобто буде передаватися нащадкам за спадковістю.

Кількість провірусів на геном клітини варіює в широких межах: 1–20 у поліомавірусів, 2–300 в аденовірусів, 4–10 у ретровірусів.

Який механізм інтеграції вірусного геному з клітинним? Згідно з моделлю А. Кемпбелла (1962), для цього процесу потрібна кільцева форма вірусної двонитчасної ДНК, яка виникає завдяки повторам нуклеотидних послідовностей на кінцях лінійної молекули. Вона прикріплюється до клітинної ДНК, у місці контакту обидві молекули розрізуються, а кінці зшиваються, внаслідок чого вірусна ДНК стає частиною клітинного геному (рис. 2.1).

Основні типи вірусної інфекції клітин – автономна та інтеграційна – поділяються на такі *форми:* 1) продуктивна та абортивна (залежно від утворення інфекційного потомства); 2) гостра і хронічна (залежно від динаміки взаємодії вірусів і клітин); 3) літична і нелітична (залежно від наслідку інфекційного процесу для клітин).

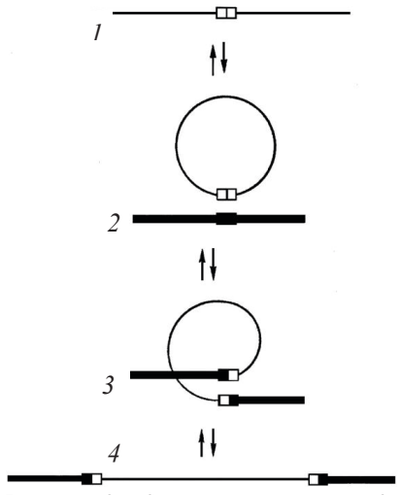


Рис. 2.1. Інтеграція вірусного геному з клітинним:
1 – вірусна ДНК; 2 – геном клітини; 3 – процес інтеграції;
4 – клітинний геном із ДНК-провірусом
(Кемпбелл А., 1962)

Продуктивна інфекція характеризується повним циклом репродукції вірусу і завершується формуванням інфекційного потомства. Дослідження саме цієї форми інфекції дає змогу відповісти на одне з головних питань вірусології: як у заражених клітинах відбувається утворення віріонів та які фундаментальні закономірності лежать в основі цього процесу?

Абортивна інфекція не завершується формуванням інфекційних віріонів або вони утворюються в значно меншій кількості, ніж за продуктивної інфекції. Вивчення механізмів абортивної інфекції становить великий інтерес для розуміння деталей репродукції вірусів, природи клітинної резистентності до вірусів, дефектності вірусів, хронічної вірусної інфекції клітин та вірусного канцерогенезу.

Абортивна інфекція може виникнути за *трьох обставин:* 1) зараження чутливих клітин дефектним вірусом (сателітом або ДІ-частками); 2) зараження чутливих клітин інфекційним вірусом у несприятливих умовах (фізіологічна резистентність клітин під час мітозу, підвищення температури, зміна pH у вогнищі запалення); 3) зараження нечутливих клітин інфекційним вірусом (відсутність у клітині специфічних рецепторів та відповідних протеаз, потрібних для адсорбції, проникнення і депротеїнізації вірусу).

Абортивна інфекція може перетворитися в продуктивну за допомогою вірусу-помічника (явище комплементації) або в разі усунення несприятливих умов.

Гостра інфекція характеризується утворенням у заражених клітинах вірусного потомства, після чого інфекційний процес припиняється і клітини або гинуть, або виживають і не містить вірусних компонентів.

За ***хронічної інфекції*** заражені клітини продукують віріони або вірусні компоненти тривалий час аж до своєї природної загибелі (не від цієї вірусної інфекції), й дочірні клітини зберігають інфекційний стан. Частіше хронічної форми набуває абортивна інфекція, оскільки вірусний генетичний матеріал зазвичай не входить до складу віріонів потомства, а накопичується в клітинах і передається в дочірні клітини.

Причиною хронічної інфекції можуть бути ДІ-частки, які, потрапляючи в чутливу клітину разом з інфекційними віріонами, конкурують із ними за фактори репродукції та перешкоджають утворенню інфекційного потомства. Внаслідок цього клітини не гинуть, а зберігають інфекційний стан.

Літична *(цитолітична)* ***інфекція*** завершується загибеллю (лізисом) клітин. ***Нелітична*** *(нецитолітична)* ***інфекція*** безпосередньо не призводить до лізису клітин, які можуть функціонувати певний час, продукуючи вірусне потомство.

2.1.3. Цитопатологія вірусних інфекцій

Деструкція клітин, що виникає за літичної інфекції, називається ***цитопатичним ефектом*** *(ЦПЕ)*, або ***цитопатогенною дією вірусу*** *(ЦПД)*. Зазвичай ці терміни застосовують для позначення морфологічних змін в інфікованих клітинах, хоча вірусна інфекція клітин супроводжується не лише пошкодженням клітинної структури. У зараженій клітині відбувається зміна метаболізму, що зумовлено синтезом вірусоспецифічних макромолекул, активацією або гальмуванням ензимних систем клітини, пошкодженням її хромосомного апарату та органел.

Вірус, який спричинює цитопатичний ефект, називається *цитопатогенним*. Ця властивість характерна для більшості вірусів людини і тварин та лежить в основі патогенезу вірусних інфекцій, а також широко використовується в лабораторній діагностиці для індикації збудників у культурі клітин.

Цитопатичні зміни інфікованих вірусом клітин представлені різними ушкодженнями. До *неспецифічних* уражень належать мутне набухання клітини внаслідок порушення проникливості плазмолеми, пошкодження

хромосомного апарату, пікноз ядер, вакуолізація цитоплазми. *Специфічними* цитопатичними змінами заражених клітин є утворення вірусних тілець-включень і симпластів. Специфічні й неспецифічні процеси, що відбуваються в інфікованій клітині, можуть призвести до її деструкції та загибелі.

Причини ЦПД і подальшої загибелі клітин різноманітні: 1) блокування клітинного геному на ранніх стадіях інфекції та пошкодження його в процесі інфекції; 2) порушення метаболізму клітинних макромолекул; 3) інтенсивне виснаження протеїнових та енергетичних ресурсів клітин внаслідок переключення їхніх систем на синтез вірусоспецифічних макромолекул; 4) накопичення великої кількості вірусних структурних протеїнів, які мають цитотоксичну дію; 5) пошкодження лізосом і звільнення гідролітичних ензимів, які спричинюють аутоліз клітин; 6) порушення структури плазмолем і лізис клітин внаслідок інтенсивного виходу віріонів потомства. Усі ці причини пошкодження клітин проявляються і поєднуються певним чином за різних вірусних інфекцій.

Деякі складно організовані віруси зумовлюють характерну ЦПД, яка полягає в злитті заражених клітин між собою (або інфікованих із нормальними) та утворенні багатоядерних клітин – ***симпластів*** (син.: *синцитії*, *полікаріоцити*). Вони можуть містити до 100 і навіть 1000 ядер. В основі формування симпластів лежить той самий механізм, який забезпечує проникнення вірусу в клітину шляхом інтеграції суперкапсидної оболонки віріона з плазмолемою, а саме: з ліпідами плазмолем сусідніх клітин взаємодіють вірусні протеїни злиття. Симпластоутворення характерне, зокрема, для таких родин вірусів, як *Herpesviridae, Paramyxoviridae* і *Retroviridae*.

У заражених клітинах часто виявляють вірусні ***тільця-включення***. Вони локалізуються в ядрі або цитоплазмі інфікованих клітин, розрізняються за морфологією й тинкторіальними властивостями (базофільні та ацидофільні). *Природа* тілець-включень різноманітна, що залежить від виду вірусу. Це можуть бути скупчення віріонів потомства (аденовірусна інфекція ВРХ), накопичення вірусних протеїнів (грип) або змінений клітинний матеріал (герпетична інфекція людини). За більшості інфекцій тільця-включення являють собою *вірусні «фабрики»* – місця, де відбувається синтез компонентів вірусу і складання віріонів потомства. У вірусних «фабриках» виявляють клітинні структури (рибосоми, мембрани тощо). Тільця-включення є специфічною морфологічною ознакою вірусної інфекції та мають певне діагностичне значення.

Підводячи підсумок взаємодії вірусів із чутливими клітинами, можна дійти висновку, що результатом цієї взаємодії є: 1) загибель клітин;

2) трансформація клітин, що характеризується здатністю до необмеженого поділу; 3) формування хронічної інфекції – своєрідної рівноваги між вірусом і клітинами без прояву ЦПД, що призводить до персистенції збудника в організмі хазяїна.

2.1.4. Шляхи проникнення вірусів у організм

Патогенез вірусних інфекцій починається з проникнення збудника в організм хазяїна. Шляхи проникнення вірусів у організм різноманітні, що визначається локалізацією чутливих клітин і механізмом передавання збудника від одного хазяїна до іншого. *Основні вхідні ворота інфекції* для більшості вірусів – слизові оболонки респіраторного і травного трактів.

Аерогенний (повітряно-крапельний) шлях. Вірус може потрапити в організм у складі крапель або з частинками пилу, причому чим вони дрібніші, тим глибше проникають віруси, досягаючи альвеол. Аерогенний шлях проникнення властивий вірусам *двох груп:*

1) респіраторні віруси, що репродукуються в епітелії слизових оболонок дихальних шляхів, зумовлюючи місцеву (рідше генералізовану) інфекцію (наприклад, віруси грипу A, B, C і D, респіровірус ВРХ 3, ортопневмовірус ВРХ);

2) віруси, для яких дихальні шляхи є лише вхідними воротами інфекції; такі віруси спричинюють генералізований процес, нерідко з вторинним ураженням дихальних шляхів (наприклад, віруси натуральної віспи, віспи овець, кіз і свиней, краснухи, морбіллівірус кору, ортоавулавірус птахів 1).

Аліментарний (фекально-оральний) шлях проникнення характерний для вірусів *двох груп:*

1) кишкові віруси, що уражають епітеліальні клітини слизової оболонки кишечнику і спричинюють гастроентерити (наприклад рота-, корона-, каліці- та астровіруси);

2) віруси, які не спричинюють вогнищевого ураження слизової оболонки кишечнику, а призводять до генералізованого процесу (наприклад, гепатовірус A, ентеровіруси C і G, тешовірус A).

Контактний шлях зараження відбувається: 1) за безпосереднього контакту хворої тварини зі здоровою через шкіру, видимі слизові оболонки (в тому числі статевих органів); 2) за непрямого контакту через фактори навколишнього середовища (зокрема парентерально).

Зараження *через шкірний покрив* відбувається в разі порушення його цілісності, навіть за мікроскопічних ушкоджень. Так можуть проникати в організм віруси віспи корів, віспівакцини, контагіозного молюска,

папіломавіруси, альфагерпесвіруси людини 1 і 2. При укусах передаються ліссавірус сказу і альфагерпесвірус макак 1. *Через кон'юнктиву* проникають мастаденовіруси людини і ВРХ.

Статевим шляхом в організм потрапляють віруси, які містяться в спермі або вагінальному слизу. У людини за статевих контактів можуть передаватися папіломавіруси, спричинюючи кондиломи та злоякісні пухлини геніталій, а також альфагерпесвіруси 1 і 2, що зумовлює місцеве ураження генітальних органів. Статевим шляхом передаються віруси імунодефіциту людини 1 і 2, гепатиту В, контагіозного молюска, пестівіруси А і В, альфагерпесвірус ВРХ 1, альфагерпесвірус коней 1.

Деякі віруси можуть потрапити в організм *парентеральним шляхом:* через контаміновані інструменти або препарати крові (імунні сироватки, неспецифічні гаммаглобуліни, сироватки реконвалесцентів). Такий шлях зараження можливий для вірусів гепатиту В, імунодефіциту людини 1 і 2, лейкозу ВРХ. Парентеральний шлях проникнення вірусів у організм включає також зараження внаслідок трансплантації органів і гормонотерапії (в медичній практиці цей шлях називають *ятрогенним*). Так, виникнення в людей хвороби Крейтцфельдта – Якоба пріонової етіології може бути пов'язане із застосуванням інфікованих трансплантатів рогівки або твердої мозкової оболонки, нейрохірургічних інструментів і соматотропного гормону, отриманого з гіпофізу померлих. Зареєстровані одиничні унікальні випадки зараження людей ліссавірусом сказу внаслідок пересадження рогівки ока від інфікованих донорів.

Існує велика екологічна група арбовірусів, які передаються через укуси кровосисних членистоногих (комарів, кліщів, москітів, мокреців). Цей шлях зараження називається ***трансмісивним***. Таким способом проникають віруси кліщового енцефаліту, жовтої гарячки, блутанга, інфекційної анемії коней.

Вертикальний механізм – це передавання вірусу від батьків потомству, що здійснюється чотирма шляхами.

Внутрішньоутробне зараження плоду спричинюють віруси краснухи, імунодефіциту людини 1 і 2, лейкозу ВРХ, альфагерпесвіруси людини 3 і 5, мамаренавірус лімфоцитарного хоріоменінгіту, пестівіруси А і В, альфагерпесвірус ВРХ 1, альфагерпесвірус коней 1. У птахів трансоваріально передаються віруси лейкозу птиці і саркоми Рауса, грипу А, ортоавулавірус птахів 1, коронавірус птахів, альфагерпесвіруси куриних 1, 2 і 3, авігепатовірус А.

Генетичне передавання трапляється за інтеграційних інфекцій, коли вірусний геном вбудовується в геном гермінальних клітин, з яких

формуються яйцеклітини і сперматозоїди (віруси лейкозів і сарком тварин). *Перинатальне зараження* виникає в разі проходженні плоду через інфіковані родові шляхи (можливе за цитомегалії, ВІЛ-інфекції, вірусної діареї ВРХ). *Лактогенне зараження* – з молоком матері передаються віруси імунодефіциту людини 1 і 2, лейкозу ВРХ, альфагерпесвірус свиней 1.

2.1.5. Первинна репродукція та поширення вірусів у організмі

Багато вірусів, перед тим як поширитися в організмі, розмножуються в місці проникнення (біля вхідних воріт інфекції). Наприклад, первинна репродукція *ліссавірусу сказу* відбувається в м'язових клітинах у місці укусу, де його виявляють до 18 діб. *Ентеровірус С*, який спричинює поліомієліт, проникає через травний канал і, перед тим як досягнути ЦНС, розмножується в лімфоїдних фолікулах слизової оболонки рота, глотки і тонкого кишечнику. Первинна репродукція *альфагерпесвірусу свиней 1* відбувається в місці проникнення – слизовій оболонці рота, верхніх дихальних шляхів або шкірі, а вже потім збудник різними шляхами поширюється по всьому організму.

Віруси, що спричинюють вогнищеві інфекції, інтенсивно розмножуються біля вхідних воріт інфекції, де і виникає клінічний прояв хвороби, наприклад, за грипу тварин і людини, парагрипу-3 ВРХ, ротавірусної та коронавірусної інфекцій ВРХ, трансмісивного гастроентериту свиней.

З місця проникнення віруси поширюються в організмі *трьома шляхами:* гематогенним, лімфогенним і нейрогенним.

Гематогенний шлях є основним у поширенні вірусів у організмі. *Вірусемія* є звичайним симптомом за більшості вірусних інфекцій. Вона розвивається під час інкубаційного періоду і зберігається впродовж перших днів хвороби. За деяких вірусних інфекцій вірусемія є *постійною,* наприклад, при лейкозі ВРХ, інфекційній анемії коней та африканській чумі свиней.

За більшості інфекцій вірус не пасивно переноситься плазмою крові, а розвивається *динамічний процес*, який охоплює макрофаги, лейкоцити, еритроцити, тромбоцити та ендотеліальні клітини. Вірусемія підтримується шляхом постійного поступлення вірусу в кров'яне русло або в разі порушення механізмів елімінації. Багато вірусів фагоцитуються макрофагами, які розносять їх по організму і захищають від імунних чинників. Транспортування фагоцитованого вірусу в лімфатичні вузли може лише сприяти інфекції, якщо збудник розмножується в лімфоїдній тканині, поступаючи звідти в кров.

Окрім макрофагів, віруси можуть зв'язуватися з іншими клітинними елементами крові. Так, віруси віруси грипу A, B, C і D та респіровірус ВРХ 3 адсорбуються на еритроцитах; морбіллівірус кору, вірус кліщового енцефаліту, ентеровірус С, альфагерпесвіруси людини 1 і 2, альфагерпесвіруси птахів 2 і 3 – на лейкоцитах. Деякі віруси здатні репродукуватися в лейкоцитах (пестівіруси A, B і C), лімфоцитах (вірус лейкозу ВРХ) та еритроцитах (вірус інфекційної анемії коней). Віруси віспи ссавців і птахів розмножуються в клітинах судинного ендотелію, звідки безпосередньо потрапляють у кров.

Лімфогенний шлях. З місця первинної репродукції віруси можуть поширюватися по лімфатичних судинах. Ураження лімфатичних вузлів спостерігається за кору, краснухи, інфікування мигдалин та аденоїдів – за аденовірусної інфекції людини. У м'ясоїдних інфекційний гепатит, парвовірусна інфекція та чума супроводжуються ураженням мигдалин і лімфатичних вузлів, які можуть бути вторинним вогнищем інфекції.

Нейрогенний шлях. Деяким вірусам (зокрема збудникам сказу, вітряної віспи – оперізувального лишаю, хвороби Ауєскі) властиве поширення в організмі з місця проникнення вздовж периферійних нервів. Наприклад, *ліссавірус сказу* поширюється від місця укусу по аксоплазмі периферійних нейронів, зв'язуючись із ацетилхоліновими рецепторами нервово-м'язових синапсів. Швидкість дисемінації збудника по нервових стовбурах становить близько 3 мм/год. Досягнувши ЦНС, вірус інтенсивно репродукується там і по відцентрових нервах потрапляє в слинні залози та рогівку ока. За сказу виявляють тотальне ураження нервової системи. Можлива генералізація інфекційного процесу з локалізацією вірусу у внутрішніх органах і крові.

2.1.6. Локалізація вірусів у організмі та деструкція чутливих клітин

Після проникнення в організм і дисемінації з кров'ю, лімфою або нейрогенним шляхом віруси досягають відповідних тканин, де відбувається їхня основна репродукція. Здатність вірусів розмножуватися в певних типах клітин організму називається ***тропізмом***. За цією властивістю віруси поділяються на *шість основних груп:*

1) *нейротропні* – уражають нервові клітини (ліссавірус сказу, тешовірус A, віруси східного, західного і венесуельського енцефаломієлітів коней);

2) *дерматропні (епітеліотропні)* – уражають клітини шкіри і слизових оболонок (віруси віспи, ящуру, везикуловіруси Індіана, Алагоас, Кокал і Нью-Джерсі);

3) *пневмотропні* – уражають клітини слизових оболонок верхніх дихальних шляхів і легень (віруси грипу A, B, C і D, респіровірус ВРХ 3, ортопневмовірус ВРХ);

4) *ентеротропні* – уражають клітини слизової оболонки шлунково-кишкового тракту (ротавіруси A, B і C, бетакоронавірус 1);

5) *політропні* – уражають кілька типів клітин (альфагерпесвірус ВРХ 1, пестівіруси A і B, мастаденовіруси ВРХ A, B і C, атаденовірус ВРХ D);

6) *пантропні* – уражають усі типи клітин (віруси чуми ВРХ, африканської чуми свиней, африканської чуми коней, пестівірус С, альфагерпесвірус свиней 1, морбіллівірус собак, ортоавулавірус птахів 1, пташині штами вірусу грипу A).

Поняття тропізму є в певній мірі умовним. Так, альфагерпесвірус людини 5, який спричинює вітряну віспу та оперізувальний лишай, відомий як дерматропний. Проте він уражає не лише шкіру, але й периферійну нервову систему.

В основі тропізму вірусів лежить чутливість до них певних клітин (а отже, тканин та органів), що у свою чергу зумовлено наявністю в клітинах специфічних рецепторів і відповідних протеолітичних ензимів.

Основним проявом вірулентності вірусів є *деструкція чутливих клітин* у тканинах-мішенях і виникнення внаслідок пошкодження тканин фізіологічних змін в організмі. Конкретні причини, що призводять до цитопатичного ефекту і загибелі клітин, розглянуто в підпункті 2.1.3. «Цитопатологія вірусних інфекцій» (див. с. 80). Іноді ураженню тканин сприяє імунна відповідь хазяїна, як це не парадоксально звучить. Наприклад, за інфекційної анемії коней, африканської чуми свиней та алеутської хвороби норок імунні комплекси вірус – антитіло – комплемент відкладаються в різних тканинах, спричинюючи тяжкі патологічні зміни.

Із зростанням числа зруйнованих вірусами клітин порушується функціонування відповідних органів, що призводить до клінічного прояву хвороби. Проміжок часу з моменту проникнення вірусів у організм до появи перших клінічних симптомів захворювання називається *інкубаційним періодом*. Тривалість його залежить від швидкості поширення збудника в організмі й досягнення чутливих клітин.

Залежно від вірулентності вірусів та імунологічної реактивності організму інфекційний процес протікає в різних *формах:* вогнищева, генералізована, гостра, інапаратна, латентна, хронічна і повільна інфекції (див. підпункт 2.1.6).

2.1.7. Форми вірусних інфекцій та основні механізми персистенції вірусів

В основу класифікації вірусних інфекцій покладено *чотири фактори:* 1) генералізація інфекції; 2) тривалість інфекції; 3) прояв клінічних ознак захворювання; 4) виділення вірусів у навколишнє середовище. Залежно від цих чинників усі вірусні інфекції поділяються на *дві групи:* вогнищеві та генералізовані.

За ***вогнищевої інфекції*** патогенна дія вірусу проявляється біля вхідних воріт у зв'язку з його локальною репродукцією. Вогнищева інфекція має короткий інкубаційний період, рідко супроводжується вірусемією, імунітет після захворювання нетривалий, і головну роль у ньому відіграють секреторні антитіла класу Ig A. Прикладом вогнищевих інфекцій є грип людини і тварин, парагрип-3 ВРХ, ротавірусна і коронавірусна інфекції ВРХ, трансмісивний гастроентерит свиней.

За ***генералізованої інфекції*** вірус після короткочасного розмноження в місці проникнення поширюється в організмі, досягаючи чутливих клітин і тканин, де відбувається його основна репродукція. Генералізованій інфекції властивий тривалий інкубаційний період, вірусемія, формування досить напруженого імунітету, провідна роль у якому належить антитілам класу Ig G. Генералізованими інфекціями є, наприклад, віспа, кір, поліомієліт, сказ, хвороба Ауєскі, ньюкаслська хвороба.

Вогнищева та генералізована інфекції характеризуються *двома типами взаємодії вірусу з організмом:*

1) *короткочасне* перебування збудника в організмі, що проявляється у двох формах інфекційного процесу: *гостра* та *інапарантна* інфекції;

2) *тривале* перебування збудника в організмі – *вірусна персистенція,* що проявляється у трьох формах інфекційного процесу: *латентна, хронічна* і *повільна* інфекції.

Гостра інфекція характеризується розвитком клінічних ознак захворювання, триває відносно короткочасно, протікає з виділенням вірусу в навколишнє середовище і закінчується загибеллю або видужанням. У процесі реконвалесценції вірус елімінується з організму завдяки імунним механізмам, і формується імунітет різного ступеня напруженості.

Інапарантна інфекція – це безсимптомна інфекція, що супроводжується нетривалим перебуванням вірусу в організмі та виділенням його в навколишнє середовище. Після звільнення організму від збудника доказом його

перебування слугує поява або підвищення титрів специфічних антитіл у сироватці крові.

Для правильного розуміння поняття ***«персистенція вірусу»*** слід уточнити, що таке тривале і нетривале перебування збудника в організмі. Нетривале перебування – це термін, що не перевищує часу знаходження вірусу в організмі за гострої інфекції, включаючи такі періоди, як інкубаційний і неускладненого клінічного прояву хвороби. Тому будь-яке збереження вірусу в організмі хазяїна після цього терміну вважається вже як тривале перебування, тобто власне персистенція. Усі *форми вірусної персистенції* – латентна, хронічна та повільна інфекції – характеризуються тривалим вірусоносійством, яке розрізняється за механізмом, проявом і наслідками.

Латентна інфекція – це безсимптомна персистенція вірусу, за якої, як правило, порушується повний цикл його репродукції й у клітинах хазяїна збудник персистує в дефектному стані або у вигляді субвірусних структур (у тому числі ДНК-провірусу). Виділити вірус при цьому досить складно. Іноді персистенцію вірусу встановлюють лише імунологічними або молекулярно-біологічними методами. За латентної інфекції може відбуватися репродукція зрілого вірусу і виділення його в навколишнє середовище.

У людей латентні інфекції здатні спричинити альфагерпесвіруси 1, 2 і 3, ентеровірус С, морбіллівірус кору, віруси краснухи, кліщового енцефаліту, імунодефіциту, онкогенні ретровіруси.

У ветеринарній практиці латентні інфекції можуть спричинити збудники парагрипу-3 ВРХ, інфекційного ринотрахеїту ВРХ, вірусної діареї ВРХ, класичної та африканської чуми свиней, хвороби Ауєскі, ньюкаслської хвороби, алеутської хвороби норок. Сказ може протікати у вигляді латентної інфекції у лисиць, кажанів, песців та інших диких тварин, що підтримує циркуляцію вірусу в природі.

Під впливом яких-небудь зовнішніх чинників може відбутися активізація персистувального вірусу в організмі, його інтенсивна репродукція, що часто призводить до розвитку гострої інфекції, а також хронічної або повільної інфекцій. Хрестоматійним прикладом слугує поширена герпетична інфекція людини з її довготривалою, практично довічною персистенцією збудника в гангліях трійничного нерву.

Хронічна інфекція – це персистенція вірусу, що характеризується тривалим розвитком патологічного процесу з появою одного або кількох симптомів хвороби, чергуванням періодів ремісій і рецидивів, коли вірус виділяється в навколишнє середовище. Хронічну інфекцію можуть спричинити збудники парагрипу-3 ВРХ, вірусної діареї ВРХ, інфекційного ринотрахеїту

ВРХ, аденовірусної інфекції ВРХ, класичної та африканської чуми свиней, чуми м'ясоїдних. У людини в хронічну форму може перейти гепатит В (у 6–15 % випадків), що є однією з причин первинного раку печінки.

Повільна інфекція – це персистенція вірусу, що характеризується тривалим інкубаційним періодом (багато місяців і навіть років), подальшим поступовим, прогресуючим розвитком клінічних ознак хвороби та неминуче летальним наслідком. Для повільної інфекції властивим є поява патологічних змін, як правило, в одному органі або тканинній системі.

Збудниками повільних інфекцій можуть бути віруси, які спричинюють інші форми інфекційного процесу, наприклад, вірус краснухи, морбіллівірус кору, ліссавірус сказу. Так, морбіллівірус кору персистує в лімфоїдній тканині та, проникнувши через гематоенцефалічний бар'єр, зумовлює через 1,5–18 років після захворювання підгострий склерозивний паненцефаліт. Повільні інфекції спричинюють представники родини *Retroviridae,* роду *Lentivirus* (від лат. lentis – повільний): віруси імунодефіциту людини 1 і 2, імунодефіциту мавп, імунодефіциту котів, вісни/меді, артриту енцефаліту кіз. Яскравою ілюстрацією повільних інфекцій є трансмісивні губчастоподібні енцефалопатії тварин і людини, які спричинюються пріонами, зокрема: скрейпі овець і кіз, губчастоподібна енцефалопатія ВРХ, трансмісивна енцефалопатія норок, у людей – куру, хвороба Крейтцфельдта–Якоба.

Які ***основні механізми вірусної персистенції?*** Важлива роль у цьому належить передусім *ДІ-часткам* та *інтеграції геномів* вірусу і клітини. Крім того, вірусну персистенцію можуть спричинити *ts-мутанти.* Вірусна персистенція може виникнути за рахунок різних *імунопатологічних реакцій організму.* Наприклад, за інфекційної анемії коней, африканської чуми свиней та особливо алеутської хвороби норок накопичуються високі титри антитіл, які не здатні нейтралізувати вірус. Причиною вірусної персистенції можуть бути імунодефіцитний стан (вроджений чи набутий) або імунологічна толерантність. І, нарешті, за деяких інфекцій (скрейпі, куру) істотну роль у персистенції збудника відіграє *генетичний механізм.*

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Які чинники визначають патогенез вірусних інфекцій? **2.** Охарактеризуйте вірусні інфекції на клітинному рівні. **3.** Що таке цитопатичний ефект вірусу та які його причини? **4.** Назвіть можливі наслідки взаємодії вірусів із клітинами. **5.** Назвіть стадії патогенезу вірусних інфекцій на рівні організму. **6.** Якими шляхами проникають віруси в організм? **7.** Як відбувається

поширення вірусів у організмі? **8.** Що таке тропізм вірусів і чим він зумовлений? **9.** Охарактеризуйте вірусні інфекції на рівні організму. **10.** Назвіть основні механізми персистенції вірусів.

ТЕМА 2.2. ЕКОЛОГО-ЕПІЗООТОЛОГІЧНІ (ЕПІДЕМІОЛОГІЧНІ) АСПЕКТИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

2.2.1. Вплив антропогенних чинників на екологію вірусів та екологічні ніші вірусів

Екологія вірусів вивчає їхні взаємозв'язки з навколишнім середовищем у всій його різноманітності та наслідки цих взаємовідносин як для вірусів, так і для довкілля, включаючи людину й тварин.

Виникнення цього наукового напрямку у вірусології зумовили *дві обставини:* 1) всезростаючі темпи антропогенного перетворення біосфери внаслідок науково-технічного прогресу; 2) необхідність прогнозувати появу і розвиток епідемічних та епізоотичних спалахів вірусних інфекцій людини і тварин.

Для прогнозування епідемій та епізоотій і запобігання їм обов'язково необхідно з'ясувати наступні *питання.* 1) Де вірусна популяція зберігається в період між епідеміями та епізоотіями? 2) Як відбувається вихід вірусних популяцій з екологічних ніш, що дає початок епідемії та епізоотії? 3) Чому час від часу змінюються властивості вірусної популяції, що часто визначає розвиток епідемій та епізоотій? Відповіді на ці питання дали б можливість покращити складання прогнозів спалахів вірусних інфекцій людини і тварин та намітити найбільш раціональні й ефективні шляхи їхнього попередження.

На екологію вірусів великий вплив мають *антропогенні чинники:* 1) забруднення довкілля промисловими відходами; 2) повсюдне застосування пестицидів, антибіотиків, вакцин та інших біопрепаратів; 3) урбанізація з величезною концентрацією населення в мегаполісах; 4) розвиток сучасних транспортних засобів; 5) господарське освоєння нових територій; 6) створення індустріального тваринництва з високою концентрацією поголів'я на обмежених площах.

Усе це призводить до порушення структури сформованих біоценозів*, сприяє залученню в епідемічний та епізоотичний процеси нових

* *Біоценоз* (син.: біогеоценоз, екосистема) – це взаємозв'язок популяції з неживим середовищем.

збудників, змінює властивості й шляхи циркуляції відомих вірусів, а також імунореактивність та сприйнятливість популяцій людей і тварин.

Екологічні ніші вірусів у загальному розумінні – це місце, яке вони посідають у біосфері. Екологічні ніші включають територію (ареал), що займають певні вірусні популяції, їхні взаємовідносини з іншими організмами і роль у біоценозах.

Не будучи організмами, віруси водночас є своєрідною формою життя з усіма характерними його проявами. Вони здатні пристосовуватися до мінливих умов довкілля та еволюціонувати. Позбавлені власних систем синтезу протеїнів, віруси є автономними генетичними структурами, які назавжди прив'язані до внутрішнього середовища організму – від найпростішої прокаріотної клітини до вищого багатоклітинного організму. Ці організми і становлять екологічні ніші вірусів.

Віруси паразитують у бактеріях, археях, найпростіших, грибах, різноманітних видах рослин і тварин. У різних вірусів коло природних хазяїв *(спектр патогенності)* варіює. Відомі віруси з широким спектром патогенної активності, наприклад, збудники сказу, ящуру, грипу, хвороби Ауєскі, ньюкаслської хвороби. Багато вірусів здатні паразитувати в організмах лише одного виду, зокрема збудники кору, краснухи, класичної та африканської чуми свиней, хвороби Тешена, вірусного гепатиту каченят.

Існують віруси з *двофазним типом поширення* в природі, коли відбувається послідовна зміна хазяїв або інший живий організм є механічним переносником. Наприклад, комахи нарівні з організмом тварини можуть бути місцем репродукції вірусів. Віруси тварин, які передаються через укуси кровосисних членистоногих (кліщів, комарів, москітів, мокреців), становлять екологічну групу *арбовірусів* (від англ. arthropod-borne-viruses – віруси, що передаються членистоногими). Віруси, які зв'язані з гризунами, належать до екологічної групи *робовірусів* (від англ. rodent-borne-viruses – віруси, що передаються гризунами).

2.2.2. Механізми виникнення і поширення вірусних інфекцій

Вірусні інфекції тварин характеризуються певним *епізоотичним процесом,* який полягає у виникненні та поширенні вірусних інфекцій унаслідок ланцюгового передавання збудників від заражених організмів сприйнятливим здоровим. Безперервність ланцюга послідовних заражень тварин забезпечує збереження в природі вірусів як біологічних видів, а отже,

і саме існування вірусних хвороб. У процесі еволюції віруси пристосувалися до паразитування в організмі тварин певного виду й одночасно до умов довкілля в ході постійного переміщення від одного хазяїна до іншого. Обов'язковою умовою виникнення кожного випадку вірусної інфекції є наявність *трьох ланок епізоотичного ланцюга:* 1) джерела збудника інфекції; 2) механізму його передавання; 3) сприйнятливого організму.

Джерело збудника інфекції – це заражений організм тварини або людини, де вірус зберігається, розмножується і виділяється в довкілля або безпосередньо передається іншому сприйнятливому індивіду. Джерелом збудника інфекції є клінічно хворі тварини і люди, вірусоносії в стадії реконвалесценції та латентні вірусоносії.

Залежно від джерела збудника інфекції вірусні хвороби поділяються на *три групи:*

1) ***зоонози*** – властиві тільки тваринам і джерелом збудника інфекції є тварина (наприклад, класична та африканська чума свиней, африканська чума коней, хвороба Тешена, хвороба Ауєскі, чума ВРХ, чума м'ясоїдних, алеутська хвороба норок);

2) ***антропонози*** – характерні тільки людині й джерелом збудника інфекції є людина (наприклад, кір, поліомієліт, краснуха, гепатит В);

3) ***зооантропонози (антропозоонози)*** – спільні для людини і тварин, а джерелом збудника інфекції є тварина і дуже рідко людина (наприклад, сказ, кліщовий енцефаліт, лімфоцитарний хоріоменінгіт, східний, західний і венесуельський енцефаломієліти коней).

Найбільш інтенсивним і небезпечним джерелом збудника інфекції є клінічно хворі тварини за гострого перебігу хвороби. За хронічних інфекцій вірус виділяється у великих кількостях у період рецидивів. Небезпечним джерелом збудника інфекції є тварини за інапаратних та латентних інфекцій, своєчасне діагностування яких досить утруднене.

З організму віруси можуть виділятися *різними шляхами:* з калом, сечею, слиною, видихуваним повітрям, виділеннями з носа, рота, очей, статевих органів, спермою, молоком, ексудатом вогнищевих уражень шкіри і слизових оболонок. Конкретні шляхи виділення вірусів з організму залежать від їхнього тропізму і патогенезу хвороби.

Строки перебування вірусів в організмі тварини чи людини різні, що залежить від біологічних властивостей збудника, патогенетичних особливостей хвороби та імунореактивності організму. Виділення вірусів з організму може тривати і після зникнення клінічних ознак хвороби в період реконвалесценції. Нерідко після видужання тварини тривалий

час залишаються вірусоносіями, становлячи небезпечне джерело збудника інфекції. Так, вірусоносійство після перенесення хвороби Ауєскі становить 6–12 міс, ящуру – від 7–8 міс до 2 років, інфекційної анемії коней – від 3–5 до 18 років.

Латентні вірусоносії можуть бути серед здорових тварин, які контактували з хворими. Нерідко джерелом збудника інфекції для сільськогосподарських тварин слугують дикі тварини, зокрема при сказі, хворобі Ауєскі, ящурі, класичній чумі свиней.

Як вже зазначалося, існують віруси з широким спектром патогенності, що уражають різні види тварин. Сукупність тварин певних біологічних видів, які є природними хазяями даного вірусу і забезпечують його розмноження та існування в природі, називається ***резервуаром збудника інфекції***. Об'єкти неживої природи (повітря, вода, ґрунт, корми, підстилка, предмети догляду), куди віруси потрапляють із виділеннями хворих тварин, слугують лише ***факторами передавання збудника інфекції***, оскільки не є природним середовищем їхнього існування. Чинниками передавання вірусів можуть бути трупи тварин, сировина і продукти тваринництва.

Отже, джерело збудника інфекції – це перша обов'язкова ланка епізоотичного ланцюга, що забезпечує можливість виникнення і поширення вірусної хвороби. Своєчасне виявлення, знешкодження або ліквідація джерела збудника інфекції є одним із важливих протиепізоотичних заходів.

Навіть за наявності джерела збудника інфекції та сприйнятливих тварин жоден випадок вірусної хвороби не виникне, поки не відбудеться передавання вірусу від заражених організмів здоровим. Це здійснюється за допомогою ***механізму передавання збудника інфекції*** – еволюційного пристосування вірусів переміщатися від джерела збудника інфекції до здорових сприйнятливих тварин, що забезпечує нові випадки зараження і безперервність епізоотичного процесу.

За більшості вірусних інфекцій буває ***горизонтальний*** механізм передавання збудника, який складається з *трьох фаз:* 1) виділення вірусу із зараженого організму; 2) перебування його в довкіллі; 3) проникнення вірусу в організм нового хазяїна. З особливостями цих фаз зв'язані конкретні *шляхи передавання вірусів:* аерогенний (повітряно-крапельний), аліментарний (фекально-оральний), трансмісивний (через укуси кровосисних членистоногих) і контактний (через шкіру, видимі слизові оболонки або чинники довкілля).

За вірусних інфекцій трапляється ще один механізм передавання збудника інфекції – ***вертикальний*** *(від батьків потомству)*. На відміну від

горизонтального, він не супроводжується виходом вірусу в довкілля, а реалізується *чотирма шляхами:* внутрішньоутробний, генетичний, перинатальний і лактогенний (це висвітлено в підпункті 2.1.3. «Шляхи проникнення вірусів у організм», див. с. 97).

Отже, шляхи передавання вірусів дуже різноманітні. При проведенні протиепізоотичних заходів особливу увагу слід звертати на виявлення цих шляхів і розрив механізму передавання збудника інфекції.

Третьою обов'язковою ланкою епізоотичного ланцюга є ***сприйнятливі тварини***. Забезпечення резистентності поголів'я до конкретного збудника інфекції за допомогою вакцинації або пасивної імунізації є важливим протиепізоотичним заходом.

2.2.3. Екологічна роль вірусної персистенції, кровосисних членистоногих і хребетних

Виникнення, розвиток і згасання епідемій та епізоотій визначаються характером взаємодії між популяціями збудника інфекції та сприйнятливого хазяїна. У процесі еволюції склалися найвдаліші для збереження виду взаємозв'язки між вірусами і природними хазяями. Це найчастіше відповідає середньому рівню вірулентності вірусу і сприйнятливості організму. У багатьох випадках оптимальним для вірусної популяції типом взаємовідносин із хазяями є *вірусна персистенція – хронічні й латентні інфекції,* що характеризуються тривалим перебуванням вірусу в організмі. Особливе значення такий тип взаємовідносин має в період, несприятливий для передавання цього збудника і для стану популяції хазяїна, який є одночасно ідеальним сховищем вірусу і найдосконалішим засобом його поширення. Водночас із вірусоносійством хазяїн набуває захисту від гострої інфекції гомологічним вірусом. Персистенція вірусів у організмі птахів і кажанів забезпечує дисемінацію адаптованих збудників на великі території в період сезонних міграцій. Хронічні й латентні інфекції відіграють вирішальну роль у занесенні вірусів у нові регіони та збереженні їх у міжепідемічний і міжепізоотичний періоди. Епідемії та епізоотії – лише епізоди в житті вірусних популяцій. Вірусна персистенція іноді призводить до зміни властивостей вірусної популяції, зокрема до зниження або підвищення патогенних властивостей збудника.

Серед вірусів людини і тварин численну екологічну групу становлять *арбовіруси* (понад 500 видів), які передаються через укуси ***кровосисних членистоногих***. Найбільше значення в поширенні арбовірусних інфекцій мають

комарі, від яких ізольовано близько 56 % всіх арбовірусів (понад 230 видів), і *кліщі*, від яких виділено близько 25 % арбовірусів (понад 100 видів).

Передавання вірусів кровосисними членистоногими здійснюється *різними шляхами.* Кліщі можуть заражатися аліментарно в процесі метаморфозу (у фазі личинки, німфи та імаго) і передавати віруси вертикальним шляхом: трансоваріально (через яйце) і трансфазово. При цьому вони функціонують не лише як переносники, але й як резервуар арбовірусів у природних вогнищах. Личинки комарів заражаються аліментарно, передаючи вірус лялечці та імаго. У комарів можливий статевий шлях зараження і зрідка – трансоваріальний.

Значення переносників у резервації й циркуляції арбовірусів у природі визначають такі *основні критерії:* 1) здатність вірусу до репродукції в тканинах кровосисогох членистоногого за тієї чи іншої температури і мінімальної дози інфікування; 2) здатність вірусу долати бар'єри стінки кишечнику і слинного апарату з накопиченням у слині в достатній концентрації для зараження хребетного при укусі; 3) висока щільність популяції переносника.

Іксодові кліщі є ефективними переносниками і резервуаром до 15 % арбовірусів (близько 70 видів) завдяки тривалому циклу метаморфозу (до 5 років), здатності до трансфазового і трансоваріального передавання збудників. Вони поширені на всіх континентах і здебільшого є трихазяїнними паразитами. Особливо велике значення іксодових кліщів в умовах помірного кліматичного поясу.

З *аргасовими кліщами* зв'язано до 10 % арбовірусів (близько 40 видів). Аргасові кліщі належать до кровососів, які підстерігають у сховищі. Для них характерна поліфагія, тобто властивість харчуватися на будь-якому хребетному – від рептилії до людини. Аргасові кліщі здатні до тривалого голодування (понад 9 років), життєвий цикл досягає 20–25 років. Багато видів аргасових кліщів тісно пов'язані з птахами, що створює можливість трансконтинентального занесення арбовірусів.

Від *гамазових кліщів* виділено близько 10 арбовірусів, проте здатність їх до трансмісивної передачі збудників поки що не доведена. Разом з тим гамазові кліщі можуть брати участь у циркуляції деяких арбовірусів принаймні як механічні переносники.

Ефективними переносниками деяких арбовірусів є *мокреці* (понад 15 видів) і *москіти* (понад 35 видів).

Хоч в екології арбовірусів основну роль відіграють членистоногі, періодичне включення в паразитарну систему третього члена – ***хребетних*** –

корисно для вірусної популяції. Це створює умови для збагачення її генофонду і призводить до освоєння нових екологічних ніш.

Епізоотичне та епідемічне значення різних видів хребетних визначається сукупністю *обставин:* 1) характер контактів із кровосисними членистоногими; 2) сприйнятливість до вірусів, зокрема розвиток вірусемії, достатньої для зараження кровосисних членистоногих; 3) ступінь щільності популяції; 4) напрямок сезонних міграцій; 5) здатність підтримувати персистенцію вірусів; 6) ступінь контакту з людиною і свійськими тваринами (синантропність).

Птахи відіграють провідну роль не лише в резервації вірусів у природних вогнищах, але й в їхньому транспортуванні на величезні відстані під час сезонних міграцій. В еволюційному плані птахи – один із найдревніших резервуарів збудників інфекційних хвороб, у тому числі вірусної етіології.

Птахи мають винятково важливе значення в резервації та поширенні *арбовірусів*. Від птахів та їхніх ектопаразитів (іксодових й аргасових кліщів) виділено понад 100 арбовірусів, зокрема віруси східного, західного і венесуельського енцефаломієлітів коней, японського та кліщового енцефалітів, геморагічної гарячки Крим – Конго. Птахи відіграють велику роль у циркуляції *вірусу грипу А*, будучи основним його резервуаром у природі, а також *ортоавулавірусу птахів 1* (збудника ньюкаслської хвороби).

Важливу роль в екології вірусів відіграють ***дикі ссавці***. З *кажанами* зв'язано близько 40 арбовірусів. Окремі види кажанів подібно до птахів здійснюють сезонні міграції. Кажани поширені повсюдно, щільність їхніх популяцій висока, багато видів тяжіють до синантропних біоценозів. У кажанів розвивається тривала вірусемія, існує регулярне трансплацентарне передавання вірусів. Усі ці обставини зумовлюють важливе епідемічне та епізоотичне значення кажанів у циркуляції й особливо в резервації адаптованих до них вірусів. Зокрема, кажани є природним резервуаром збудників таких небезпечних вірусних інфекцій, як геморагічна гарячка Марбург і, можливо, Ебола та енцефаліти Ніпах і Хендра.

З *гризунами* (миші, пацюки, вивірки, вовчки) встановлено зв'язок близько 100 арбовірусів. Повсюдне їхнє поширення, висока щільність популяцій, тісні контакти з кровосисними членистоногими, висока чутливість до зараження, схильність до персистенції вірусів із трансплацентарним передаванням, синантропність багатьох видів – усе це визначає винятково важливе значення гризунів у підтриманні природних вогнищ арбовірусів. Зокрема, з гризунами екологічно пов'язані такі небезпечні збудники, як лімфоцитарного хоріоменінгіту і геморагічних гарячок –

південно-американських (Ласса, болівійська, венесуельська, аргентинська, бразилійська), з нирковим синдромом і, можливо, Ебола.

В екології деяких вірусів важлива роль належить *приматам,* які є резервуаром збудників гарячок Чікунгунья, О'ньонг-ньонг, денге джунглів, лісу Семліки, жовтої гарячки джунглів, геморагічної гарячки Марбург.

Природні вогнища сказу в різних частинах світу підтримуються за рахунок *лисиць, вовків, шакалів, кажанів* та інших диких тварин.

В екології деяких вірусів важлива роль належить *свійським тваринам*, зокрема свиням (вірус японського енцефаліту) і коням (віруси венесуельського, східного і західного енцефаломієлітів коней). *Холоднокровні тварини* (змії, жаби) теж мають певне екологічне значення, зокрема в резервації вірусу західного енцефаломієліту коней.

Щільність популяції хазяїна є однією з важливих умов спалаху вірусного захворювання. Тваринницькі господарства промислового типу з високою концентрацією поголів'я підлягають загрозі виникнення епізоотії та створюють передумови для розвитку епідемічних спалахів. Наприклад, інтенсивний розвиток свинарства в Японії призвів до різкого збільшення циркуляції вірусу японського енцефаліту. Регулярні спалахи гарячок Західного Нілу і Сіндбіс у ПАР тісно пов'язані зі зростанням поголів'я курей на птахофабриках. Поширення венесуельського енцефаломієліту коней серед населення Венесуели, Колумбії, країн Центральної Америки і на півдні США зв'язано з попередніми епізоотіями серед коней.

2.2.4. Спільність збудників вірусних інфекцій людини і тварин

Здатність до ураження одними і тими самими або близькими вірусами людини і тварин особливо яскраво проявляється серед ***екологічної групи арбовірусів.*** До неї входять понад 500 видів, зареєстрованих у Міжнародному каталогу арбовірусів, що належать в основному до восьми родин: *Togaviridae, Flaviviridae, Hantaviridae, Nairoviridae, Peribunyaviridae, Phenuiviridae, Reoviridae* і *Rhabdoviridae.*

Арбовіруси є збудниками природно-вогнищевих інфекцій із трансмісивним шляхом передавання. Багато з них спричинюють серед сільськогосподарських тварин спустошливі епізоотії зі значними економічними збитками, наприклад, африканська чума коней, африканська чума свиней, блутанг, гарячка долини Ріфт, хвороба Найробі.

Не менше 100 арбовірусів є патогенними для людини. Це, зокрема, збудники різноманітних гарячок (денге, О'ньонг-ньонг, жовта, неаполітанська

москітна, омська геморагічна, долини Ріфт, Західного Нілу), енцефаломієлітів коней (венесуельський, східний, західний), енцефалітів (кліщовий, каліфорнійський, японський, Сент Луїс, долини Муррей).

Людина в більшості випадків є тупиком у циркуляції вірусів, хоча існує чимало винятків (гарячки жовта, неаполітанська москітна, денге, Чікунгунья, О'ньонг-ньонг), коли в певні періоди переважає антропонозний цикл циркуляції. Клінічний прояв арбовірусних інфекцій у людини характеризується трьома основними синдромами: системна і геморагічна гарячки та енцефаліт.

Родина Arenaviridae включає 39 видів вірусів, які є збудниками природно-вогнищевих інфекцій та екологічно зв'язані з гризунами. Для людини патогенними є 10 маммаренавірусів.

Маммаренавірус лімфоцитарного хоріоменінгіту має глобальне поширення серед хатніх мишей, персистуючи в них упродовж усього життя і виділяючись з екскретами в навколишнє середовище. У людини за аерогенного або аліментарного зараження розвивається серозний менінгіт, а за внутрішньоутробного зараження – гідроцефалія плоду, зрощення мозкових оболонок, менінгоенцефаліт.

Усі інші маммаренавіруси поширені серед диких і напівсинантропних гризунів у Південній Америці та Африці. *Маммаренавіруси Ласса, Мачупо, Гуанаріто, аргентинський і бразилійський* належать до групи найнебезпечніших для людини вірусів, спричинюючи південноамериканські геморагічні гарячки (Ласса, болівійська, венесуельська, аргентинська, бразилійська) з високою летальністю. Причиною епідемічних спалахів є міграція гризунів у людське житло або контакт із ними під час сільськогосподарських робіт. Люди заражаються через їжу, воду, повітря, пошкодження шкіри, які контаміновані екскретами гризунів, у основному сечею.

З ***родини Rhabdoviridae*** інтерес викликає *ліссавірус сказу*. Повсюдно у світі переважають дикі природні вогнища рабічної інфекції. Основним резервуаром ліссавірусу сказу в Європі, азійській частині РФ і Північній Америці є *лисиці*, які спричинюють 60–85 % випадків захворювання. Середня щільність популяції лисиць 5 гол. і більше на 250 га забезпечує високий рівень підтримання і поширення епізоотії. У 40–80 % заражених лисиць перебіг сказу хронічний і латентний, що підтримує циркуляцію вірусу в природі.

Крім лисиць, резервуаром збудника в Європі, Азії і Північній Америці є *вовки, куниці, гризуни,* у США – *скунси, єноти-полоскуни*, в Центральній і Південній Америці – *кажани* (вампіри, комахоїдні та м'ясоїдні), в Південній Азії та Північній Африці – *шакали,* в Африці – *мангусти,* в Арктиці – *песці.*

Дикі тварини передають вірус при укусах, причому виділення збудника зі слиною починається за 10 діб до появи клінічних ознак. Людина і сільськогосподарські тварини є випадковою ланкою в природному вогнищі. Найбільшу небезпеку для людей становлять собаки і коти, хоча кількість випадків сказу серед них приблизно в 9 разів менша, ніж серед диких тварин.

Родина Orthomyxoviridae. Вірус грипу А дуже поширений серед людей і тварин. Людські штами в природних умовах уражають свиней, собак, коней, ВРХ, свійських і диких птахів. Майже кожна епідемія грипу супроводжується вкоріненням збудника в популяції свійських і диких тварин (включаючи птахів) із тривалою автономною циркуляцією. У тварин, які контактували з хворими людьми, грипозна інфекція протікає субклінічно, але й можуть виникнути епізоотії зі значними збитками. Хрестоматійний приклад – перший спалах грипу свиней у США в 1918 р. під час пандемії «іспанки».

У природних умовах *основним резервуаром вірусу грипу А є перелітні птахи*, серед яких поширено безсимптомне вірусоносійство в кишечнику і клоаці. Масове виділення вірусу грипу А з послідом диких птахів у місцях гніздування призводить до забруднення навколишнього середовища, особливо водойм. Це створює додаткові умови для розсіювання вірусу грипу А в біосфері.

Одночасно з епідемічними штамами, серед свійських тварин можуть циркулювати епізоотичні штами. У тварин встановлено *міжвидове передавання вірусу грипу А.* Так, пташині штами здатні спричинити захворювання у свиней, коней, собак, котів, тигрів, норок, куниць, кролів, пацюків, китів, котиків і тюленів. Штами вірусу свиней можуть уражати індиків. Зареєстровано численні випадки зараження людей (із летальними наслідками) штамами вірусу свиней і птахів. В організмі тварин (зокрема свиней) та особливо птахів можуть виникнути рекомбінанти (гібриди) між дикими й епідемічними штамами. Деякі з цих рекомбінантів за певного поєднання генів можуть стати родоначальниками нових пандемічних штамів вірусу грипу А.

Пріонові інфекції. Яскравим прикладом спільності збудників інфекційних хвороб тварин і людини є трансмісивні губчастоподібні енцефалопатії. Пріони здатні долати видовий бар'єр. Трансмісивна енцефалопатія норок виникає при поїданні непроварених нутрощів і голів овець, інфікованих збудником скрейпі. Губчастоподібна енцефалопатія ВРХ набула епізоотичного поширення у Великій Британії з 1986 р. унаслідок застосування в раціоні тварин м'ясокісткового борошна, виготовленого з туш хворих на

скрейпі овець. Губчастоподібна енцефалопатія котів розвивається внаслідок згодовування консервів або м'яса хворої ВРХ. Встановлено безпосередній зв'язок між губчастоподібною енцефалопатією ВРХ і хворобою Крейтцфельдта – Якоба в людей.

2.2.5. Еволюція вірусів

В епоху науково-технічного прогресу еволюція вірусів протікає значно швидше, ніж раніше, у зв'язку з прискореними темпами антропогенного перетворення біосфери. Еволюція вірусів у природі йде в різних напрямках, основні з них – це *зміна антигенних, імуногенних* та *патогенних властивостей вірусів,* а також *поява нових вірусів*.

Яскравим свідченням цього еволюційного процесу є *вірус грипу А*. Йому властива унікальна мінливість поверхневих антигенів – Н і N, до яких в організмі утворюються вірусонейтралізувальні антитіла. Встановлено 18 підтипів Н і 11 підтипів N, поєднання яких зумовлює велику кількість антигенних варіантів вірусу грипу А (не менше 46). Основна маса їх циркулює серед птахів, особливо качок. В основі змін антигенної структури вірусу грипу А лежать такі *генетичні процеси:* антигенний дрейф, антигенний шифт та адаптивні мутації.

Антигенний дрейф зумовлений крапковими мутаціями генів Н і N і виражається поступовими й незначними змінами поверхневих антигенів, що відбуваються під впливом колективного імунітету. Антигенний дрейф знижує специфічність постінфекційних антитіл.

Антигенний шифт – це глибокі зміни генів Н і N, що призводить до повної заміни одного або обох поверхневих антигенів. У результаті утворюється цілком новий антигенний варіант вірусу, який зазвичай спричинює пандемію, оскільки в людей практично відсутній імунітет. У міру формування імунного прошарку пандемія йде на спад.

Ось хронологія появи антигенних шифтів вірусу грипу А:

1918–1920 рр. – антигенний варіант H1N1 (іспанський грип);

1957–1958 рр. – антигенний варіант H2N2 (азійський грип);

1968–1969 рр. – антигенний варіант H3N2 (гонконгівський грип);

1977–1978 рр. – антигенний варіант H1N1 (російський грип);

2009–2010 рр. – антигенний варіант H1N1 pdm09 (свинячий грип).

Яка причина антигенного шифту? Виникнення нових пандемічних штамів вірусу грипу А в природних умовах є результатом рекомбінації між вірусами, які циркулюють серед людей і тварин. Геном вірусу грипу

А представлений одноланцюговою фрагментованою РНК, яка складається з 8 фрагментів. За змішаної інфекції клітин відбувається обмін фрагментами геномів між двома штамами вірусу, внаслідок чого вірусне потомство отримує генетичний матеріал з обох джерел.

Як показав генетичний аналіз, пандемічні штами вірусу грипу А, які спричинили пандемії 1957–1958 і 1968–1969 рр., з'явилися внаслідок рекомбінації людських і пташиних штамів.

Новизна антигенної структури вірусу грипу А стає вирішальним фактором у формуванні нового пандемічного штаму тільки в поєднанні з високою вірулентністю для людини, що генетично детерміновано. Численні антигенні варіанти вірусу грипу А ссавців і птахів є непатогенними для людей, незважаючи на їхню абсолютно нову антигенну структуру для існуючого колективного імунітету. Патогенними для людини є три антигенні варіанти: H1N1, H2N2 і H3N2. З 1997 р. зареєстровано численні випадки зараження людей пташиними штамами вірусу грипу А інших антигенних варіантів, зокрема H5N1, H7N7, H7N9, H9N2.

Пандемічний штам вірусу грипу А може виникнути не лише в результаті рекомбінацій, але й ***адаптивних мутацій***, які з'являються внаслідок зараження людини або ссавців пташиним штамом вірусу. Встановлено, що вірус «іспанки» з'явився внаслідок адаптивних мутацій пташиного штаму в організмі свиней або людини.

Повернення в активну циркуляцію антигенного варіанту H1N1 у 1977 р. і 2009 р. свідчить про те, що збудники минулих пандемій та епідемій не зникають. Вони зберігаються в популяціях людей, свійських і диких тварин та періодично повертаються з новою силою, коли імунний прошарок населення знизиться до критичного рівня.

Усі нові епідемічно активні штами вірусу грипу А спочатку з'являються в зоні Південно-Східної Азії, де поєднуються дуже важливі екологічні особливості: 1) наявність у басейні Тихого океану величезних скупчень мігрувальних птахів – основного резервуару вірусу грипу А в природі; 2) висока щільність популяцій людей і тварин. У разі занесення вірусу з достатньо широкою екологічною пластичністю колосальна чисельність населення деяких азійських районів є тим «горючим матеріалом», що підвищує шанси селекції штаму, який має епідемічну потенцію, з його закріпленням у наступних пасажах і подальшим усезростаючим поширенням.

Еволюція різних вірусів у природі має свої особливості. Одним із важливих аспектів еволюційного процесу є *зміна патогенності існуючих вірусів* (наприклад, збудників міксоматозу, ньюкаслської хвороби) і *поява нових,*

раніше невідомих вірусів. Нові віруси з'являються часто, що можна пояснити такими основними механізмами: 1) зміна екології місцевості; зазвичай це пов'язано з початком сільськогосподарських робіт чи війною, коли люди змушені контактувати з переносниками або тимчасовими хазяями вірусів; 2) потрапляння неімунних осіб в ендемічні райони, де місцеве населення має популяційний імунітет; 3) зміни властивостей вірусів, пов'язані з обміном генів із вірусами рослин, комах або диких тварин; 4) поява нових стабільних мутантів існуючих вірусів.

Відомо багато нових хвороб, що з'явилися у зв'язку зі зміною екології (кліщовий енцефаліт, геморагічні гарячки Крим – Конго, омська, аргентинська та ін.). Освоєння «диких» територій завжди пов'язано із загрозою виникнення спалахів арбовірусних інфекцій за рахунок як відомих, так і поки що не виявлених збудників. Ситуація ускладнюється тією обставиною, що популяційний імунітет у новоприбулих контингентів відсутній. Ці обставини зумовлюють необхідність завчасного прогнозування й обстеження територій, які підлягають освоєнню.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Для чого потрібно вивчати екологію вірусів? **2.** Які антропогенні чинники мають вплив мають на екологію вірусів? **3.** Що таке екологічні ніші вірусів? **4.** Який механізм виникнення і поширення вірусних інфекцій та передавання збудників? **5.** У чому полягає екологічне значення персистенції вірусів? **6.** Яку роль відіграють кровосисні членистоногі та хребетні в екології вірусів? **7.** Охарактеризуйте спільність збудників вірусних інфекцій тварин і людини. **8.** Як відбувається еволюція вірусів у сучасних умовах?

ТЕМА 2.3. ПРОТИВІРУСНИЙ ІМУНІТЕТ

2.3.1. Особливості противірусного імунітету

Імунітет – це сукупність процесів, спрямованих на захист організму від генетично чужорідних субстанцій і збереження постійності внутрішнього середовища (гомеостазу).

Чинники і механізми противірусного імунітету мають свої особливості, що відрізняють їх від імунних реакцій щодо бактерій та інших патогенів тваринного і рослинного походження. Ці особливості визначаються

природою вірусів, їхнім абсолютним внутрішньоклітинним паразитизмом на генетичному рівні. Вірусна інфекція – це насамперед інфекція чутливих клітин. Взаємодія вірусу і сприйнятливих клітин лежить в основі патогенезу вірусного захворювання. Поза клітинами віруси можуть зберігати життєздатність, але не здатні розмножуватися, бо є неклітинними формами життя і не мають власних систем синтезу протеїнів.

Імунні реакції організму на позаклітинній вірус подібні до реакцій на бактерії та їхні токсини: спрямовані безпосередньо на патоген. Захисні реакції на внутрішньоклітинні стадії морфогенезу вірусу діють опосередковано через клітини, і тільки так гальмується репродукція вірусу з наступним звільненням від нього організму. *Захист клітин від вірусної генетичної інформації та пригнічення репродукції вірусу є кардинальною особливістю протівірусного імунітету.* Відмічаючи його специфіку, не слід забувати, що захисні реакції організму, спрямовані проти вірусів, підкоряються загальним імунологічним закономірностям. Антигени, імунокомпетентні клітини та антитіла лежать в основі специфічної імунної відповіді стосовно будь-яких генетично чужорідних агентів, у тому числі й вірусів.

Імунні реакції організму проявляються на різних стадіях патогенезу на *трьох лініях захисту:*

1) біля вхідних воріт інфекції (перший бар'єр – інгібітори та секреторні антитіла класу IgA, які нейтралізують вірус у місці проникнення);

2) на шляху просування вірусу до чутливих клітин (інгібітори, гуморальні антитіла класів IgG та IgM, комплемент);

3) усередині заражених клітин (індукція антивірусного стану в клітинах під дією інтерферону; деструкція заражених клітин під дією антитіл, цитотоксичних Т-лімфоцитів, макрофагів).

Противірусний імунітет – це єдиний, нероздільний процес взаємодії клітинних, гуморальних і загальнофізіологічних реакцій організму, починаючи від моменту зараження та закінчуючи повною ліквідацією інфекції.

2.3.2. Характеристика вірусів як антигенів

Антигени – це речовини, які несуть ознаки генетичної чужорідності та при введенні в організм спричинюють розвиток специфічних імунних реакцій.

Віруси як антигени принципово не відрізняються від інших повноцінних антигенів (наприклад, бактерій і токсинів) і є добрими стимуляторами клітинних та гуморальних імунних реакцій.

Антигенна будова вірусів, незважаючи на відносну простоту їхньої організації, складна і визначається кількістю структурних протеїнів. Кожний вірусний протеїн має кілька *антигенних детермінант,* або *епітопів*. Це ділянки (10–20 амінокислот), які здатні взаємодіяти з антитілами та антигенозв'язувальними рецепторами лімфоцитів. Епітопи визначають *специфічність антигену*.

Вірусні антигени розрізняються за ступенем специфічності їхніх епітопів. Є штамо-, типо-, видо-, групо- і підгруповоспецифічні антигени.

У процесі інфекції або імунізації можуть вироблятися антитіла до всіх антигенів, які входять у структуру віріона. Проте різні вірусні антигени відіграють неоднакову роль в імуногенезі. Першочергове значення для імунітету мають *поверхневі антигени*, розміщені в зовнішній оболонці віріона (капсидній чи суперкапсидній залежно від складності його організації) й особливо *прикріплювальні протеїни*, через які відбувається адсорбція вірусу на плазмолемі клітини. Нейтралізація антитілами саме цих антигенів позбавляє вірус здатності приєднуватися до чутливої клітини та інфікувати її. Антигени, не зв'язані з прикріплювальними протеїнами, й особливо внутрішні антигени, локалізовані в глибинних структурах віріона, мають значення не стільки для імунітету, скільки для патогенезу вірусної інфекції, будучи токсигенними і нерідко алергенними речовинами. Антитіла до внутрішніх антигенів (наприклад, серцевинних протеїнів), які можуть утворитися в процесі інфекції, мають діагностичне значення. Вірусні антигени, що індукують утворення захисних (вірусонейтралізувальних) антитіл, називаються *протективними*.

Антигенна активність властива і численним ензимам, які виявлені в складі віріонів, але тільки вірусоспецифічним. Ензими клітинного походження не є чужорідними для організму і тому не індукують імунної відповіді.

Поверхневі антигени вірусів є лабільнішими, ніж внутрішні, що пов'язано з еволюційним пристосуванням вірусів долати дію імунних факторів. Яскравою ілюстрацією цього слугує унікальна мінливість H і N у вірусу грипу А – антигенний дрейф та антигенний шифт.

У складно організованих вірусів виявляють у структурі суперкапсидної оболонки *антигени клітини-хазяїна*, де відбувалася їхня репродукція. Так виникає *антигенна мімікрія*, що призводить до зниження імунної відповіді. Крім того, в складі деяких вірусів (зокрема грипу А і натуральної віспи) містяться так звані *гетерогенні антигени*, ідентичні певним тканинним протеїнам хазяїна. Так, у вірусу грипу А виявлено антигени, що

визначають А групу крові людини. Явища антигенної мімікрії та гетерогенності зумовлюють персистенцію вірусів у організмі, даючи їм змогу уникати дії захисних механізмів. Ці феномени пояснюють також слабкість імунної відповіді за деяких вірусних захворювань. За рахунок антигенів клітини-хазяїна, які знаходяться в складі віріонів, можуть виникати перехресні імунологічні реакції, що створює труднощі в ідентифікації збудника і призводить до помилкових діагностичних висновків.

Вірусіндуковані антигени. Заражені клітини містять зазвичай, окрім віріонів, різні вірусні протеїни-антигени, які з'являються в результаті надлишкового синтезу вірусних компонентів або внаслідок деструкції віріонів, наприклад, у макрофагах. Антигенні властивості мають також неструктурні вірусні протеїни, що утворилися в процесі інфекції.

Вірусні антигени локалізуються в різних частинах клітини (залежно від природи вірусів) – в ядрі, ядерці, цитоплазмі, плазмолемі, що доступно візуальному спостереженню завдяки використанню РІФ або імунопероксидазного методу ІЕА. Вірусні антигени, які розташовані на поверхні плазмолеми клітин, можуть стати об'єктом дії антитіл, сенсибілізованих лімфоцитів і макрофагів.

У клітинах, заражених онкогенними вірусами (зокрема поліомавіруси людини 1 і 2, поліомавірус макак-резусів 1, вірус саркоми Рауса), можуть з'явитися неструктурні вірусні протеїни, що є ознакою клітинної трансформації. *Т-антигени* (від лат. tumor – пухлина) виникають на початкових стадіях репродукції вірусів у ядрі або цитоплазмі інфікованих клітин залежно від того, ДНК- чи РНК-геномний вірус спричинив їхній синтез. *Трансплантаційні антигени* з'являються пізніше на поверхні плазмолеми, коли вже настає трансформація клітин.

Вірусні антигени – віріонні та вірусіндуковані – мають важливе значення для імунітету. Будучи чужорідними для організму, вони стимулюють виникнення клітинних і гуморальних захисних реакцій.

2.3.3. Клітинні чинники противірусного імунітету

Противірусний імунітет залежить передусім від функції *імунокомпетентних клітин (імуноцитів),* які здійснюють імунні реакції. Імуноцити розпізнають вірусні антигени, утворюють стосовно них специфічні антитіла та інші речовини, що пригнічують інфекційну активність вірусів, а також діють безпосередньо на віруси й уражені клітини, спричинюючи їхню деструкцію.

Імунною системою є лімфоїдна тканина, яка представлена лімфоїдними органами і скупченнями лімфоїдних клітин у різних тканинах організму. Основна функція лімфоїдної тканини – розпізнавання та елімінація (видалення) генетично чужорідних речовин і збереження гомеостазу.

До імунної системи належать: 1) *центральні лімфоїдні органи* – тимус, кістковий мозок, фабрицієва сумка у птахів; 2) *периферійні лімфоїдні органи* – селезінка, лімфатичні вузли, лімфоїдна тканина слизових оболонок і травного каналу (мигдалини, пейєрові бляшки і лімфоїдні фолікули тонкого кишечнику, апендикс), лімфоцити циркулюючої крові.

Центральною фігурою імунної системи є ***лімфоцити***, що походять від стовбурових клітин кісткового мозку. Розрізняють *Т-лімфоцити* (тимусозалежні), які імунологічно дозрівають у тимусі, та *В-лімфоцити* (бурсазалежні), що проходять диференціацію у фабрицієвій сумці в птахів або в кістковому мозку в ссавців.

Т-лімфоцити забезпечують клітинний імунітет та одночасно здійснюють функцію регуляції імунної відповіді. Розрізняють три типи Т-лімфоцитів: Т-хелпери, Т-супресори і цитотоксичні Т-лімфоцити (ЦТЛ).

В-лімфоцити забезпечують синтез антитіл і відповідають таким чином за розвиток гуморального імунітету. Існує п'ять типів В-лімфоцитів, які є попередниками плазматичних клітин, що продукують антитіла класів IgM, IgG, IgA, IgD та Ig E.

Лімфоцити здатні реагувати з конкретним антигеном завдяки експресії на плазмолемі *специфічних рецепторів,* які представлені молекулами імуноглобулінів. Окрім того, лімфоцити мають значну кількість поверхневих антигенних структур, які називаються *маркерами* і визначають функціональні відмінності різних субпопуляцій Т- і В-лімфоцитів.

В імуногенезі бере участь ще одна клітинна популяція – ***макрофаги***, що складають *систему мононуклеарних фагоцитів.* Сюди належать моноцити крові й тканинні макрофаги (гістіоцити), які поширені в організмі: в печінці, селезінці, легенях, лімфатичних вузлах, кістковому мозку, нервовій системі та інших тканинах.

Усі взаємодії імунокомпетентних клітин регулюють медіатори імуногенезу ***цитокіни.*** Це розчинні біологічно активні речовини переважно протеїнової природи, які продукуються лімфоцитами і макрофагами у відповідь на антигенну стимуляцію та виконують посередницьку функцію між імуноцитами. Цитокіни беруть участь у розпізнаванні антигену, активізують або, навпаки, інгібують клітинні чинники імунітету. Медіатори імуногенезу виявляють у сироватці крові, секретах слизових оболонок і тканинах організму.

В основі імуногенезу лежить кооперативна взаємодія різних популяцій імуноцитів. Передумовою цієї взаємодії є ідентичність антигенів ***головного комплексу гістосумісності*** (МНС, від англ. Major histocompatibility complex). Це ділянка ДНК вищих хребетних, що кодує антигени гістосумісності й відіграє важливу роль у відторгненні чужорідного трансплантата. МНС кодує також здатність до імунної відповіді на численні антигени, схильність до певних імунних захворювань, синтез компонентів комлементу. МНС-антигени знаходяться на поверхні клітин усіх вищих хребетних. Спектр молекул МНС унікальний для кожного організму і визначає його біологічну індивідуальність, що дає змогу відрізнити «своє» (гістосумісне) від «чужого» (несумісного).

Схема імуногенезу (рис. 2.2). У складний механізм імунної відповіді першими включаються *макрофаги*. Вони розпізнають антиген, який поступає в організм, поглинають його і розщеплюють на фрагменти під дією лізосомальних ензимів. Фрагменти антигену внаслідок екзоцитозу виставляються на поверхні макрофага і зв'язуються з молекулами МНС. Саме ці комплекси антиген – молекула МНС розпізнаються *Т-хелперами* і слугують сигналом для запуску подальших імунологічних реакцій. Макрофаги продукують медіатор інтерлейкін-1 (ІЛ-1), під впливом якого починають посилено розмножуватися Т-хелпери. Активовані Т-хелпери синтезують ІЛ-2, що слугує сигналом для *В-лімфоцитів*, а цитокіни ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-6 та ІФН-α стимулюють проліферацію В-лімфоцитів та їхню диференціацію в *плазматичні клітини*, які синтезують антитіла до введеного антигену.

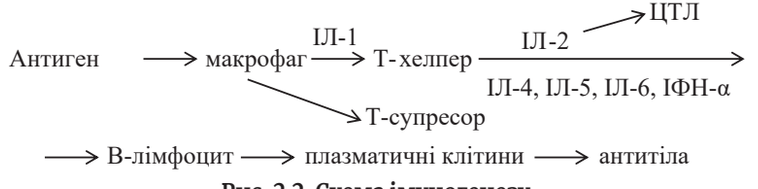


Рис. 2.2. Схема імуногенезу

Отже, Т-хелпери активізують В-лімфоцити. У разі відсутності такого впливу В-система виявляється нездатною до повноцінної імунної відповіді, й можлива поява імунологічної толерантності, коли не виробляються антитіла до конкретного антигену.

Допомога Т-хелперів потрібна також для індукції ***цитотоксичних Т-лімфоцитів*** *(ЦТЛ)*, що з'являються під впливом ІЛ-2. ЦТЛ розпізнають і лізують клітини-мішені, які містять на своїй поверхні чужорідні антигени

(вірусоспецифічні, пухлинні або чужорідні гістосумісності). ЦТЛ звільняють організм від клітин, що продукують вірусне потомство, лізуючи їх. ЦТЛ убивають також ракові клітини, відторгають трансплантати, забезпечуючи таким чином протипухлинний і трансплантаційний імунітет.

Антиген активізує також ***Т-супресори***, які обмежують проліферацію Т- і В-лімфоцитів на різних стадіях імуногенезу і запобігають прояву надмірних форм імунної відповіді, наприклад, алергії. Т-супресори блокують аутоімунні реакції, тобто вироблення антитіл до власних антигенів організму, отже, забезпечують розвиток природної імунологічної толерантності. Порушення функції Т-супресорів може призвести до аутоімунних захворювань та інших форм імунопатології. Т-супресори, як і Т-хелпери, виконують функції головних регуляторів імунної відповіді.

Частина Т- і В-лімфоцитів, стимульованих антигеном, після 2–3 ділень переходить у стан спокою та слугує основою ***імунологічної пам'яті*** – здатності організму давати прискорені й посилені імунні реакції у відповідь на повторне введення антигену. Імунологічна пам'ять може зберігатися роками і властива як клітинному, так і гуморальному імунітету. Т-лімфоцити мають тривалішу імунологічну пам'ять.

Окрім Т- і В-лімфоцитів, в імуногенезі бере участь ще одна популяція лімфоцитів із цитотоксичними властивостями – ***природні кілери (NK-клітини)***. Головна їхня ознака – відсутність основних поверхневих маркерів Т- і В-лімфоцитів. NK-клітини здатні спонтанно знищувати пухлинні й заражені вірусом клітини без попередньої антигенної стимуляції. Це основні клітини організму, які здійснюють протипухлинний захист. Окрім спонтанної цитотоксичності, природні кілери беруть участь в антитілозалежному лізисі заражених вірусом клітин.

У противірусному імунітеті важливе значення мають ***макрофаги***. Вони не тільки беруть участь у розпізнаванні, первинній обробці та представленні антигену Т-лімфоцитам. Макрофаги виконують самостійну важливу функцію щодо звільнення організму від вірусів. Вони здатні захоплювати цілі віріони, комплекси вірусів з антитілами, заражені клітини та перетравлювати їх за допомогою лізосомальних ензимів. Значно вища фагоцитарна активність відмічається в макрофагів, отриманих від імунних тварин. На відміну від Т- і В-лімфоцитів, дія макрофагів на віруси неспецифічна.

Макрофаги лімфатичних вузлів, селезінки, печінки, легень, кісткового мозку, внутрішньої стінки судин та інших органів здійснюють надзвичайно важливу бар'єрну функцію. Вони не пропускають вірус у кров і лімфу. Віремія виникає, якщо вірусу вдається подолати місцеві бар'єри

макрофагів. Макрофаги забезпечують очищення крові, захоплюючи і перетравлюючи віріони. Особливо активні макрофаги в присутності специфічних антитіл, які аглютинують віріони і тим самим сприяють процесу їхнього фагоцитозу та дезінтеграції.

Клітинний імунітет стосовно вірусів не обмежується участю лише імуноцитів. Природою клітин, з якими взаємодіє вірус, визначається ***видовий (спадковий, вроджений) імунітет***. В основі його лежить відсутність в організмі чутливих клітин, здатних забезпечити репродукцію вірусу. Нагадаємо, що сприйнятливість клітин до вірусу у свою чергу зумовлюють два основні чинники: 1) наявність на плазмолемі клітин специфічних рецепторів, які забезпечують адсорбцію віріонів; 2) присутність у клітинах ензимів, потрібних для депротеїнізації. Якщо якогось із цих чинників немає, клітини є нечутливими до вірусу.

Проте не завжди спостерігається відповідність між вродженою несприйнятливістю до вірусів тварин *in vivo* та резистентністю клітин їхніх тканин *in vitro*. Наприклад, до морбіллівірусу кору чутливі клітини нирок мурчака і кроля, курячі фібробласти, але спричинити експериментальну інфекцію кору в цих тварин не вдається. В організмі резистентних тварин складаються інакші взаємовідносини між вірусом і клітинами, ніж *in vitro*, завдяки функції інших факторів видового імунітету (інгібітори, температура тіла тощо).

Видовий імунітет генетично детермінований і передається за спадковістю. Наприклад, тварини резистентні по альфагерпесвірусу людини 3, який спричинює вітряну віспу та оперізувальний лишай; на класичну та африканську чуму свиней хворіють тільки свійські й дикі свині.

Існує різний ступінь напруженості видового імунітету – від абсолютної резистентності до відносної, яку можна подолати за допомогою різноманітних чинників: висока доза зараження, рентгеноопромінення, обробка кортизоном тощо. Наприклад, пестівірус С (збудник класичної чуми свиней) можна адаптувати до організму кроля тривалими серійними пасажами.

Видовий імунітет залежить від віку, зокрема, до вірусу ящуру чутливі новонароджені білі миші та кролі, а дорослі тварини – резистентні. На природну резистентність до вірусів істотний вплив мають, окрім спадкових і вікових, гормональні чинники.

2.3.4. Гуморальні чинники противірусного імунітету

До гуморальних чинників противірусного імунітету належать *антитіла, інгібітори, комплемент, інтерферони* та інші *медіатори імуногенезу*,

що знаходяться в сироватці крові, секретах слизових оболонок і тканинах організму.

Антитіла

Антитіла – це імуноглобуліни (Ig), які синтезуються в організмі у відповідь на введення антигену і здатні специфічно взаємодіяти з ним. Антитіла виробляються В-лімфоцитами в тісній взаємодії з Т-лімфоцитами і макрофагами.

У противірусному імунітеті головну роль відіграють імуноглобуліни класів IgM, IgG та Ig A. Їх виявляють у сироватці крові, секретах слизових оболонок, молозиві, молоці, слині, сльозах, спинномозковій рідині.

Імуноглобуліни сумарно становлять третину всіх білків сироватки крові людини і тварин. З них 70–80 % припадає на ***IgG***, які мають важливе значення в гуморальному імунітеті, передусім за генералізованих інфекцій та особливо в захисті від повторного зараження.

IgM становлять 5–10 % сироваткових імуноглобулінів. Вони першими з'являються в організмі після антигенної стимуляції, отже, є антитілами первинної імунної відповіді. Виявлення IgM використовують для ранньої діагностики вірусних інфекцій.

IgA складають 10–15 % сироваткових імуноглобулінів. Це основний клас антитіл, що знаходиться в секретах слизових оболонок респіраторного і травного трактів, молоці, слині, сльозах. Секреторні IgA зумовлюють формування місцевого імунітету слизових оболонок і таким чином забезпечують захист від вірусів, які проникають в організм через дихальні шляхи або травний канал.

При введенні в організм тварини або людини антигену синтез специфічних антитіл розвивається в певному порядку. За первинного поступлення антигену першими з'являються IgM (на 3-тю – 5-ту добу), потім – IgG (на 5–14-ту добу) і нарешті – IgA (на 15-ту – 21-шу добу). У разі повторного введення антигену швидко та інтенсивно починають синтезуватися IgG (на 3-тю – 5-ту добу), а також Ig A. IgM з'являються так само, як за первинної імунної відповіді.

Молекули Ig мають кілька *активних центрів* (IgG – 2, IgA – 2 або 4, IgM – 10), що здатні *специфічно зв'язуватися з антигенними детермінантами*. В основі цієї специфічної взаємодії лежить просторова комплементарність.

Антитіла нейтралізують інфекційну активність вірусів. ***Механізми вірусонейтралізувальної дії антитіл*** різноманітні. Антитіла *зв'язуються*

з вірусними прикріплювальними протеїнами на поверхні віріона, блокують їх, унаслідок чого вірус утрачає здатність адсорбуватися на плазмолемі чутливої клітини. Для просторової блокади прикріплювальних протеїнів необхідно приєднання до одного віріона декількох молекул антитіл. У складно організованих вірусів антитіла також *блокують злиття суперкапсидної оболонки з плазмолемою*. Антитіла здатні *склеювати віріони в конгломерати,* що сприяє їхньому фагоцитозу. Аглютинація вірусів антитілами має фундаментальне значення для усунення вірусемії.

Вірусонейтралізувальна дія антитіл посилюється в присутності комплементу, який приєднується до молекули Ig, зв'язаного з антигеном, і створює додаткові стеричні перешкоди для вірусних прикріплювальних протеїнів. Комплекси вірус – антитіло або вірус – антитіло – комплемент затримуються в бар'єрних органах (лімфатичні вузли, селезінка, печінка тощо) і підлягають деструктивній дії макрофагів та ензимів. У присутності комплементу антитіла можуть спричинити лізис складно організованих вірусів унаслідок необоротних конформаційних змін вірусних глікопротеїнів.

Нейтралізувальна дія антитіл спрямована на позаклітинний вірус. Внутрішньоклітинний вірус є недоступним для антитіл. Однак антитіла разом із комплементом здатні здійснити лізис заражених клітин, якщо на плазмолемі клітин локалізовані вірусні антигени (вірусні глікопротеїни або віріони потомства, що брунькуються). Крім того, антитіла залучаються в інші антитілозалежні цитотоксичні реакції за участю NK-клітин.

За багатьох вірусних захворювань людини і тварин встановлена пряма залежність між титрами гуморальних антитіл і резистентністю організму до зараження. Це стосується насамперед генералізованих інфекцій, які супроводжуються вірусемією (кір, кліщовий енцефаліт, поліомієліт, ньюкаслська хвороба, чума ВРХ, класична чума свиней та ін.). Збігання строків видужання з появою специфічних антитіл у високих титрах використовується для *серологічної (ретроспективної) діагностики* при дослідженні парних сироваток крові, взятих на початку і наприкінці хвороби. Зростання кількості гуморальних антитіл унаслідок вакцинації об'єктивно відображає ефективність проведених щеплень.

У противірусному імунітеті важливу роль відіграють *секреторні IgA*, які забезпечують місцевий імунітет слизових оболонок респіраторного і травного трактів та нейтралізують вірус у місці проникнення. Це особливо важливо за вогнищевих інфекцій (грип, парагрип-3 ВРХ, ротавірусний і коронавірусний ентерити ВРХ), коли основна репродукція збудників відбувається біля вхідних воріт інфекції.

Тривалість і напруженість противірусного імунітету після захворювання бувають різними, що залежить насамперед від імуногенності вірусу та імунологічної реактивності організму. За багатьох генералізованих інфекцій (наприклад, натуральна віспа, кір, чума м'ясоїдних) створюється надійний захист від повторного зараження на численні роки і навіть довічно. За вогнищевих інфекцій (парагрип-3 і РС-інфекція ВРХ) імунітет короткочасний, утрачається через кілька місяців, у зв'язку з чим можливі повторні захворювання. За багатьох інфекцій імунітет *нестерильний:* не запобігає персистенції вірусів у організмі (наприклад, герпетична інфекція людини, вірусна діарея ВРХ, інфекційний ринотрахеїт ВРХ, хвороба Ауєскі).

Інгібітори

Інгібітори – це глікопротеїни, що знаходяться в нормальних сироватках крові, секретах слизових оболонок та різних тканинах організму людини і тварин.

За фізико-хімічними властивостями сироваткові інгібітори поділяються на *термолабільні* й *термостабільні*. Термолабільними є β-*інгібітори*, які інактивуються при 60–62 °С. До термостабільних належать α-*інгібітори,* що втрачають активність при 75 °С, і γ-*інгібітори*, які не руйнуються при 100 °С. Критерієм поділу сироваткових інгібіторів на термолабільні й термостабільні є їхня стійкість до прогрівання при 56 °С упродовж 30 хв. Однак повна інактивація β-інгібіторів відбувається при 60–62 °С упродовж 1 год.

Інгібітори є важливим неспецифічним фактором противірусного імунітету, будучи першим гуморальним бар'єром, що перешкоджає контакту вірусу з чутливими клітинами. Інгібітори *нейтралізують інфекційну* та *гемаглютинувальну активність вірусів* у місці проникнення (в секретах слизових оболонок) і на шляху до чутливих клітин. Взаємодіючи з прикріплювальними протеїнами віріонів, інгібітори спричинюють їхню просторову блокаду, внаслідок чого вірус утрачає здатність адсорбуватися на плазмолемі клітин і проникати в них. Отже, механізм противірусної дії інгібіторів подібний до дії антитіл, тільки має неспецифічний характер. Інгібітори можуть взаємодіяти з вірусом лише за наявності вільних, не нейтралізованих антитілами, прикріплювальних протеїнів.

Присутність інгібіторів у сироватках крові слід враховувати в діагностичній практиці при постановці серологічних реакцій, оскільки

інгібітори можуть імітувати позитивний результат реакції, що призводить до діагностичної помилки. Від термолабільних інгібіторів сироватки звільняють прогріванням при 56–60 °С упродовж 30 хв, а від термостабільних – обробкою каоліном, бентонітом, активованим вугіллям та іншими методами.

Комплемент

Комплемент – це складна система 20 протеїнів сироватки крові, представлена в неактивній формі у вигляді 9 компонентів: С1–С9. Біосинтез окремих компонентів комплементу здійснюється в гепатоцитах, макрофагах і моноцитах крові.

Під впливом утворених комплексів антиген – антитіло відбувається *активація комплементу класичним шляхом*, причому цей процес забезпечують лише два класи антитіл – IgG та Ig M. До молекули Ig послідовно приєднуються компоненти комплементу С142356789 у вигляді протеолітичного каскаду: кожний наступний компонент розщеплюється попереднім. Це призводить у кінцевому результаті до утворення низькомолекулярних продуктів із певною біологічною дією.

Активація основного компонента комплементу С3 забезпечує його фіксацію на клітинній плазматичній мембрані. Утворений комплекс С1423 сприяє фагоцитозу та має істотне значення для лізису. Але тільки приєднання компонентів С5–С9 (так званого *мембрано-атакувального комплексу*) надає комплементу здатності спричинити необоротні пошкодження плазмолеми або суперкапсиду деяких вірусів.

Участь комплементу в противірусному імунітеті різностороння. Комплемент *посилює вірусонейтралізувальну активність антитіл* завдяки утворенню великих за розмірами комплексів антиген – антитіло – комплемент, які зв'язуються з рецепторами макрофагів. Це особливо важливо стосовно IgM, що виникають на ранніх стадіях імунної відповіді та характеризуються низькою афінністю (тобто відносно неміцним зв'язуванням активного центру Ig з антигенною детермінантою). Разом з антитілами комплемент *лізує віруси* із суперкапсидною оболонкою або *інфіковані клітини* з локалізованими на їхній поверхні вірусними антигенами. І, нарешті, комплемент здатний *самостійно лізувати* деякі складно організовані віруси (наприклад, ретровіруси) за відсутності антитіл, зв'язуючись із відповідними вірусними протеїнами.

Інтерферони

Інтерферони *(ІФН)* – це глікопротеїни, що кодуються генетичним апаратом хребетних (від риб до людини). У геномі людини ідентифіковано 20 генів інтерферонів. Здатність виробляти інтерферони властива всім клітинам організму, але найактивнішими його продуцентами є лейкоцити.

Розрізняють *три основні типи* ІФН: 1) ***ІФН-α*** (22 підтипи) – синтезується в основному лейкоцитами, а також макрофагами, моноцитами і В-лімфоцитами; 2) ***ІФН-β*** (5 підтипів) – утворюється в основному в фібробластах та епітеліальних клітинах; 3) ***ІФН-γ*** (2 підтипи) – продукується лімфоцитами (Т-хелпери, NK-клітини).

ІФН спонтанно не продукуються інтактними клітинами, для їхнього утворення потрібні ***індуктори***. Це можуть бути віруси, бактерії або їхні токсини, екстракти з бактерій і грибів, синтетичні речовини (полікарбоксилати, полісульфати, декстрини). Найефективнішими індукторами ІФН є вірусні дволанцюгові РНК (у тому числі реплікативні форми) і синтетичні дволанцюгові полірибонуклеотиди.

Найважливіший індукувальний фактор ІФН – вірусна інфекція. Практично всі віруси можуть спричинити синтез ІФН. Але добрими індукторами ІФН є РНК-вмісні віруси, тоді як ДНК-вмісні віруси (за винятком поксвірусів) – значно слабкіші. Погано індукують ІФН віруси, схильні до тривалої персистенції (наприклад, адено- та герпесвіруси). Інтерферогенна здатність вірусів зростає зі зниженням їхньої вірулентності.

Віруси стимулюють синтез ІФН-α та ІФН-β. ІФН-γ продукується у відповідь на невірусні індуктори: бактеріальні антигени і мітогени.

Синтез ІФН запускається індуктором, що адсорбується на плазмолемі незаражених клітин. У результаті активізуються гени ІФН, і на рибосомах відбувається синтез ІФН, які виходить із клітин. ІФН виявляють у сироватці крові, різних секретах і тканинах за більшості вірусних інфекцій. Максимальне їхнє накопичення встановлено в період вірусемії до утворення значної кількості антитіл. З організму частина ІФН (менш як 10 %) виводиться із сечею, решта – руйнується клітинами.

ІФН властиві *дві основні функції*: противірусна (ІФН-α, ІФН-β) та антипроліферативна (в тому числі протипухлинна й імуномодулювальна).

Механізм противірусної дії ІФН. ІФН самі безпосередньо не діють на вірус – позаклітинний або внутрішньоклітинні стадії його репродукції. Вони впливають на віруси опосередковано через чутливі клітини (до контакту

їх із вірусом). ІФН не виявляють біологічної активності всередині клітин, де вони утворюються. Синтезовані ІФН виходять у позаклітинний простір, зв'язуються зі специфічними рецепторами незаражених клітин і потрапляють шляхом ендоцитозу всередину клітин.

Це призводить до активізації відповідних генів і синтезу ензимів – *протеїнкінази* і *2,5-олігоаденілатсинтетази,* які зумовлюють *антивірусний стан клітин.* Протеїнкіназа блокує трансляцію вірусних іРНК, а 2,5-олігоаденілатсинтетаза активізує рибонуклеазу L на руйнування вірусних іРНК. Отже, в заражених клітинах порушується синтез вірусних структурних протеїнів та ензимів, які здійснюють реплікацію вірусного геному, і репродукція вірусів припиняється. *Блокування трансляції вірусних іРНК та їхнє руйнування* зумовлюють універсальний механізм противірусної дії ІФН (рис. 2.3). У деяких випадках ІФН блокують стадії депротеїнізації та виходу віріонів потомства з клітини.

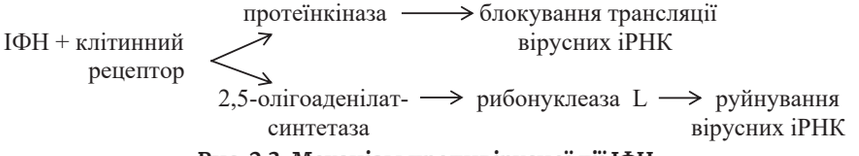


Рис. 2.3. Механізм противірусної дії ІФН

ІФН властива видова специфічність щодо хазяїна, в основі якої лежить, очевидно, специфічність їхньої взаємодії з рецепторами плазмолеми клітини. Наприклад, людський інтерферон діє тільки в організмі людини і неактивний в організмі інших біологічних видів, хоча бар'єри цієї видової специфічності не абсолютні.

ІФН є важливим неспецифічним чинником противірусного імунітету. Вони здатні пригнічувати репродукцію практично всіх вірусів, у тому числі онкогенних. ІФН захищають багато клітин організму від цитопатогенної дії вірусу, але не в змозі повністю ліквідувати вірусну інфекцію.

Крім противірусної дії, ІФН мають сильну ***антипроліферативну активність*** (особливо ІФН-γ). Вони впливають на різноманітні функції клітин: 1) пригнічення розмноження клітин (у тому числі ракових); 2) вплив на клітинну диференціацію (посилення або інгібіція синтезу певних протеїнів та ензимів); 3) вплив на імунну систему (стимуляція або пригнічення імунної відповіді). Антипроліферативна дія ІФН-γ в сотні разів сильніша, ніж в ІФН-α та ІФН-β, у зв'язку з чим його застосовують за комплексної терапії онкологічних захворювань.

За більшості вірусних інфекцій встановлено чітку кореляцію між рівнем ІФН і тяжкістю захворювання. Тому використання готових препаратів ІФН *(екзогенний ІФН)* або стимуляція власних ІФН за допомогою індукторів *(ендогенний ІФН)* є досить ефективним методом профілактики і терапії вірусних інфекцій.

У медичній практиці ІФН успішно застосовують за багатьох вірусних інфекцій (як вогнищевих, так і генералізованих), зокрема при грипі та інших ГРВІ, герпесвірусних інфекціях, гепатиті В, ВІЛ-інфекції. У численних клінічних дослідженнях доведено ефективність використання ІФН при лікуванні таких неоплазій, як рак легень, яєчників, шийки матки, молочної залози, нирок, сечового міхура, меланоми, гепатоми, остеогенної саркоми.

У ветеринарній практиці індукцію ендогенного ІФН стимулюють вакцинні штами багатьох вірусів (зокрема збудників інфекційного ринотрахеїту ВРХ та ньюкаслської хвороби), причому кращий ефект досягається при інтраназальному або аерозольному введенні вакцини. Перспективним є застосування готових препаратів ІФН, отриманих із лейкоцитів і лімфоцитів свиней, ВРХ, овець, кролів, птиці. Розроблено біотехнологію отримання препаратів ІФН-α ВРХ (Бовівірекс), ІФН-γ ВРХ (γ-Бовіферон) і Комбіферон, які показали високу імуномодулювальну та противірусну активність за респіраторних і шлунково-кишкових захворюваннях телят.

2.3.5. Імунопатологічні реакції за вірусних інфекцій та вірусіндукована імуносупресія

Імунна відповідь організму проти вірусів іноді може призводити до тяжких ускладнень і навіть летальних наслідків. Це пов'язано із залученням в імуногенез різних чинників і механізмів та надмірною активацією їх. Унаслідок цього розвиваються ***імунопатологічні реакції***, які, будучи спрямованими проти збудника, водночас спричинюють пошкодження клітин і тканин хазяїна.

За вірусних інфекцій можуть виникати такі імунопатологічні реакції організму: 1) імунокомплексна патологія; 2) імунна деструкція заражених клітин; 3) автоімунні реакції; 4) гіперчутливість сповільненого типу; 5) імунологічна толерантність; 6) імунологічна недостатність (імунодефіцит).

Імунокомплексна патологія. У процесі інфекції можуть виникати *імунні комплекси, в яких вірус зберігає інфекційну активність.* Зазвичай це явище спостерігається за недостатньої концентрації антитіл. Однак їхній надлишок не завжди сприяє інактивації збудника. Тривала циркуляція в організмі

таких імунних комплексів призводить до постійного інфікування чутливих клітин та антигенної стимуляції імуноцитів. У результаті формуються нові імунні комплекси, що містять інфекційний вірус.

Яким чином вірус, асоційований з антитілами, здатний заражати клітини? Імунні комплекси фіксуються на клітинах, які мають рецептори до Fc-фрагмента Ig, що забезпечує адсорбцію та проникнення вірусу в клітину. Парадоксальне посилення репродукції багатьох вірусів (тога-, флаві-, перібун'я-, ханта-, найро-, фенуї-, рабдо- і реовіруси) у присутності антитіл особливо яскраво проявляється при зараженні макрофагів. При цьому антитіла захищають фагоцитований вірус від деструкції лізосомальними ензимами.

Збереження інфекційної активності вірусу в складі імунних комплексів є однією з основних причин виникнення хронічних вірусних інфекцій. За інфекційної анемії коней, африканської чуми свиней та алеутської хвороби норок імунні комплекси відкладаються в різних органах і тканинах, спричинюючи тяжкі ураження їх. Елементи імунокомплексної патології трапляються за більшості вірусних інфекцій і відіграють значну роль в їхньому патогенезі.

Імунна деструкція заражених клітин. Основним механізмом деструкції інфікованих вірусом клітин є *цитотоксична дія Т-лімфоцитів* (ЦТЛ), які з'являються через 1–3 доби після зараження. Проте здатність ЦТЛ руйнувати клітини-мішені може спричинити ураження органів і тканин. Різна дія ЦТЛ – захисна чи пошкоджувальна – залежить від стадії інфекції, на якій вони активізуються. На ранніх етапах патогенезу загибель нечисленних заражених клітин, що знаходяться в основному біля вхідних воріт інфекції, не спричинює порушення гомеостазу і сприяє видужанню. Проте на пізніх стадіях інфекції, коли внаслідок поширення вірусу в організмі пошкоджено клітини багатьох органів і тканин, імунний цитоліз може призвести до порушень життєво важливих фізіологічних функцій організму й ускладнити інфекційний процес. Єдиний механізм, який лежить в основі захисної та пошкоджувальної дії ЦТЛ, свідчить про обов'язкову участь імунопатологічних реакцій у патогенезі будь-якої вірусної інфекції.

За вірусних інфекцій часто спостерігаються ускладнення, спричинені ***автоімунними реакціями***, коли в організмі з'являються антитіла або ЦТЛ проти власних антигенів. Деструкція заражених вірусом клітин у процесі інфекції призводить до появи антигенно змінених клітинних структур, що сприймаються організмом як чужорідні та зумовлюють формування гуморальних і клітинних чинників імунітету. Змінені під дією вірусу антигени

називаються *автоантигенами,* а фактори імунологічної реактивності щодо них – *автоантитілами* та *авто-Т-лімфоцитами.* З автоімунними процесами пов'язане, наприклад, виникнення орхіту як ускладнення за епідемічного паротиту, що зумовлено підвищенням проникливості кровоносних і лімфатичних судин тестикулярної тканини під дією імунних комплексів.

За деяких вірусних інфекцій (наприклад, хвороба Ауєскі, африканська чума свиней) мають місце алергічні реакції у вигляді ***гіперчутливості сповільненого типу*** *(ГСТ).* Це запальна реакція тканин, спрямована проти вірусних антигенів, що характеризується інфільтрацією уражених ділянок активованими макрофагами і Т-лімфоцитами. ГСТ виникає в попередньо сенсибілізованому організмі, досягає максимального розвитку через 24–48 год після введення антигену і пов'язана з підвищеною проникливістю судин. Забезпечуючи певний захист за вірусних інфекцій, ГСТ може спричинити пошкодження тканин.

Імунологічна толерантність – це специфічна імунологічна ареактивність стосовно конкретного антигену, що виникає внаслідок його попереднього контакту з незрілою імунною системою (наприклад, у період ембріонального розвитку). При цьому здатність до імунної відповіді на інші антигени збережена. Так, зараження корів на ранній стадії тільності (1,5–4 міс) нецитопатогенним штамом збудника вірусної діареї ВРХ може призвести до народження персистентно інфікованого потомства, в якого відсутні специфічні антитіла до цього вірусу внаслідок імунологічної толерантності. Такі телята виглядають клінічно здоровими, але мають постійну віремію та виділяють вірус у навколишнє середовище, становлячи небезпечне джерело збудника інфекції. У них різко знижена імунологічна реактивність (унаслідок імунодепресивної дії вірусу), що зумовлює високу чутливість до секундарної мікрофлори.

Взаємодія вірусу з організмом хазяїна може призвести до ***імунологічної недостатності (імунодефіциту)***. Це порушення імунологічної реактивності, пов'язане з дефектами клітинної та (або) гуморальної ланок імунної системи. Класичним прикладом є ВІЛ-інфекція, за якої уражаються основні імунокомпетентні клітини (Т-хелпери, моноцити, макрофаги, деякі клони В-лімфоцитів). На тлі імунодефіциту виникають опортуністичні інфекції та неопластичні процеси, що призводить до неминучого летального наслідку.

Багато вірусів мають *імуносупресивну дію*, що пов'язано з їхньою здатністю розмножуватися в імунокомпетентних клітинах і спричинювати пошкодження лімфоїдної тканини. Так, за хвороби Марека уражається

фабрицієва сумка, тимус і селезінка, внаслідок чого повністю виключається лімфопоез. Головною мішенню для вірусу інфекційного бурсальної хвороби є фабрицієва сумка, яка поступово атрофується внаслідок некрозу лімфоїдних фолікулів. Атрофію фабрицієвої сумки і тимусу спричинює вірус інфекційної анемії курчат. Пригнічення гуморальної відповіді на гетерологічні антигени спостерігається за вірусної діареї ВРХ, чуми ВРХ, чуми м'ясоїдних, алеутської хвороби норок, ньюкаслської хвороби. До вірусів особливо чутлива система мононуклеарних фагоцитів, яка першою зустрічається з інфекційним агентом.

На тлі вірусіндукованих імунодефіцитів часто виникають секундарні (опортуністичні) інфекції, спричинені, зазвичай, умовно патогенною мікрофлорою. Частіше всього це спостерігається у випадках, коли вірус уражає органи дихання і шлунково-кишковий тракт, причому секундарні інфекції нерідко бувають небезпечніші, ніж первинний вірусний патоген.

Імунологічна недостатність поширена за вірусних інфекцій, що необхідно враховувати фахівцям ветеринарної медицини при вакцинопрофілактиці. Живі вакцини проти деяких вірусних інфекцій (зокрема інфекційної бурсальної хвороби, вірусної діареї ВРХ) можуть мати імуносупресивну дію, що призведе до зниження імунологічної реактивності організму та активації персистувальних агентів.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. У чому полягає кардинальна особливість противірусного імунітету? **2.** Дайте характеристику вірусам як антигенам. **3.** Охарактеризуйте клітинні чинники противірусного імунітету. **4.** Яка роль антитіл у противірусному імунітеті та механізм їхнього синтезу? **5.** Яке значення інгібіторів і комплементу в противірусному імунітеті? **6.** Охарактеризуйте інтерферони як важливий фактор противірусного імунітету. **7.** Що ви знаєте про імунопатологічні реакції організму за вірусних інфекцій?

ТЕМА 2.4. ІМУНОПРОФІЛАКТИКА ТА ХІМІОТЕРАПІЯ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ

2.4.1. Загальні принципи імунопрофілактики вірусних інфекцій і типи вірусних вакцин

Важливе місце в загальному комплексі заходів щодо боротьби з вірусними інфекціями тварин посідає *специфічна профілактика (імунопрофілактика)*, яка забезпечується застосуванням вакцин, імунних сироваток та інших імуноглобулінових препаратів.

Вірусні вакцини – це імунобіологічні препарати, які отримані з живих чи інактивованих вірусів або їхніх компонентів. Для культивування вакцинного штаму вірусу використовують чутливі біологічні системи – лабораторні тварини, курячі ембріони і культури клітин.

Залежно від технології виготовлення розрізняють такі типи вірусних вакцин: 1) *цільновіріонні* – живі та інактивовані (I покоління); 2) *субодиничні* (II покоління); 3) *генноінженерні* – реасортантні, рекомбінантні (субодиничні, векторні) (III покоління), ДНК-вакцини, рослинні; 4) *синтетичні* (IV покоління).

Залежно від здатності до репродукції вакцинного штаму всі вірусні вакцини поділяються на живі та інактивовані. *Живі вакцини* містять атенуйовані (ослаблені) штами вірусу, які отримані природним або штучним шляхом, включаючи генноінженерний метод. До *інактивованих* належать цільновіріонні та субодиничні вакцини.

Залежно від біологічної системи, що використовується для культивування вакцинного штаму вірусу, розрізняють тканинні, авінізовані та культуральні вакцини. *Тканинні вакцини* готують із суспензії тканини тварин, в якій розмножувався вакцинний вірус. Наприклад, вакцину проти сказу виготовляли раніше із головного мозку овець, заражених фіксованим штамом ліссавірусу сказу, а лапінізовану вакцину проти ящуру – з тканини заражених новонароджених кроленят. *Авінізовані вакцини* готують з ембріональних рідин і тканин ембріонів курей (рідше качок та японських перепілок), заражених вакцинним штамом, наприклад, вакцини проти грипу птахів, ньюкаслської хвороби, вірусного гепатиту каченят. *Культуральні вакцини* готують із заражених культур клітин чи переживаючих тканин, використовуючи при цьому ролерний або суспензійний методи культивування клітин і тканин. Наприклад, вакцину проти ящуру отримують

у перещеплюваній культурі клітин ВНК-21 та в експлантатах слизової оболонки язика ВРХ (метод Френкеля), які вирощують у суспензійному стані в металевих реакторах об'ємом 1000 л і більше.

Залежно від видової належності вакцинного штаму розрізняють *гомологічні вакцини* – з того самого виду вірусу, проти якого потрібно створити імунітет, і *гетерологічні вакцини* – з вірусів іншого виду, антигенно спорідненних збуднику (наприклад, вакцина проти натуральної віспи). Більшість вірусних вакцин – гомологічні.

Залежно від складу вакцини поділяються на моновалентні, поліваленті, асоційовані та змішані. *Поліваленті* вакцини готують із кількох серотипів антигенів одного виду вірусу, наприклад, інактивована вакцина проти ящуру з 7 серотипів вірусу А, О, С, Азія-1, Сат-1, Сат-2, Сат-3. *Асоційовані вакцини* містять антигени різних видів вірусів, наприклад, «Бівак» – жива вакцина проти ПГ-3 та ІРТ ВРХ, «Тетравак» – інактивована вакцина проти ІРТ, ВД, рота- і коронавірусної інфекцій ВРХ. *Змішані вакцини* становлять суміш вірусних і бактеріальних антигенів, наприклад, вакцина «Таурус» – проти ІРТ, ВД, ПГ-3 (жива) і лептоспірозу (інактивована) ВРХ, «Комбовак» – інактивована вакцина проти ІРТ, ПГ, ВД, РС, рота- і коронавірусної інфекцій та ешерихіозу ВРХ. При створенні асоційованих і змішаних вакцин слід враховувати сумісність антигенів.

Вибір вакцини для специфічної профілактики тієї чи іншої вірусної інфекції визначають такі фактори, як технологія ведення тваринництва, епізоотологічна характеристика господарства, ступінь поширення інфекції, практична зручність методу вакцинації з метою максимального охоплення поголів'я тварин, тривалість і напруженість імунітету.

Розвиткові вірусних інфекцій можна запобігти також ***пасивною імунізацією***, яку проводять за безпосередньої загрози виникнення інфекції, перед перевезенням тварин на виставки або в інші господарства. З цією метою застосовують *поліваленті імунні сироватки*, які отримують шляхом імунізації тварин-донорів атенуйованим вірусом, наприклад, сироватки проти ПГ-3, ВД, аденовірусної та РС інфекцій ВРХ, проти рота- і коронавірусної інфекцій та ешерихіозу ВРХ.

Для пасивної імунізації використовують також *поліваленті імуноглобуліни* (Глобкан-5 – проти чуми, парво- і коронавірусного ентеритів та аденовірусних інфекцій собак), *сироватки реконвалесцентів* (ящур, ПГ-3, ІРТ), *імунолактон* (сироватка молока корів, вакцинованих проти ящуру), *штучне молозиво* (антитіла із сироватки крові або молозива корів, вакцинованих проти рота- і коронавірусної інфекцій ВРХ).

У деяких випадках застосовують ***комбіновану (пасивно-активну) імунізацію*** – одночасне введення імунної сироватки і вакцини (або спочатку вводять сироватку, а потім вакцину), наприклад при сказі, чумі собак, класичній чумі свиней.

2.4.2. Цільновіріонні вакцини

Цільновіріонні вакцини – живі та інактивовані – виготовляють із повноцінних віріонів атенуйованих (ослаблених) або інактивованих штамів вірусів, які культивують у різних біологічних системах: лабораторних тваринах, курячих ембріонах і в культурах клітин.

Живі цільновіріонні вакцини – це ліофілізовані суспензії атенуйованих штамів вірусів. Їх отримують шляхом селекції мутантів, що утворюються в процесі пасажування вірулентного вірусу в лабораторних об'єктах, або з природно ослаблених штамів вірусів, що виникають за атипових і латентних форм перебігу інфекції (наприклад, штами B_1, Ла-Сота, F, FR і Бор/74/ВДНКІ ортоавулавірусу птахів 1).

Основна відмінність вакцинних штамів від циркулюючих у природі «диких» вірусів – стійка втрата вірулентності вірусу з одночасним збереженням імуногенних властивостей. Водночас вакцинні штами мають здатність «приживатися» в організмі, тобто розмножуватися як у місці введення, так і в регіонарних лімфатичних вузлах і внутрішніх органах. Вакцинальний процес триває зазвичай від 5–10 діб до 2–4 тижнів і призводить до формування імунітету. Чим більше часу «приживається» вакцинний штам в організмі, тим ефективніша вакцина. Вакцинний штам, на відміну від «дикого» вірусу, розмножується в організмі хазяїна обмежено внаслідок підвищеної термочутливості (ts-мутанти) або зміни тропізму і втрати здатності уражати певні тканини (наприклад, вакцинний фіксований штам ліссавірусу сказу).

Живі вірусні вакцини мають істотні *переваги* порівняно з інактивованими. Основна з них – висока напруженість і тривалість поствакцинального імунітету, який багато в чому еквівалентний постінфекційному. Живі вакцини активізують усі ланки імунної системи, зумовлюючи збалансовану імунну відповідь – системну і місцеву. Живі вакцини можна вводити одноразово різними методами (підшкірно, внутрішньом'язово, інтраназально, аерозольно, перорально).

Поряд із зазначеними перевагами живі вакцини мають *недоліки*, а саме: 1) реактогенність, що може призвести до поствакцинальних ускладнень

(наприклад, аборти у тільних корів після застосування живих вакцин проти ІРТ та ВД ВРХ); 2) можливість реверсії до дикого типу внаслідок генетичної нестабільності; 3) контамінація інфекційними агентами (вірусами, бактеріями, мікоплазмами), які персистують у біологічних системах; 4) чутливість до несприятливих факторів.

У медичній практиці використовують живі вакцини проти грипу, поліомієліту, кору, краснухи, епідемічного паротиту, аденовірусної інфекції, гарячки денге, жовтої гарячки; у ветеринарній практиці – живі вакцини проти парагрипу-3 ВРХ, інфекційного ринотрахеїту ВРХ, вірусної діареї ВРХ, хвороби Ауєскі, сказу, чуми м'ясоїдних, ньюкаслської хвороби та ін.

Інактивовані цільновіріонні вакцини готують з *очищеного* і часто *концентрованого вірусу*, який інактивований різними чинниками: формаліном, гідроксиламіном, етанолом, β-пропіолактоном, етиленіміном тощо. *Основна вимога* до інактивованих вакцин – повна і незворотна інактивація вірусного геному за максимального збереження поверхневих антигенів, які стимулюють утворення протективних (вірусонейтралізувальних) антитіл.

Усі інактиватори є сильними мутагенами. За абсолютної інактивації вони мають зумовити такі зміни вірусного геному, що унеможливлюють його транскрипцію, трансляцію чи реплікацію. Інактивовані вакцини підлягають суворому контролю на повноту інактивації, оскільки наявність інфекційного вірусу призводить до серйозних наслідків. Залишкову інфекційність інактивованих вакцин можуть зумовити різноманітні генетичні взаємодії між окремими незруйнованими фрагментами нуклеїнових кислот.

Промислове виробництво інактивованих вакцин потребує великих об'ємів вірусної сировини. У зв'язку з цим гостро стоїть питання клітинних субстратів. Тривалий час виробництво більшості противірусних препаратів ґрунтувалося на використанні первинних культур клітин із нормальних тканин тварин. Окрім того, в медичній практиці використовували деякі лінії диплоїдних клітин з обмеженою життєвою потенцією. Проте всезростаючі потреби серійного виробництва вакцин не можуть забезпечити первинні культури клітин. Особливо це стосується інактивованих концентрованих і субодиничних вакцин, виготовлення яких потребує збільшення кількості вірусної сировини. Це завдання можна вирішити лише з використанням перещеплюваних клітинних ліній, що характеризуються необмеженим строком життя, високою стандартністю і порівняно низькою вартістю.

Тривалий час вважалося недопустимим застосування перещеплюваних культур клітин у виробництві вірусних вакцин у зв'язку з їхньою онкогенною потенцією. Проте за останні десятиріччя накопичено значний досвід

у використанні перещеплюваних культур клітин тварин для розмноження вакцинних штамів. На основі стабільної лінії ВНК-21 виготовляють інактивовану вакцину проти ящуру, а на основі стабільної лінії Vero – інактивовані вакцини проти поліомієліту і сказу. Методи контролю гарантують відсутність у препаратах біологічно активних кількостей онкогенних домішок (гетерогенна ДНК, трансформувальні білки, ендогенні віруси).

Важливим етапом при отриманні інактивованих вакцин є очищення вірусної сировини від клітинного баласту. Інактивований вірус не розмножується в організмі, і для стимуляції інтенсивної імунної відповіді потрібно вводити значну кількість вакцини, а домішки клітинних білків створюють додаткове навантаження на імунну систему.

Основна *перевага* інактивованих вакцин – їхня повна безпечність. *Недоліком* є менша імуногенність, у зв'язку з чим потрібно збільшувати дозу і кратність введення препарату. Крім того, парентеральний спосіб застосування інактивованих вакцин не стимулює місцевої імунної відповіді.

Інактивовані вакцини застосовують для профілактики грипу, поліомієліту, гепатиту В, сказу, ящуру, хвороби Ауєскі, кліщового та японського енцефалітів, інфекційного ринотрахеїту ВРХ та ін.

2.4.3. Субодиничні вакцини

У цільновіріонних вакцинах формування імунітету індукують лише поверхневі антигени, які становлять близько 10 % вірусних протеїнів. Субодиничні вакцини виготовляють із глікопротеїнів складно організованих вірусів, які є протективними антигенами, що стимулюють утворення вірусонейтралізувальних антитіл. Субодиничні вакцини позбавлені клітинного баласту, який лише посилює реактогенність і може спричинити алергічні реакції.

Метод отримання субодиничних вакцин складається з таких етапів: 1) дезінтеграція віріонів за допомогою протеолітичних і ліполітичних ензимів, органічних розчинників, лугів або детергентів, які руйнують ліпідний шар суперкапсидної оболонки та інактивують вірусний геном; 2) виділення та очищення протективних вірусних антигенів (глікопротеїнів) ультрацентрифугуванням або гельфільтрацією.

Субодиничні вакцини виготовлені зі збудників грипу А і В, кору, гепатиту В, сказу, хвороби Ауєскі, інфекційного ринотрахеїту ВРХ, трансмісивного гастроентериту свиней та ін. Проте імуногенність субодиничних вакцин, як правило, нижча, ніж у цільновіріонних. У зв'язку з цим їх треба

вводити з *ад'ювантами* та *імуномодуляторами*, які посилюють імунну відповідь (алюмінію гідроксид, аеросил, сироватковий альбумін). Імуногенність субодиничних вакцин можна підвищити, конструюючи їх у вигляді *віросом*. Для цього очищені вірусні глікопротеїни включають у ліпосоми, які мають ад'ювантні властивості.

2.4.4. Генноінженерні вакцини

Генна інженерія створює широкі можливості для конструювання і промислового виробництва вірусних вакцин. Сучасний підхід базується на введення до складу вакцини тільки протективних вірусних антигенів, які індукують антитілоутворення. Генноінженерні вакцини є продуктом спрямованої рекомбінації вірусів. На основі технології рекомбінантної ДНК розроблено *п'ять типів* вірусних вакцин: реасортантні, рекомбінантні (субодиничні, векторні), ДНК-вакцини і рослинні.

Реасортантні вакцини виготовляють з атенуйованих реасортантів або делеційних мутантів, які характеризуються генетичною стабільністю. *Реасортанти* отримують за допомогою пересортування генів у вірусів із фрагментованим геномом (вірус грипу А), а *делеційні мутанти* – шляхом делеції відповідних генів (наприклад, у збудників простого герпесу і хвороби Ауєскі). Це призводить до втрати вірулентності вірусів при збереженні імуногенних властивостей.

Принцип створення ***рекомбінантних субодиничних вакцин*** ґрунтується на виділенні з вірусного геному генів, які кодують протективні вірусні антигени, та їхнє клонування в клітинах прокаріотів або евкаріотів на основі плазмідного або фагового вектора. Клонована вірусна ДНК експресується у вигляді вірусного протеїну в прокаріотичних чи евкаріотичних клітинах. Так, протективні протеїни збудників ящуру, гепатиту В, грипу А, сказу, простого герпесу та поліомієліту були синтезовані в бактеріях і дріжджах. На завершальному етапі отриманий після руйнування реципієнтних клітин імуногенний вірусний протеїн очищують за допомогою ультрацентрифугування в поєднанні з імуноафінною хроматографією та застосовують як вакцинний препарат.

У деяких випадках для клонування та експресії потрібних генів застосовують культури клітин людини і тварин. Так, HBs-антиген вірусу гепатиту В успішно продукують у перещеплюваних клітинних лініях L і COS, заражаючи їх рекомбінантною ДНК із геном HBsAg, що сконструйована на основі вірусного вектора (папіломавірусів ВРХ або поліомавірусу макаки-резус 1).

Рекомбінантні векторні вакцини конструюють на основі атенуйованого вірусного вектора – *вірусу вісповакцини*, в геном якого вбудовують гени протективних протеїнів іншого вірусу (наприклад, збудників гепатиту В, грипу А, сказу, хвороби Ауєскі, везикулярного стоматиту, ньюкаслської хвороби). За внутрішньошкірного введення такого препарату відбувається репродукція рекомбінантного вірусу з розвитком вакцинального процесу, характерного для вісповакцини, та одночасний синтез протективних протеїнів іншого вірусу, що індукує специфічну імунну відповідь.

Новим напрямком у розробці генноінженерних вакцин є ***ДНК-вакцини***. Це плазмідні ДНК із вбудованими генами протективних вірусних білків, що вводять безпосередньо в організм тварин. Рекомбінантну ДНК на основі плазмідного вектора реплікують в *E. coli*, потім очищують і використовують як вакцинний препарат.

Лише 0,01–1% плазмідної ДНК поглинається клітинами організму, які синтезують протективний вірусний протеїн. Він розщеплюється клітинними протеазами на короткі пептиди, які в комплексі з молекулами МНС виставляються на поверхні клітин, де розпізнаються Т-хелперами. Це індукує збалансовану імунну відповідь, а саме: синтез вірусонейтралізувальних антитіл В-лімфоцитами, проліферацію ЦТЛ, активізацію макрофагів і NK-клітин. Протективний вірусний протеїн може звільнитися з клітини в екстрацелюлярний простір у нерозщепленому стані та захоплюватися антигенопрезентабельними клітинами (макрофагами).

Плазмідна ДНК тривалий час (до 3–6 міс) функціонує в клітинах організму, не реплікується в них, не інтегрує з хромосомою і не спричинює утворення антитіл проти неї. ДНК-вакцинам властива ефективність живих і безпечність інактивованих вакцин. Сконструйовано ДНК-вакцини проти сказу, грипу А, гепатиту В, кліщового енцефаліту, хвороби Ауєскі, інфекційного ринотрахеїту та вірусної діареї ВРХ, парвовірусної інфекції собак. В одну плазмідну ДНК можна вбудувати гени протективних білків кількох вірусів і гени цитокінів – регуляторів імунної відповіді.

Рослинні вакцини виготовляють на основі трансгенних рослин, у геном яких вбудовують гени протективних вірусних антигенів. Наприклад, у рослинах тютюну експресовано антиген вірусу гепатиту В, у томатах – ліссавірусу сказу, в картоплі – вірусу геморагічної хвороби кролів, у люцерні – вірусу ящуру. Згодовування трансгенних рослин тваринам індукує утворення вірусонейтралізувальних антитіл. Зручний оральний спосіб введення і низька собівартість визначають широку перспективність таких вакцин.

2.4.5. Синтетичні вакцини

Синтетичні вакцини створюють шляхом *біоорганічного синтезу епітопів протективних вірусних антигенів.* Конструювання таких вакцин можливе за повного розшифрування пептидних послідовностей антигенних детермінант. Пептиди синтезують з окремих амінокислот, використовуючи зазвичай твердофазний метод. Технологічні розробки синтетичних вакцин чітко зорієнтовані на мінімальні розміри пептидів, що стимулюють імунну відповідь організму. Ідеальна синтетична вакцина – це комплекс із кількох коротких пептидів по 5–7 амінокислотних залишків, який містить бажану комбінацію антигенних детермінант різних вірусів.

Синтетичні вакцини безпечні через відсутність інфекційного вірусу, не потребують очищення антигенного матеріалу, дають необмежені можливості для асоціації вірусних антигенів, стабільні. Проте головний *недолік* синтетичних вакцин – недостатня імуногенність, тому їх потрібно вводити з ад'ювантами та імуномодуляторами або конструювати у вигляді віросом. Синтетичні вакцини розроблені проти грипу, гепатиту В, герпетичної інфекції, ящуру.

2.4.6. Засоби хіміотерапії вірусних інфекцій

Значні труднощі у створенні ефективних хіміотерапевтичних препаратів для лікування і профілактики вірусних інфекцій зумовлені специфікою вірусів як облігатних внутрішньоклітинних паразитів на генетичному рівні. Репродукція вірусів тісно пов'язана з біосинтетичними процесами заражених клітин. *Головним завданням* хіміотерапії вірусних інфекцій є розробка таких препаратів, які б специфічно блокували репродукцію вірусів та не зачіпали процесів життєдіяльності клітин, систем і цілого організму. Пошук антивірусних речовин із вибірковою дією є складним завданням. Тому успіхи хіміотерапії вірусних інфекцій досить скромні, набір ефективних хіміопрепаратів відносно невеликий, а розробка кожного з них потребує багато часу.

Мішенню дії антивірусних речовин є вірусоспецифічні процеси в зараженій клітині або сама інфікована клітина. Класичними мішенями стали *вірусні ензими* (ДНК- та РНК-полімерази). Впливаючи на ензими, що входять до складу віріонів або утворюються в зараженій клітині в процесі репродукції вірусів, можна загальмувати синтез вірусних нуклеїнових

кислот. Є різні способи впливу на вірусоспецифічні ензими, зокрема інгібіція їхнього синтезу або каталітичної активності.

Дія антивірусних хіміопрепаратів може бути спрямована на *заражені клітини.* Це пов'язано зі зміною проникливості плазмолеми під дією вірусної інфекції, у зв'язку з чим інгібітори синтезу макромолекул проникають тільки в заражені клітини, не зачіпаючи нормальні.

Противірусна активність препарату в принципі може бути спрямована на будь-яку стадію репродукції вірусу. Проте далеко не завжди спостерігається пряма кореляція противірусної активності сполуки *in vitro* з клінічною ефективністю, оскільки умови репродукції вірусу *in vitro* та *in vivo* суттєво різняться. Багато речовин, які виявляють противірусну дію *in vitro*, не можна використовувати в клінічній практиці через те, що вони є антиметаболітами, токсичними не тільки для вірусів, але й для клітин хазяїна.

Для доклінічної оцінки противірусних препаратів незамінними є лабораторні тварини. Ці моделі забезпечують тонкий підбір експериментальних умов і дають змогу зробити висновки про токсичність досліджуваної сполуки. Проте деякі актуальні віруси людини (наприклад, альфагерпесвіруси 4 і 5, вірус гепатиту В) не розмножуються в організмі лабораторних тварин. У цьому разі значний інтерес становлять аналогічні віруси тварин, які спричинюють подібні захворювання у відповідних хазяїв. На лабораторних тваринах противірусні препарати перевіряють не лише на токсичність, але й на тератогенність і канцерогенність.

Противірусні препарати, що використовуються в медичній практиці, характеризуються вузьким спектром активності. Більшість із них діє на функції ензимів, які зумовлюють синтез вірусних нуклеїнових кислот.

Основні групи противірусних хіміотерапевтичних препаратів:

1. Інгібітори проникнення вірусів у клітини: респігем, синагіс (ортопневмовірус людини), абрева, VZIG VariZIG (герпесвіруси), фузеон, селзентрі (ВІЛ). Блокують взаємодію віріонів із клітинними рецепторами.

2. Інгібітори депротеїнізації вірусу грипу А: амантадин, римантадин. Блокують злиття суперкапсиду віріона з плазмолемою і подальше вивільнення нуклеокапсиду в цитоплазму. У зв'язку з поширеною резистентністю вірусу амантадин практично перестали використовувати для лікування грипу.

3. Інгібітори нейрамінідази вірусів грипу А і В: занамавір, озельтамівір, перамівір, октаноат ланінамівіру. Блокують депротеїнізацію вірусів і звільнення віріонів потомства із заражених клітин.

4. Інгібітори ДНК-полімераз герпесвірусів, аденовірусів і поксвірусів: відарабін, цитарабін, ідоксиуридин, трифторидин, ацикловір, ганцикловір.

Блокують синтез вірусних ДНК. Застосовуються для лікування герпетичного кератиту та енцефаліту, вітряної віспи, оперізувального лишаю, геніталь-ного герпесу, цитомегаловірусної інфекції, аденовірусного кератиту.

5. Інгібітори зворотної транскриптази ВІЛ: зидовудин, ставудин; ламівудин, зальцитабін; діданозин; абакавір, емтрицитабін, невірапін, ефавіренц етравірин, рилпівірин, делавірдин. Блокують зворотну транскрипцію, чим унеможливлюється подальше зараження клітин.

6. Інгібітори інтегрази ВІЛ: ралтегравір, долутегравір, елвітегравір. Блокують інтеграцію ДНК-копії вірусного геному з клітинною ДНК.

7. Інгібітори протеази ВІЛ: саквінавір, індинавір, ритонавір, дарунавір, типранавір. Блокують протеолітичне нарізання поліпротеїну-попередника, з якого утворюються ензими (зворотна транскриптаза, інтеграза, протеаза) і структурні протеїни вірусу.

8. Інгібітори протеази гепаціівірусу С: інцівек, віктреліс, олізіо, ванігеп, зепатир. Блокують протеолітичне нарізання поліпротеїну-попередника на функціонально активні протеїни.

9. Інгібітор полімераз герпесвірусів, вірусу гепатиту В, ВІЛ: фоскарнет. Блокує реплікацію вірусних геномів.

10. Інгібітор вірусних РНК-полімераз: рибавірин. Блокує реплікацію вірусних геномів. Застосовується для лікування РС-інфекції, гепатиту С, хантавірусних інфекцій (геморагічна гарячка з нирковим синдромом, хантавірусний легеневий синдром).

11. Інгібітор синтезу пізніх вірусних протеїнів поксвірусів: метисазон. Раніше застосовувався для лікування натуральної віспи, а також ускладнень після вакцинації. У зв'язку з ліквідацією хвороби препарат зберігають у резерві.

Проблема хіміотерапії вірусних інфекцій включає пошук *засобів патогенетичної корекції* вірусних уражень. Зокрема, *ізоринозин* активний стосовно ортоміксо-, герпес-, поліо- та аденовірусів. Препарат не інгібує вірусні полімерази, а зв'язує вірусні іРНК, унаслідок чого порушується трансляція, а також активізує імунокомпетентні клітини, включаючи посилений синтез інтерферонів.

Отже, переважна більшість сучасних медичних хіміотерапевтичних препаратів ефективна в основному щодо грипу А і В та ГРВІ (РС-інфекція), різноманітних герпесвірусних інфекцій (зокрема, простий герпес, вітряна віспа – оперізувальний лишай, цитомегаловірусна інфекція), ВІЛ-інфекції, гепатитів В і С, хантавірусних інфекцій. Окремі препарати розроблені для лікування папіломавірусних інфекцій. Для всіх інших вірусних хвороб

етіотропних засобів немає. До загальних *недоліків* зазначених препаратів належить відносно вузький спектр противірусної активності, а також не виключена можливість формування резистентних штамів вірусів, що може звести нанівець ефективність хіміотерапії.

У процесі еволюції віруси набули здатності пристосовуватися до несприятливих впливів навколишнього середовища. Це стосується і лікарських препаратів. У клінічних умовах зареєстровано випадки стійкості вірусів до римантадину, ацикловіру, ганцикловіру, невірапіну, зидовудину. Резистентність вірусів до хіміопрепаратів формується частіше за багаторазового їхнього застосування і передається наступним поколінням. Важлива роль у формуванні резистентних штамів належить процесам селекції, коли з генетично неоднорідної популяції «диких» штамів під впливом препарату відбувається селекція резистентних варіантів. Окрім того, можлива мутагенна дія самого препарату. Знизити ймовірність появи резистентності вірусів до хіміопрепаратів можна, застосовуючи одночасно два препарати з різним механізмом дії.

Для профілактики і терапії вірусних інфекцій широко використовують ***інтерферони*** (ІФН). Існуючі медичні препарати ІФН поділяються за складом на ІФН-α, ІФН-β, ІФН-γ, а за походженням – на *природні* (ІФН І покоління) та *рекомбінантні* (ІФН ІІ покоління).

У промисловому виробництві ІФН використовують кілька технологій. *ІФН*-α виробляють у культурі лейкоцитів донорської крові, застосовуючи в ролі індуктора респіровірус мишей або ортоавулавірус птахів 1 із родини *Paramyxoviridae.* У зв'язку з дефіцитом і високою вартістю сировини (донорська кров) економічно вигіднішою технологією промислового виробництва ІФН-α є використання перещеплюваних лімфобластоїдних клітин людини, які культивують у вигляді суспензійних культур.

ІФН-β отримують у різних диплоїдних лініях фібробластів ембріона людини, які обробляють синтетичним індуктором полі(І): полі(Ц) (поліінозин-поліцитозин).

Розроблено біотехнології промислового виробництва *рекомбінантних ІФН* різних типів (α, β, γ). Створено штам *E. coli* – продуцент ІФН-α. В 1 л бактеріальної культури, що містить близько 10^{11} клітин, концентрація ІФН-α досягає 5 мг. Це в 5 тис. разів більше тієї кількості, яку можна отримати з 1 л донорської крові.

Основою виробництва рекомбінантних інтерферонів можуть стати дріжджі та клітини вищих еукаріотів. Здійснено синтез гена ІФН-α хімічним шляхом.

Спектр захворювань, за яких рекомендовано застосування ІФН, широкий. Це герпесвірусні ураження (кератити і кератокон'юнктивіти, генітальний герпес, оперізувальний лишай), гострі та хронічні гепатити, грип та ГРВІ, ВІЛ-інфекція, папіломавірусні ураження (гострокінцева кондилома, папіломатоз гортані, бородавки та ін.), кір, епідемічний паротит, сказ. До цього переліку треба додати вірусні ускладнення за трансплантації органів і на тлі прийому імунодепресантів.

Механізм противірусної дії ІФН полягає в індукції антивірусного стану клітин за рахунок синтезу ензимів протеїнкінази і 2,5-оліго-аденілатсинтетази з прямим противірусним ефектом. Унаслідок цього в заражених клітинах пригнічується синтез вірусних структурних протеїнів та ензимів, необхідних для реплікації вірусного геному, і процес репродукції вірусу припиняється.

Препарати ІФН органічно доповнюють ***індуктори ІФН***. Це різнорідна за складом група природних і синтетичних сполук, які стимулюють в організмі синтез власного (ендогенного) ІФН. Багато з цих препаратів виявляють, окрім антивірусного, протипухлинний та імуномодулювальний ефекти. Найкращі *синтетичні індуктори ІФН* – очищена 2-ланцюгова РНК і штучні полірибонуклеотиди з високого молекулярною масою, які резистентні до ензимного розкладання. Особливо ефективний полімер полі(І): полі(Ц).

У медичній практиці використовують такі індуктори ІФН, як *мегасин, полудан, аміксин, циклоферон, неовір, ларіфан* і *ридостин*. Противірусна активність цих індукторів ІФН у цілому збігається з дією екзогенних ІФН. Їх застосовують за грипу та ГРВІ, герпесвірусних інфекціях (енцефаліти, кератити), гепатитах А і В, ентеровірусних інфекціях, сказі, ВІЛ-інфекції та СНІДі.

У ветеринарній практиці перспективним є застосування препаратів ІФН-α та ІФН-γ ВРХ *(Бовівірекс* і *γ-Бовіферон)* та їхніх індукторів для підвищення неспецифічної резистентності телят за респіраторних і шлунково-кишкових захворювань, а також препарату *Комбіферон* (на основі рекомбінантних ІФН-α та ІФН-γ) із широким спектром антивірусної та імуномодулювальної дії. З індукторів ІФН ефективними виявилися рослинні препарати: *похідні госиполу – саврац, рагосин* і *кагоцел* – стимулюють синтез ІФН-α, а *лектин кормових бобів* – синтез ІФН-γ.

Що стосується ***хіміотерапії вірусних інфекцій тварин***, то в цьому разі треба керуватися такими міркуваннями. Економічний ефект має перевищувати вартість препарату і затрати на обробку тварин. Препарат повинен бути зручним для групового застосування, захищати з профілактичною метою не менше ніж 70 % тварин, а за лікування – не менше як

50 %, послаблювати тяжкість перебігу хвороби, не перешкоджати формуванню імунітету і не давати побічних ефектів (токсигенність, тератогенність). У ветеринарній практиці з терапевтичною метою використовують патогенетичні й симптоматичні препарати. З удосконаленням методів виробництва і зниженням собівартості ІФН стане економічно вигідно застосовувати його для профілактики і лікування багатьох вірусних інфекцій тварин.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Охарактеризуйте загальні принципи імунопрофілактики вірусних інфекцій. **2.** Які ви знаєте типи вірусних вакцин? **3.** Як виготовляють живі цільновіріонні вакцини? **4.** Принцип конструювання інактивованих цільновіріонних вакцин. **5.** Що таке субодиничні вакцини, як їх виготовляють? **6.** Охарактеризуйте генноінженерні вакцини. **7.** Принцип конструювання синтетичних вакцин. **8.** Назвіть основні групи противірусних хіміотерапевтичних препаратів.

Висновки

1. Визначальними чинниками патогенезу вірусних інфекцій є: 1) тропізм вірусу; 2) швидкість репродукції вірусу і кількість інфекційних віріонів у потомстві; 3) реакція клітин на вірусну інфекцію; 4) реакція організму на зміни клітин і тканин, спричинені вірусною інфекцією.

2. Патогенез вірусних інфекцій має такі стадії: 1) проникнення вірусів у організм; 2) первинна репродукція; 3) поширення в організмі; 4) локалізація в організмі (тропізм); 5) деструкція чутливих клітин; 6) імунна відповідь; 7) персистенція вірусів у організмі.

3. Вірусні інфекції на клітинному рівні класифікуються: 1) автономна та інтеграційна (за взаємодією вірусного і клітинного геномів); 2) продуктивна та абортивна (за утворенням інфекційного потомства); 3) гостра і хронічна (за динамікою взаємодії вірусів і клітин); 3) літична і нелітична (за наслідком інфекційного процесу для клітин).

4. Вірусні інфекції на рівні організму класифікуються: 1) вогнищева і генералізована (залежно від генералізації та тривалості інфекції, прояву клінічних ознак захворювання і виділення вірусів у довкілля); 2) гостра та інапаратна (з короткочасним перебуванням вірусів у організмі); 3) латентна, хронічна і повільна (з вірусною персистенцією).

5. Передумовою виникнення вірусних інфекцій є наявність трьох ланок епізоотичного (епідемічного) ланцюга: джерела збудника інфекції, механізму його передавання і сприйнятливого організму.

6. Кардинальна особливість противірусного імунітету – захист клітин від вірусної генетичної інформації та пригнічення репродукції вірусу.

7. Клітинними чинниками противірусного імунітету є Т- і В-лімфоцити, природні кілери (NK-клітини) і макрофаги; гуморальними чинниками – антитіла, інгібітори, комплемент, інтерферони та інші медіатори імуногенезу.

8. За вірусних інфекцій можливі такі імунопатологічні реакції організму: 1) імунокомплексна патологія; 2) імунна деструкція заражених клітин; 3) автоімунні реакції; 4) гіперчутливість сповільненого типу; 5) імунологічна толерантність; 6) імунологічна недостатність (імунодефіцит).

9. Вірусні вакцини класифікуються залежно від технології виготовлення на такі типи: 1) цільновіріонні – живі та інактивовані (I покоління); 2) субодиничні (II покоління); 3) генноінженерні – реасортантні, рекомбінантні (субодиничні, векторні) (III покоління), ДНК-вакцини, рослинні; 4) синтетичні (IV покоління).

10. Основними противірусними хіміотерапевтичними препаратами є інгібітори: 1) проникнення в клітини ортопневмовірусу людини, герпесвірусів і ВІЛ; 2) депротеїнізації та нейрамінідази вірусів грипу А і В; 3) вірусних ДНК- і РНК-полімераз; 4) зворотної транскриптази, інтегрази і протеази ВІЛ; 5) протеази гепасівірусу С.

Розділ III

МЕТОДОЛОГІЯ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ТВАРИН

Навчальні цілі розділу: засвоїти методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій тварин; оволодіти навичками відбору патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин для вірусологічного дослідження, його транспортування і первинної обробки; засвоїти експрес-методи індикації вірусів у досліджуваному матеріалі; оволодіти навичками з ізоляції вірусів у чутливих біологічних системах (лабораторних тваринах, курячих ембріонах, культурах клітин); оволодіти методиками титрування вірусів і постановки серологічних реакцій.

ТЕМА 3.1. ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ ТВАРИН

3.1.1. Методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій тварин

Діагностика має надзвичайно важливе значення в системі заходів боротьби з вірусними інфекціями тварин. Швидко і правильно поставлений діагноз забезпечує успіх ліквідації спалахів захворювання, оскільки дає змогу чітко уявити конкретну епізоотичну ситуацію і своєчасно вжити цілеспрямованих заходів щодо оздоровлення поголів'я тварин із найменшими втратами. І навпаки, помилковий діагноз або затримка з його постановкою може призвести до поширення інфекції, ускладнить заходи щодо її ліквідації і спричинить значні економічні збитки.

Постановка діагнозу на вірусні інфекції тварин складається з *двох етапів:* клініко-епізоотологічна і лабораторна діагностика.

Клініко-епізоотологічна діагностика проводиться безпосередньо в господарстві на основі аналізу клінічних симптомів хвороби, патологоанатомічних змін органів і тканин та епізоотологічних даних (відомості про

види й вікові групи захворілих тварин, швидкість поширення інфекції, захворюваність та летальність тощо). Аналіз усіх цих даних дає змогу поставити лише попередній діагноз, тому що за багатьох вірусних хвороб вони можуть бути подібними. Крім того, нерідкі випадки атипового перебігу захворювання, а також латентних та асоційованих (змішаних) інфекцій, які спричинюються кількома збудниками.

Вирішальне значення в постановці остаточного діагнозу належить ***лабораторній діагностиці***. Навіть за такої хвороби, як ящур, коли клініко-епізоотологічний діагноз ставиться, як правило, точно, обов'язково треба проводити лабораторне дослідження з метою встановлення серотипу і варіанту збудника, що необхідно знати для застосування відповідної вакцини. Лабораторна діагностика проводиться в спеціалізованій лабораторії ветеринарної медицини на основі дослідження патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин. Враховуючи попередній діагноз, складають план лабораторного дослідження.

Лабораторна діагностика вірусних інфекцій тварин ґрунтується на трьох групах методів: *експресні*; *вірусологічні* та *серологічні (ретроспективні)*. Вибір конкретного методу вирішується в кожному окремому випадку залежно від характеру захворювання, підозрюваного збудника і можливостей лабораторії.

Експрес-методи основані на швидкому виявленні вірусу або його компонентів безпосередньо в патологічному матеріалі. До цієї групи належать такі методи: 1) виявлення *віріонів* вірусів методами електронної мікроскопії, а також імуноелектронної та світлової мікроскопії (вірусоскопія); 2) виявлення внутрішньоклітинних *тілець-включень* вірусів методом світлової мікроскопії; 3) ідентифікація *вірусних антигенів* у серологічних реакціях (РІФ, ІЕА, РЗК, РДП, РЗГА, РНГА, ІХА та ін.); 4) ідентифікація *вірусних нуклеїнових кислот* молекулярно-генетичними методами (метод ДНК-зондів, ПЛР).

Експрес-методи дають змогу відносно швидко (не більше 2–3 діб) виявити та ідентифікувати вірус у досліджуваному матеріалі. Проте вони не завжди вірогідні й тому потребують підтвердження іншими методами.

Вірусологічні методи ґрунтуються на ізоляції вірусу з патологічного матеріалу шляхом зараження чутливих біологічних об'єктів і його наступній ідентифікації в серологічних реакціях.

Для виділення вірусу використовують *лабораторних тварин*, *курячі ембріони* і *культури клітин*. При виборі біологічних систем враховують дані клініко-епізоотологічного діагнозу і вид тварини, від якої взятий патологічний

матеріал. Сукупність цих даних дає змогу вибрати потрібні лабораторні моделі та метод їхнього зараження. В окремих випадках ставлять біопробу (або імунологічну пробу) на природно сприйнятливих тваринах.

Якщо за первинного зараження досліджуваним матеріалом лабораторні об'єкти не реагують на вірус, це зовсім не означає, що збудника немає. Відсутність реакції на зараження за наявності вірусу в патологічному матеріалі можна пояснити двома причинами: 1) недостатньою адаптацією вірусу до лабораторної моделі; 2) низькою концентрацією вірусу в патологічному матеріалі.

У такому разі перший пасаж вважається «сліпим». Від інфікованих біологічних об'єктів беруть відповідний вірусовмісний матеріал і заражають ним нову партію об'єктів, тобто проводять другий пасаж. Якщо і в другому пасажі не проявиться реакція на вірус, його теж вважають «сліпим» і проводять третій пасаж. Із кожним пасажем вірус адаптується до біологічних систем, концентрація його збільшується, і він проявляє свою інфекційну дію. Часто для ізоляції вірусу з патологічного матеріалу треба провести не менш як 3–4 «сліпих» пасажів.

Наступним етапом вірусологічного дослідження є ідентифікація виділеного вірусу в серологічних реакціях: РН, РІФ, ІЕА, РЗК, РЗГА, РНГА, РЗГАд, РДП та ін. Окрім того, вірус ідентифікують методами ЕМ та ІЕМ.

Вірусологічні методи в лабораторній діагностиці вірусних інфекцій є найголовнішими, тому що їхня мета – ізоляція збудника з патологічного матеріалу та наступна його ідентифікація. Проте вони потребують багато часу, особливо в разі проведення «сліпих» пасажів.

Методи серологічної (ретроспективної) діагностики. Незалежно від результатів ізоляції вірусу з патологічного матеріалу та його ідентифікації, проводять дослідження парних сироваток крові на наявність специфічних антитіл. Із цією метою від тварини беруть кров двічі, з інтервалом 2–3 тижні, на початку і наприкінці хвороби. Зростання титру антитіл у другій пробі сироватки в чотири рази і більше свідчить про захворювання. Антитіла виявляють у різних серологічних реакціях: РН, РЗГА, РНГА, РНГАд, РЗК, РДП, ІЕА та ін.

Чому недостатньо одноразового серологічного дослідження? Справа в тому, що одноразовий позитивний результат, навіть якщо титр антитіл високий, не має діагностичної цінності (за винятком ситуації, коли в цьому регіоні з'являється зовсім новий вірус). Він свідчить про контакт тварини з вірусом, однак не визначає, коли саме цей контакт відбувся. Наявність сироваткових антитіл може бути наслідком попереднього захворювання,

безсимптомної інфекції, вакцинації або молозивного походження. Серологічні дослідження мають діагностичну цінність тоді, коли вони виявляють зростання титру антитіл.

Недоліком методів серологічної діагностики є їхня ретроспективність, тому що до моменту постановки діагнозу тварини перебувають на стадії видужування.

3.1.2. Відбір патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин для вірусологічного дослідження

У лабораторній діагностиці вірусних інфекцій тварин точність діагнозу залежить передусім від правильного відбору патологічного матеріалу від хворих, загиблих або вимушено забитих тварин і швидкого транспортування його в лабораторію.

Загальне правило: патологічний матеріал потрібно брати по можливості стерильно, якнайскоріше після появи чітких клінічних ознак хвороби, коли концентрація вірусу є максимальною, або не пізніше 2–4 год після загибелі, щоб уникнути дисемінації кишкової мікрофлори (внаслідок послаблення бар'єрної функції кишечнику) і посмертних змін тканин. Слід враховувати той факт, що за деяких вірусних інфекцій (наприклад, хворобі Тешена) спостерігається феномен посмертної аутостерилізації, що робить неможливим виділення збудника.

Патологічний матеріал беруть із врахуванням *тропізму вірусу* і шляхів виділення його з організму в різні стадії хвороби, а саме:

1) за підозри *пневмотропного вірусу* (грип свиней і коней, парагрип-3 ВРХ, РС-інфекція ВРХ) – носовий слиз, носоглоткові змиви, слизові оболонки верхніх дихальних шляхів, легені, бронхіальні й середостінні лімфатичні вузли;

2) за підозри *нейротропного вірусу* (сказ, хвороба Тешена, східний, західний і венесуельський енцефаломієліти коней) – головний і спинний мозок;

3) за підозри *дерматропного (епітеліотропного) вірусу* (віспа, ящур, везикулярний стоматит) – стінки і вміст везикул, пустул, зіскрібки з уражених ділянок шкіри й слизових оболонок;

4) за підозри *ентеротропного вірусу* (ротавірусна і коронавірусна інфекції ВРХ), – кал, слизова оболонка тонкого кишечнику, брижові лімфатичні вузли;

5) за підозри *політропного вірусу* (інфекційний ринотрахеїт і вірусна діарея ВРХ), – змиви з носа, кон'юнктиви і статевих органів, сперма,

абортований плід, слизові оболонки респіраторного і травного трактів, паренхіматозні органи, мигдалини, лімфатичні вузли, головний мозок (залежно від клінічного прояву хвороби);

6) за підозри *пантропного вірусу* (хвороба Ауєскі, класична чума свиней) – паренхіматозні органи, лімфатичні вузли, головний і спинний мозок.

У гострій стадії хвороби в період вірусемії обов'язково беруть ***кров*** (з яремної вени в об'ємі 5–10 мл) із метою ізоляції вірусів (насамперед пантропних, а також політропних). Для виділення вірусів використовують *цільну дефібриновану* або *«лакову» кров* (суміш крові з дистильованою водою 1:1), або *окремі кров'яні елементи* (для цього кров беруть з антикоагулянтом – 2,5 %-й розчин натрію цитрату на 0,9 %-му розчині NaCl 1:2; 0,2 мл рідкого гепарину з активністю 5 тис. ОД/мл або 0,2 мл сухого гепарину на 100 мл крові; консервувальний розчин Альсевера* 1:5).

Крім того, кров необхідна для серологічного дослідження. З цією метою її беруть без антикоагулянту в об'ємі 10–15 мл, двічі в одних і тих самих тварин, на початку і наприкінці хвороби з інтервалом 2–3 тижні для одержання ***парних сироваток крові***. Для цього пробірки з кров'ю витримують 1 год при 37 °С. Утворений згусток обводять скляною паличкою або пастерівською піпеткою та ставлять на 18–20 год у холодильник при 4 °С (для прискорення ретракції кров'яного згустку і збільшення виходу сироватки). Сироватку відбирають піпеткою, за потреби центрифугують при 1500 об/хв для видалення домішок еритроцитів, обробляють пеніцилін 100–200 ОД/мл і стрептоміцином 100–200 мкг/мл, ставлять бактеріологічний контроль (посіви на МПА, МПБ, МППБ, середовище Сабуро). Сироватки зберігають у холодильнику при 4 °С або в замороженому стані при –10...–20 °С.

Носовий і вагінальний секрети відбирають за допомогою стерильних ватних тампонів на дерев'яній чи пластиковій паличці – сухих або змочених в стабілізувальному середовищі** для попередження швидкої інактивації вірусу. Тампони вміщують у флакони зі стабілізувальним середовищем.

Змиви зі слизових оболонок *(носа, рота, носоглотки, очей, прямої кишки, вагіни, препуція, клоаки у птиці)* одержують, зрошуючи відповідну порожнину за допомогою шприца зі стабілізувальним середовищем і збирають рідину, що стікає, у флакони.

---

* *Консервувальний розчин Альсевера:* 24,6 г глюкози, 9,6 г натрію цитрату, 5,04 г натрію хлориду і 1200 мл дистильованої води.

** *Склад стабілізувального середовища:* 0,9 %-й розчину NaCl (pH 7,0) або розчину Хенкса, антибіотики (пеніцилін 500 ОД/мл, стрептоміцин 500 мкг/мл і ністатин 20 ОД/мл) і білковий стабілізатора (0,5 % желатини чи 0,5–1 % альбуміну сироватки крові ВРХ).

При ураженні ротової порожнини беруть ***слину***, яку збирають у пробірку, якщо салівація інтенсивна. За помірної салівації користуються стерильним ватним тампоном, який вводять під щоку, витримують 10–15 хв, потім дістають пінцетом і за допомогою шприца відтискають слину в пробірку.

Проби ***калу*** відбирають із прямої кишки шпателем або паличкою і вміщують у пробірку чи флакон.

Проби ***сечі*** беруть за допомогою катетера або під час природного сечовипускання в стерильний посуд.

Везикулярну і пустульозну рідини відбирають шприцом із тонкою голкою чи пастерівською піпеткою, кінці якої запаюють. Поверхню везикул і пустул попередньо обробляють спиртом або ефіром. Можна зразу розбавити рідину стабілізувальним середовищем (1 : 5).

Стінки везикул, пустул, кірки і луски з поверхні шкіри знімають пінцетом та вміщують у флакони зі стабілізувальним середовищем. Також роблять зіскрібки з уражених ділянок шкіри і слизових оболонок ротової порожнини та носового дзеркала. Зіскрібки зі слизової оболонки глотки і стравоходу беруть спеціальним зондом.

Розтин трупів тварин проводять згідно із загальноприйнятою методикою. Для вірусологічного дослідження найчастіше використовують *легені, печінку, селезінку, нирки, лімфатичні вузли, слизові оболонки носа, рота, трахеї, бронхів, тонкого кишечнику, шматочки новоутворень.* За наявності макроскопічних змін органів з ураженої ділянки вирізають шматочки масою 10–20 г, захоплюючи також неушкоджену тканину. *Головний мозок* беруть повністю, розпилюючи черепну коробку після видалення волосяного покриву, шкіри і м'язів та зняття твердої мозкової оболонки. *Спинний мозок* виймають цілим або фрагментами разом із корінцями, розсікаючи вздовж хребта м'язи спини, остисті відростки хребців і видаливши тверду мозкову оболонку.

Консервування і транспортування проб патологічного матеріалу. Взятий патологічний матеріал потрібно якнайскоріше законсервувати, щоб зберегти вірус, оскільки його титр за відсутності живих клітин швидко знижується. Найкращим методом консервування патологічного матеріалу є використання термосів з *охолоджувальними сумішами:* 1) 3 частини льоду та 1 частина кухонної солі (–15…–20 °С); 2) суміш рівних об'ємів сухого льоду (твердої вуглекислоти) та етилового спирту (–70 °С); 3) сухий лід (–79 °С).

Треба мати на увазі, що деякі віруси швидко гинуть при заморожуванні. Це стосується насамперед респіраторних вірусів (наприклад, збудники ПГ-3 і РС-інфекції ВРХ). Тому для збереження таких вірусів патологічний

матеріал консервують за температури танучого льоду (2–4 °С). У деяких випадках вірусовмісний матеріал зберігають у рідкому азоті (–196 °С), зокрема кров і пухлинну тканину за діагностики хвороби Марека.

Для консервування шматочків органів і тканин можна використовувати 50 %-й розчин *гліцерину* (на 0,9 %-му розчині NaCl) у співвідношенні 1 : 5–1 : 10. Однак треба мати на увазі, що такий патологічний матеріал не придатний для дослідження в РІФ, консервування вірусовмісних рідин і зараження лабораторних об'єктів. Тому одночасно з пробами матеріалу, вміщеними у флакони з гліцерином, потрібно направляти мазки-відбитки на предметних скельцях для люмінесцентної мікроскопії. Окрім гліцерину, шматочки органів і тканин можна вміщувати в *стабілізувальне середовище*.

На пробірки і флакони наклеюють етикетки з лейкопластиру, де пишуть простим олівцем, який саме матеріал і від якої тварини отриманий. Проби вміщують у металевий контейнер, що кладуть у термос і обкладають мішечками з охолоджувальною сумішшю. Проби, консервовані гліцерином або стабілізувальним середовищем, посилають незамороженими за температури танучого льоду (2–4 °С). Термос опечатують, прикріплюють етикетку з картону або фанери, на якій вказують господарство, вид тварини, перелік матеріалу і дату. Обов'язково пишуть супровідну, де подають повну інформацію про тварину, від якої взяті проби, епізоотологічні дані господарства, вид матеріалу, попередній діагноз, прізвище спеціаліста і дату. Цими даними керуються при виборі напряму лабораторного дослідження.

Доставлені в лабораторію проби треба негайно використати для виділення вірусу. Якщо через якісь причини (наприклад, відсутність культури клітин) дослідження відкладається, патологічний матеріал потрібно зберігати при –20…–70 °С. Слід уникати багаторазового заморожування і відтавання його, оскільки це призводить до інактивації вірусу.

Підготовка вірусовмісного матеріалу для дослідження. У лабораторії отриманий патологічний матеріал звільняють від консерванту (розморожують, відмивають від гліцерину). Частину матеріалу використовують для вірусологічного дослідження, іншу – зберігають у холодильнику на випадок додаткових досліджень.

Алгоритм виготовлення 10 %-ї вірусовмісної суспензії

1. Подрібнення тканини ножицями, розтирання у ступці з додаванням стерильного кварцового піску,

2. Дадавання ФБР або розчину Хенкса з розрахунку 1 : 10, центрифугування при 2–3 тис. об/хв упродовж 15–30 хв.

3. Перенесення надосадової рідини (вірусовмісної суспензії) у флакони, додавання антибіотиків для деконтамінації: пеніцилін 100–1000 ОД/мл і стрептоміцин 100–1000 мкг/мл (залежно від виду тканини).

4. Експозиція 30–60 хв за кімнатної температури, постановка бактеріологічного контролю: посіви на МПА, МПБ, МППБ, середовище Сабуро.

5. За негативного результату бактеріологічного контролю використання вірусовмісної суспензії для зараження лабораторних об'єктів; за позитивного результату – повторна обробка вірусовмісної суспензії антибіотиками і перевірка на стерильність.

У поодиноких випадках вірусовмісну суспензію звільняють від мікрофлори пропусканням через бактеріальні фільтри (фарфорові, азбестові, мембранні), що пов'язано з частковою адсорбцією на них вірусу. Вірусовмісну суспензію зберігають при –20...–70 °С.

Підготовка патматеріалу інших видів (секрети, змиви, кал, сеча, кров тощо) проводиться аналогічно і включає такі етапи, як центрифугування, обробку антибіотиками і постановку бактеріологічного контролю.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Назвіть етапи постановки діагнозу на вірусні інфекції тварин. **2.** Які ви знаєте методи лабораторної діагностики вірусних інфекцій тварин? **3.** Назвіть мету та основні вимоги за відбору клінічного і патологоанатомічного вірусовмісного матеріалу від хворих і загиблих тварин. **4.** З якою метою у тварин беруть кров? **5.** У чому полягає підготовка вірусовмісного матеріалу для дослідження?

ТЕМА 3.2. ЕКСПРЕС-МЕТОДИ ІНДИКАЦІЇ ВІРУСІВ

3.2.1. Вірусоскопія

Вірусоскопія використовується для індикації в патологічному матеріалі віріонів вірусів віспи ссавців і птахів із родини *Poxviridae*, розміри яких досягають (300...390) × (170...260) нм. Мазки готують із папул, везикул, пустул або кірок, у птахів – із віспяних бородавок, висушують на повітрі і перед фарбуванням вміщують на 3 хв у дистильовану воду. Для фарбування віріонів найчастіше використовують метод М.А. Морозова.

Алгоритм фарбування за М.А. Морозовим:

1. Реактив № 1 – *рідина Руге* (1 мл льодяної оцтової кислоти, 2 мл 40 %-го розчину формальдегіду і 100 мл води) – 1 хв; промивання дистильованою водою.

2. Реактив № 2 – *розчин таніну* (5 г таніну, 100 мл дистильованої води і 1 мл рідкої карболової кислоти) – 1–2 хв; промивання дистильованою водою.

3. Реактив № 3 – *аміачний розчин арґентум нітрату* (5 г аргентуму нітрату розчиняють у 100 мл дистильованої води та додають по краплях 25 %-й розчин аміаку, поки не розчиниться утворений буро-чорний осад і не залишиться легка опалесценція; для фарбування реактив розбавляють дистильованою водою 1:10) – 1–2 хв при легкому підігріванні до появи темно-коричневого забарвлення; промивання дистильованою водою.

Висушені на повітрі або фільтрувальним папером препарати розглядають у світловому мікроскопі під імерсійною олією. Віріони вірусів віспи мають вигляд дрібних темно-коричневих тілець округлої форми, які розміщені у вигляді скупчень, рядами або дифузно на жовтому фоні препарату (рис. 3.1).

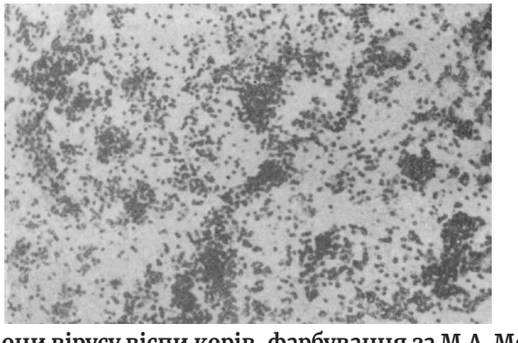


Рис. 3.1. Віріони вірусу віспи корів, фарбування за М.А. Морозовим
(Ніколау Ш.С. та ін., 1965)

Перевагою вірусоскопії є швидкість отримання результатів (упродовж 0,5–1 год після доставляння матеріалу в лабораторію), простота і доступність техніки виконання. Недоліком є те, що найчіткіші результати можна отримати тільки при дослідженні мазків зі свіжих везикул і везикулярної рідини (до нагноєння) або свіжих віспяних бородавок у птахів. При використанні мазків із пустул і кірок вірогідність методу значно знижується. Методом вірусоскопії не завжди вдається відрізнити віріони від подібних за формою клітинних елементів. Окрім того, вірусоскопія не дає змоги диференціювати різні види вірусів віспи.

3.2.2. Електронна та імуноелектронна мікроскопія

Електронна мікроскопія *(ЕМ)* є важливим методом ідентифікації вірусів, який дає змогу диференціювати їх за морфологією. Особливе значення цього методу при дослідженні вірусів, що важко культивуються в лабораторних умовах, а також при виділенні нових вірусів і діагностиці асоційованих інфекцій. Широке застосування ЕМ в діагностиці вірусних захворювань тварин стримується обмеженою доступністю електронних мікроскопів для лабораторій та їхнім технічним обслуговуванням.

Принцип роботи електронного мікроскопа. Електронний мікроскоп складається з вертикальної колони, де розміщена електронна гармата і система електромагнітних лінз, та пульта керування. Всередині колони створюється вакуум 10^{-4} – 10^{-5} мм рт. ст. Джерелом електронів є вольфрамова нитка – *катод*, при нагріванні якої струмом у кілька сотень мікроампер відбувається *термоелектронна емісія.* Електрони прискорюються в електричному полі з різницею напруги в кілька десятків тисяч вольт між катодом і анодом. Потік електронів фокусується *першою електромагнітною конденсорною лінзою* в пучок, що проходить через досліджуваний об'єкт. При цьому електрони відхиляються від початкових траєкторій через різну електронну щільність частин об'єкта. Чим щільніші ділянки об'єкта, тим більша їхня розсіювальна здатність, отже, тим темнішим буде їхнє зображення на екрані. Такий змінений потік електронів фокусується і збільшується *другою електромагнітною лінзою об'єктива*, внаслідок чого формується первинне проміжне зображення об'єкта. Це зображення ще раз збільшується *третьою електромагнітною проекційною лінзою* і потрапляє на флуоресціюючий екран, де виникає остаточне зображення об'єкта, яке можна фотографувати. Зазвичай розглядання і фотографування об'єкта відбувається за збільшення в 30–100 тис. разів. Надалі при фотодрукуванні зображення ще раз збільшується в 5–10 разів.

Ідентифікацію вірусів проводять на підставі визначення їхньої форми, розмірів і структури. Розміри віріонів та їхніх структурних частин визначають у нанометрах (нм), ділячи величину, встановлену на електронограмі, на загальне збільшення мікроскопа і фотодруку. Морфологія віріонів специфічна для кожної таксономічної групи вірусів.

Виготовлення препаратів для ЕМ. Досліджувані об'єкти для ЕМ повинні бути у вигляді вірусовмісних суспензій або ультратонких зрізів, які вміщують на *мідні предметні сітки*, покриті колодієвими, формваровими або вуглецевими *плівками-основами*.

Для отримання чіткого зображення потрібно створити різну електронну щільність між фоном та об'єктом, а також структурами об'єкта. Як *контрастувальні речовини* використовують водні розчини фосфорно-вольфрамової кислоти, молібдату амонію, силіціє-вольфрамату натрію (2–4%-ві), ацетату уранілу (0,5–2%-й), оксалату уранілу (0,5%-й), форміату уранілу (1%-й). Контрастувальна речовина непроникліва для електронного пучка, який легко проходить крізь органічний матеріал. Вона обволікує віріони, проникає в їхні гідрофільні ділянки, заміщуючи воду, і робить віріони електроннощільними, чітко визначаючи при цьому їхню структуру.

Для створення контрасту між досліджуваним об'єктом і фоном препарату застосовують ***методи негативного і позитивного контрастування***. За негативного контрастування контрастувальна речовина високої електронної густини оточує віріони, що мають меншу густину, і вони виглядають світлішими на темному фоні (рис. 3.2). За позитивного контрастування, навпаки, віріони виглядають темнішими на світлому фоні (рис. 3.3).

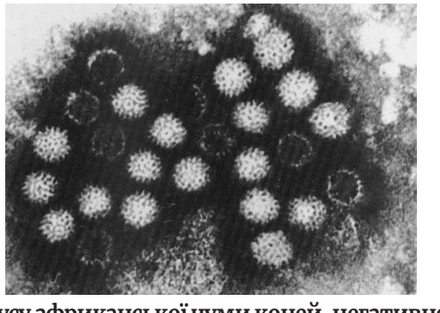


Рис. 3.2. Віріони вірусу африканської чуми коней, негативне контрастування
(Сюрін В.М. та ін., 1998)

Рис. 3.3. Віріони вірусу фіброми кролів, позитивне контрастування
(Биковський А.Ф. та ін., 1983)

Підготовка вірусовмісного матеріалу для ЕМ залежить від концентрації вірусу, його чистоти від сторонніх баластних речовин і морфології. ЕМ дає позитивні результати, якщо вміст віріонів у 1 мл вірусовмісної суспензії становить не менше ніж 10^5–10^6. Здебільшого потрібне попереднє очищення і концентрація вірусу.

Алгоритм підготовки органів, тканин і калу для ЕМ

1. Гомогенізація в 9 об'ємах дистильованої води.
2. Освітлення центрифугуванням при 5–10 тис. об/хв 10–20 хв.
3. Додавання до надосадової рідини 60 % насиченого розчину амонію сульфату (для очищення і концентрації вірусу), ретельне струшування, експозиція 1 год у рефрижераторі.
4. Центрифугування при 9–11 тис. об/хв 10 хв.
5. Видалення надосадової рідини, ресуспендування осаду в 2–4 краплях дистильованої води.

З такої суспензії отримують, як правило, препарати високої якості.

Підготовка вірусовмісних рідин. *Змиви зі слизових оболонок* концентрують ультрацентрифугуванням або ультрафільтрацією. У нативному вигляді, без попереднього очищення й концентрації можна досліджувати *везикулярну* і *пустульозну рідини*, *суспензію розтертих кірок*, *носовий секрет*, а також *культуральну рідину* інфікованої культури клітин та *алантоїсну рідину* заражених курячих ембріонів після ізоляції вірусу з досліджуваного патологічного матеріалу.

Розроблено різні методики виготовлення препаратів із вірусовмісних суспензій для ЕМ. Одним із найпоширеніших є *флотаційний метод.*

Алгоритм флотаційного методу виготовлення препаратів для ЕМ

1. Нанесення на воскову пластинку краплі вірусовмісної суспензії.
2. Вміщення на краплю вірусовмісної суспензії предметної сітки плівкою-основою вниз на 1–2 хв (для адсорбції вірусу); видалення надлишку рідини фільтрувальним папером.
3. За недостатнього очищенння від баластних речовин відмивання предметної сітки з адсорбованим вірусом: вміщення її плівкою-основою вниз на 1–2 краплі дистильованої води; видалення надлишку вологи фільтрувальним папером.
4. Контрастування препарату: вміщення предметної сітки на 30–50 сек на краплю контрастувальної речовини; видалення надлишку речовини фільтрувальним папером.

В ЕМ широко застосовують ***дослідження ультратонких зрізів*** при вивченні структури віріонів і різноманітних аспектів взаємодії вірусів із

чутливими клітинами *in vitro* та *in vivo*. Досліджуваний об'єкт (шматочки органів і тканин, осад десквамованих клітин змивів, сечі, калу, клітини зараженої культури) потрібно зафіксувати з метою максимального збереження клітинної структури. Для цього найчастіше застосовують 2,5 %-й розчин глутаральдегіду або 1 %-й розчин осмію тетраоксиду. Потім об'єкт відмивають від фіксатора ФБР, зневоднюють у зростаючих концентраціях спирту або ацетону, вміщують в епоксидну чи поліефірну смолу і полімеризують при 95 °С 60 хв або при 40–80 °С 1–2 доби. З отриманих блоків готують на ультрамікротомах зрізи завтовшки 50–90 нм, які монтують на предметні сітки і контрастують.

Імуноелектронна мікроскопія *(ІЕМ)* ґрунтується на виявленні в електронному мікроскопі комплексів віріонів з антитілами. При взаємодії вірусу з антитілами утворюються агрегати віріонів, оточених ореолом з антитіл, які легше виявити в електронному мікроскопі, ніж поодинокі вірусні частки. Метод ІЕМ чутливіший від ЕМ в 10–100 разів. Він дає змогу виявляти віріони за титру вірусу близько $10^{3,5}$ $ЕД_{50}$/мл, а різні способи приготування препаратів можуть підвищити чутливість методу ще на один-два порядки.

В ІЕМ звичайно використовують *нативну сироватку*, освітлену низькошвидкісним центрифугуванням чи фільтруванням. Для підвищення чутливості методу сироватку освітлюють *ультрацентрифугуванням* або використовують її *глобулінові фракції*. При дослідженні складно організованих вірусів сироватку прогрівають при 56–60 °С 30 хв для інактивації комплементу, який може спричинити лізис суперкапсидної оболонки віріонів. Найкраще зображення структури віріонів та їхня агрегація досягається за оптимальної концентрації антитіл, що підбирається дослідним шляхом із різними розведеннями сироватки.

Алгоритм виговлення препаратів для ІЕМ

1. Змішування досліджуваної вірусовмісної суспензії зі специфічною сироваткою в співвідношенні 4:1 або 5:1. Експозиція 1 год при 37 °С і 16–18 год при 4 °С.
2. Центрифугування при 10–15 тис. об/хв 30 хв для осадження імунних комплексів.
3. Ресуспендування осаду в кількох краплях дистильованої води, адсорбування на предметній сітці та контрастування.

Метод ІЕМ використовується не лише для індикації та ідентифікації вірусів у досліджуваному матеріалі, але й для їхньої серотипізації, а також із метою виявлення і титрування антитіл у сироватках реконвалесцентів.

3.2.3. Індикація тілець-включень вірусів

У патологічному матеріалі хворих і загиблих тварин за багатьох вірусних інфекцій виявляють *тільця-включення*, природа яких може бути різною залежно від виду вірусу: 1) скупчення віріонів потомства (зрілих або на стадії формування); 2) накопичення вірусних протеїнів, що не увійшли до складу віріонів потомства; 3) клітинний матеріал, змінений унаслідок репродукції вірусу. Здебільшого тільця-включення – це вірусні «фабрики», тобто місця синтезу вірусних протеїнів і нуклеїнових кислот та складання віріонів потомства. У вірусних «фабриках» виявляють клітинні структури (наприклад, рибосоми, осміофільні волокна).

Тільця-включення *класифікують:* 1) за локалізацією в клітині: внутрішньоядерні (типів А і В) і цитоплазматичні; 2) за складом нуклеїнової кислоти: ДНК- і РНК-вмісні; 3) за тинкторіальними властивостями: базофільні (фарбуються основними барвниками) та оксифільні, або ацидофільні (фарбуються кислими барвниками); 4) за гомогенністю: аморфні, зернисті, гранулярні та волокнисті.

Як правило, ДНК-вмісні віруси утворюють внутрішньоядерні тільця-включення, а РНК-вмісні – цитоплазматичні. Проте є винятки. Так, ДНК-геномні віруси віспи формують цитоплазматичні тільця-включення. Невелика група вірусів зумовлює появу тілець-включень обох типів (наприклад, збудники чуми ВРХ, парагрипу-3 ВРХ).

Деякі тільця-включення отримали назви на честь авторів, які вперше виявили їх: за сказу – *тільця Бабеша – Негрі*, натуральної віспи й вісповакцини – *тільця Гварнієрі*, віспи птахів – *тільця Боллінгера*, інфекційного ларинготрахеїту птахів – *тільця Зейфреда*, чуми м'ясоїдних – *тільця Лентца*, інфекційного гепатиту собак – *тільця Рубарта.*

Морфологія, тинкторіальні властивості та локалізація тілець-включень специфічні для кожного вірусу. Тому виявлення їх у патологічному матеріалі хворих або загиблих тварин має певне діагностичне значення, особливо за такої хвороби, як сказ.

Індикація тілець Бабеша – Негрі. *Тільця Бабеша – Негрі* – це скупчення нуклеокапсидів ліссавірусу сказу (без суперкапсидної оболонки) в поєднанні з продуктами клітинної реакції на вірусну інфекцію. Їх виявляють у цитоплазмі заражених клітин: за *буйної форми* сказу найчастіше в клітинах амонових рогів, а за *паралітичної форми* – в довгастому і спинному мозку.

Тільця Бабеша – Негрі мають різні розміри (від 0,25 до 25 мкм) і форму. Найчастіше трапляються тільця округлої або овальної форми, діаметром 4–10 мкм. Вони оточені оболонкою та містять зернисті включення (від 1 до 15). Тільця зафарбовуються кислими барвниками, а їхня внутрішня зернистість – основними. Така зерниста структура дає змогу диференціювати тільця Бабеша – Негрі від інших внутрішньоклітинних включень.

Кількість і розміри тілець залежать від тривалості хвороби. Тільця Бабеша – Негрі з'являються за 3–4 доби до появи перших клінічних ознак хвороби. Чим довший інкубаційний період, тим інтенсивніше вони розвиваються: більша їхня кількість, величина і чіткіше виражена внутрішня зернистість. Тільця Бабеша – Негрі виявляють у 65–85 % випадків сказу.

Для індикації в патологічному матеріалі тілець Бабеша – Негрі готують гістозрізи з різних відділів головного мозку: кора великих півкуль, мозочок, довгастий мозок, амонів ріг (не менше двох препаратів із кожного відділу). Для виявлення тілець Бабеша – Негрі використовують спеціальні методи фарбування, найчастіше за *Муромцевим* або *Селлером*.

Алгоритм фарбування за С.М. Муромцевим

1. Фіксація свіжих, вологих препаратів у етиловому або метиловому спирті 1–2 год за кімнатної температури або 15–20 хв при 50–70 °С; промивання дистильованою водою.
2. Синька Мансона 1:40 (2 г бури розчиняють у 25 мл бідистильованої води при кип'ятінні, додають у гарячий розчин 0,5 г метиленової синьки і доводять бідистильованою водою до 1 л) – 5–10 хв.
3. 5–10 %-й розчин таніну – 5–10 хв до появи блакитного відтінку; промивання дистильованою водою, висушування фільтрувальним папером.
4. Абсолютний спирт або суміш абсолютного спирту з ацетоном (1:1) – кілька секунд; висушування на повітрі.

Препарати розглядають у світловому мікроскопі під імерсійною олією. Цитоплазма нервових клітин блідо-блакитна, ядра сині, ядерця темно-сині, еритроцити оранжево-червоні, а тільця Бабеша – Негрі різко окреслені, фіолетового кольору з рожевим відтінком і темно-синьою зернистістю.

Алгоритм фарбування за Селлером

1. Нанесення на свіжі, вологі препарати фарби: суміш 1%-х розчинів основного фуксину і метиленового синього у співвідношенні 1:2 – 10–30 сек.
2. Промивання ФБР, висушування на повітрі.

Нервові клітини (цитоплазма, ядра та ядерця) зафарбовуються в синій колір, еритроцити цегляно-червоні, а тільця Бабеша – Негрі пурпурово-червоного кольору з темно-синьою зернистістю.

3.2.4. Метод ДНК-зондів

Метод ДНК-зондів використовують із метою виявлення вірусних ДНК- і РНК-геномів безпосередньо в патологічному матеріалі. Він ґрунтується на молекулярній гібридизації нуклеїнових кислот – здатності одноланцюгових молекул з'єднуватися у дволанцюгові за умови їхньої комплементарності. Цей метод незамінний для ідентифікації вірусів, що не культивуються в лабораторних умовах, а також персистувальних вірусів і провірусів (інтегровані вірусоспецифічні нуклеотидні послідовності в складі клітинних геномів).

Суть *молекулярної гібридизації* полягає в тому, що молекулу двонитчастої ДНК денатурують на два окремі нуклеотидні ланцюги під дією температури 80–100 °С або лугу, а потім у разі тривалої експозиції при 55–65 °С одноланцюгові ДНК взаємодіють і утворюють двонитчасту молекулу, ідентичну вихідній. Реакція молекулярної гібридизації може відбутися між будь-якими двома одноланцюговими нуклеїновими кислотами – ДНК – ДНК, ДНК – РНК, РНК – РНК, але за обов'язкової умови: якщо вони мають комплементарні нуклеотидні послідовності.

Одноланцюгові ДНК, за допомогою яких у досліджуваному матеріалі виявляють комплементарні нитки, називаються *ДНК-зондами*. Їх виготовляють на основі плазмідного вектора, в який вбудовують висококонсервативний фрагмент вірусної ДНК або ДНК-копію необхідного фрагмента вірусної РНК, що отримують зворотною транскрипцією. Рекомбінантну ДНК мітять радіоактивним фосфором (P^{32}) або біотином і денатурують при 80–100 °С. У результаті отримують дві одноланцюгові молекули ДНК із вірусоспецифічними нуклеотидними послідовностями, які є ДНК-зондами.

Методика індикації вірусних нуклеїнових кислот у патологічному матеріалі методом ДНК-зондів складається з таких *етапів:*

1. Конструювання ДНК-зонда і мічення P^{32} або біотином.

2. Виділення з патологічного матеріалу нуклеїнових кислот та їхня денатурація (центрифугат суспензії з досліджуваного матеріалу обробляють спочатку протеїназою К, потім фенолом із хлороформом, які руйнують протеїни; після їхнього видалення нуклеїнові кислоти осаджують при –70 °С, осад відмивають спиртом і піддають денатурації кип'ятінням або обробкою лугом).

3. Контакт одноланцюгових нуклеїнових кислот із ДНК-зондом при 55–65 °С упродовж 2 год, що призводить до утворення дволанцюгових молекул у разі їхньої комплементарності (молекулярна гібридизація).

4. Видалення всіх негібридизованих молекул нуклеїнових кислот (обробкою натрію додецилсульфатом і натрію цитратом).

5. Індикація утворених дволанцюгових молекул нуклеїнових кислот за міткою зонда (P^{32} виявляють методом авторадіографії або підрахунком імпульсів у гамма-лічильнику, а наявність біотину встановлюють колориметричним методом).

Метод ДНК-зондів є високочутливою реакцією, яка дає змогу встановити в досліджуваному матеріалі нуклеїнові кислоти в низьких концентраціях (1–10 пг*). Проте чутливість методу часто недостатня для виявлення провірусів, якщо заражено небагато клітин в організмі. У такому разі проводять ампліфікацію певних фрагментів ДНК у ПЛР, а потім ідентифікують ДНК за допомогою міченого зонда.

Розвиток технології виробництва рекомбінантних ДНК та хімічного синтезу нуклеїнових кислот дає змогу отримувати ДНК-зонди будь-якої специфічності, що сприяє широкому впровадженню цього методу у вірусологічну практику.

3.2.5. Полімеразна ланцюгова реакція

Полімеразна ланцюгова реакція *(ПЛР)* полягає в багатократному збільшенні *in vitro* копій унікальних фрагментів ДНК вірусу, який треба ідентифікувати в досліджуваному матеріалі.

Ділянка ДНК, що потрібно копіювати, називається *ампліфіконом*. Його межі визначаються, як правило, двома олігонуклеотидними праймерами. Це відрізки одноланцюгової ДНК завдовжки 20–30 нуклеотидів, які комплементарні певним послідовностям кожної з ниток ДНК-матриці та слугують затравкою для синтезу нового ланцюга ДНК. При синтезі ДНК праймери фізично вбудовуються у фрагменти ДНК-матриці, що ампліфікується.

Праймери добудовує до заданого розміру термостабільний ензим *Taq-ДНК-полімераза*, яка отримана з термофільної бактерії *Thermophylus aquaticus.* Taq-ДНК-полімераза витримує багаторазове нагрівання до 90–100 °С, що дає змогу проводити реакцію в автоматичному режимі – *ампліфікаторі*. Taq-ДНК-полімераза синтезує ланцюг ДНК розміром до 1000 пар нуклеотидів за 1 хв. Можливості ПЛР в ідентифікації вірусів ще більше зросли у зв'язку з виділенням із термофільної бактерії *Thermus thermophylus* ензиму, що проявляє активність як ДНК-полімерази, так

* Один пікограм (пг) становить 10^{-12} г.

і зворотної транскриптази. За допомогою цього ензиму спрощується виявлення у ПЛР геномів РНК-вмісних вірусів.

Реакційна суміш, де відбувається ПЛР, має містити в достатній кількості нуклеотиди («будівельні блоки»), специфічні олігонуклеотидні праймери і досліджуваний матеріал у вигляді ізольованої з нього ДНК або ДНК-копії РНК-геному, яку отримують зворотною транскрипцією.

ПЛР складається **з *трьох процесів***, що циклічно повторюються:

1) денатурація досліджуваної дволанцюгової ДНК нагріванням реакційної суміші до 90–100 °С;

2) відпалювання праймерів (гібридизація праймерів із комплементарними ділянками одноланцюгової ДНК при 55–65 °С;

3) елонгація (добудова) праймерів до заданого розміру вірусного геному під дією *Taq-ДНК-полімерази* при 72 °С.

Весь цикл ампліфікації триває всього 5–10 хв і може повторюватися до 20–40 разів. За кожний цикл відбувається подвоєння кількості молекул ДНК у пробі. Кожен із новосинтезованих ланцюгів ДНК слугує матрицею для синтезу молекул ДНК, які за довжиною та нуклеотидними послідовностями ідентичні ділянці ДНК, вибраній для ампліфікації. Практично вдається ампліфікувати фрагменти ДНК завдовжки до 3–4 тис. пар нуклеотидів (хоча можна досягти і 10 тис. пар нуклеотидів). За 40 циклів ампліфікації кількість копій ДНК зростає в 10^{13} разів, причому довгі необмежені копії ДНК синтезуються лише з вихідних батьківських ланцюгів ДНК. Таку кількість вірусної ДНК тепер можна ідентифікувати будь-яким методом: 1) електрофорез в агарозі або поліакриламідному гелі з фарбуванням бромідом етидію; 2) колориметричний, флуорометричний чи радіоізотопний методи з використанням мічених попередників синтезу нуклеїнових кислот і, зокрема, ДНК-зондів. Збільшення кількості вірусної ДНК у 10^6 разів цілком достатньо для виявлення її методом ДНК-зондів без попереднього накопичення вірусу в культурі клітин.

ПЛР у поєднанні з методом ДНК-зондів успішно використовують для діагностики хвороби Ауєскі, чуми ВРХ, вірусної діареї ВРХ, інфекційного ринотрахеїту ВРХ, класичної та африканської чуми свиней, алеутської хвороби норок, хвороби Марека та ін. ПЛР незамінна при ідентифікації вірусів, для яких ще не знайдені чутливі культури клітин або не розроблені серологічні тести, а також при дослідженні проб із навколишнього середовища, що сильно контаміновані мікроорганізмами і непридатні для зараження культури клітин.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Які ви знаєте експрес-методи індикації вірусів? **2.** У чому полягає вірусоскопія? **3.** Охарактеризуйте електронну та імуноелектронну мікроскопію як експрес-методи індикації вірусів. **4.** Що таке тільця-включення вірусів, яка їхня природа та діагностичне значення? **5.** Охарактеризуйте метод ДНК-зондів. **6.** Охарактеризуйте ПЛР.

ТЕМА 3.3. ІЗОЛЯЦІЯ ВІРУСІВ У ЧУТЛИВИХ БІОЛОГІЧНИХ СИСТЕМАХ

3.3.1. Ізоляція вірусів у організмі лабораторних тварин

Однією з поширених моделей для виділення вірусів із патологічного матеріалу є *лабораторні тварини*. Найчастіше у вірусологічній практиці застосовують білих мишей, кролів, білих пацюків і мурчаків, рідше – сірійських хом'яків і тхорів. Іноді як лабораторні об'єкти використовуються кури, голуби, кошенята, цуценята. І дуже рідко ставлять біопробу на природно сприйнятливих тваринах (наприклад, за ящуру, інфекційної анемії коней, класичної та африканської чуми свиней), що пов'язано з потенційною небезпекою поширення інфекції та економічними витратами.

Основні вимоги, які ставляться до лабораторних тварин: 1) мають бути абсолютно здоровими; 2) мають бути чутливими до досліджуваного вірусу (відповідного виду і віку); 3) повинні мати стандартну чутливість до вірусу.

Тварин, які надходять до віварію вірусологічної лабораторії, витримують у карантині 2–3 тижні. У разі встановлення інфекційного захворювання всю партію тварин вибраковують. Треба мати на увазі, що в лабораторних тварин трапляються *латентні інфекції*. Наприклад, серед мишей може персистувати вірус ектромелії, який спричинює некротичне запалення лап, а за генералізації інфекції – вогнища некрозу в печінці й селезінці. Пневмонії в мишей спричинюють близько 10 вірусів, найчастіше респіровірус. Мамаренавірус лімфоцитарного хоріоменінгіту і вірус енцефаломієліту мишей зумовлюють нейроінфекції, що проявляються судомами, парезами і паралічами.

Постановка біопроби на тваринах-вірусоносіях може призвести до активізації латентного збудника і діагностичної помилки в кінцевому результаті. Безсимптомна вірусна інфекція проявляється також

зниженням (аж до повного зникнення) чутливості тварин до досліджуваного вірусу внаслідок явища інтерференції. Цих труднощів удається уникнути, якщо періодично проводити контроль. Для виявлення латентних інфекцій убивають кількох тварин, із певних органів виготовляють суспензії та заражають відповідними методами тварин цієї ж групи (наприклад, суспензію з мозку вводять інтрацеребрально). За наявності безсимптомного вірусоносійства зараження призводить до загострення інфекційного процесу. Крім того, для виявлення латентної інфекції тварин обробляють імунодепресантами, зокрема кортизоном. Ступінь чутливості тварин до вірусів можна встановити, якщо заражати їх заздалегідь відомим вірусовмісним матеріалом.

Для культивування вірусів використовують лабораторних тварин того виду, який є чутливим до цього збудника. Наприклад, штами вірусу грипу А людини і свиней добре репродукуються в організмі тхорів, хом'яків, мишей і пацюків, а кролі й мурчаки несприйнятливі до них. Вік тварини теж має істотне значення за постановки біопроби. Більшість вірусів краще розмножується в організмі молодих і навіть новонароджених тварин. Так, до вірусу ящуру чутливі новонароджені мишенята і кроленята, в той час як дорослі тварини абсолютно резистентні. Проте в окремих випадках для відтворення специфічних клінічних ознак хвороби використовують дорослих тварин, наприклад, кролів за діагностики хвороби Ауєскі або мурчаків за діагностики ящуру.

Стандартна чутливість до вірусу досягається підбором тварин за принципом аналогів (одного віку, статі, маси). Однією пробою досліджуваного матеріалу заражають не менше чотирьох тварин. У науково-дослідній роботі використовують тварин *інбредних ліній,* що отримані внаслідок близькородинного спаровування (впродовж не менш як 20 поколінь), які практично однаково реагують на той чи інший вірус.

Для деяких вірусологічних досліджень (наприклад, за виділення вірусу з нез'ясованими патогенними властивостями) потрібно застосовувати *гнотобіотів.* Це стерильні тварини, які одержують шляхом кесарева розтину або ампутації матки і вирощують у стерильних ізоляторах. Стерильних птахів отримують інкубацією яєць зі стерильною шкаралупою в стерильному інкубаторі. Гнотобіоти більш чутливі до вірусної інфекції. Крім того, їхнє застосування повністю виключає вплив латентних збудників, які можуть персистувати в організмі лабораторних тварин. Проте отримання і вирощування гнотобіотів пов'язано з великими економічними затратами, що стримує впровадження їх у вірусологічну практику.

Методи експериментального зараження лабораторних тварин. Розроблено різні способи введення інфекційного матеріалу лабораторним тваринам, що визначається тропізмом вірусу. У вірусологічній практиці найчастіше використовують такі *методи зараження* (рис. 3.4): підшкірний (п/ш), внутрішньошкірний (в/ш), у скарифіковану шкіру, внутрішньом'язовий (в/м), внутрішньочеревний (в/ч), внутрішньовенний (в/в), інтраназальний (і/н), інтрацеребральний (і/ц).

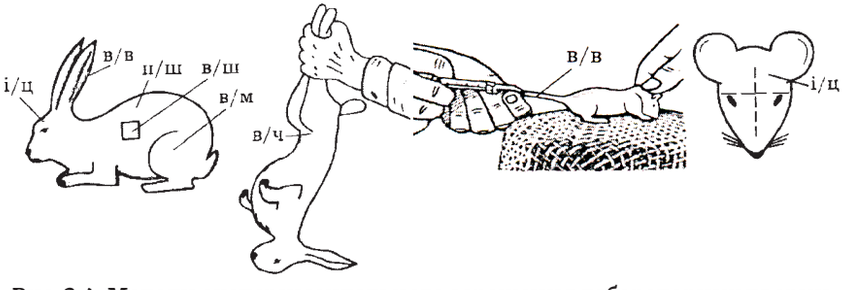


Рис. 3.4. Методи експериментального зараження лабораторних тварин
(Скибіцький В.Г. та ін., 2005)

Алгоритм підшкірного зараження

1. Видалення шерсті в ділянці спини, черева або бокової поверхні та дезінфекція 3 %-м спиртовим розчином йоду.

2. Захоплення складки шкіри і в її основу введення голки паралельно до поверхні тіла. Максимальна інфікувальна доза: миші – 0,5 мл, пацюки і мурчаки – 3 мл, кролі – 5 мл.

Алгоритм внутрішньошкірного зараження

1. У кролів і мурчаків на боці, череві або спині вистригання і виголювання шерсті та дезінфекція 3 %-м спиртовим розчином йоду.

2. Введення тонкої голки скосом назовні паралельно до поверхні шкіри, щоб вона просвічувалася крізь епідерміс, та інокуляція матеріалу до припіднімання шару шкіри у вигляді бугорка.

3. У дрібних тварин зараження в плантарну поверхню задньої кінцівки, введення голки в шкіру в напрямку від пальців до заплесневого суглоба. Максимальна інфікувальна доза: миші – 0,02 мл, пацюки – 0,05 мл, мурчаки і кролі – 0,1 мл.

Алгоритм зараження в скарифіковану шкіру

1. У кролів на боці, череві або спині вистригання і виголювання шерсті та дезінфекція 3 %-м спиртовим розчином йоду.

2. Нанесення кілька поверхневих подряпин голкою, пастерівською піпеткою або скарифікатором (до появи крапель лімфи).

3. Інокуляція матеріалу на скарифіковану ділянку, втирання шпателем або скляною паличкою. Максимальна інфікувальна доза – 1 мл.

Алгоритм внутрішньом'язового зараження

1. Видалення шерсті на стегні й дезінфекція 3 %-м спиртовим розчином йоду.

2. Введення голки у м'язи стегна, спрямовуючи її перпендикулярно до поверхні тіла. Максимальна інфікувальна доза: миші – 0,3 мл, пацюки – 1 мл, мурчаки – 2 мл, кролі – 5 мл.

Алгоритм внутрішньочеревного зараження

1. Фіксація тварини вертикально вниз головою з метою зміщення органів черевної порожнини до діафрагми і запобігання травмування кишечнику за інокуляції матеріалу.

2. Відтягування задньої кінцівки, дезінфекція ділянки паху 3 %-м спиртовим розчином йоду.

3. Введення голки в ділянку паху під кутом 45° до поздовжньої осі тіла на глибину 0,3–0,5 см. Максимальна інфікувальна доза: миші – 1 мл, пацюки – 2 мл, мурчаки – 5 мл, кролі – 10 мл.

Алгоритм внутрішньовенного зараження

1. Зараження кролів у крайову вену вуха. Вистригання шерсті на місці ін'єкції, дезінфекція шкіри 3 %-м спиртовим розчином йоду, масажування або натирання ксилолом вуха і перетискання біля основи для набухання вени.

2. Введення голки в судину в напрямку до голови приблизно на 1 см, при цьому не перетискають вухо.

3. У білих мишей і пацюків зараження у бокові вени хвоста, для розширення яких розтирання хвоста ксилолом або витримування в гарячій воді.

Перетискання хвоста біля основи, введення голки скосом назовні у вену нижньої третини хвоста, де шкіра тонша, в напрямку до тулуба. При потраплянні в судину легке надходження рідини зі шприца і побіління судини на всьому проміжку.

4. У мурчаків хірургічне препарування яремної вени. Максимальна інфікувальна доза: миші – 1 мл, пацюки і мурчаки – 2 мл, кролі – 5 мл.

Алгоритм інтраназального зараження

1. Застосування легкого ефірного наркозу (за винятком кролів) з метою уникнення розбризкування вірусовмісної суспензії при чханні.

2. Фіксація сонної тварини ніздрями догори і в кожну з них введення інфекційного матеріалу за допомогою шприца або пастерівської піпетки. Максимальна інфікувальна доза: миші – 0,05 мл, пацюки – 0,1 мл, мурчаки – 0,3 мл, кролі – 1 мл.

Алгоритм інтрацеребрального зараження

1. У молодих кролів і мурчаків у ділянці надочного жолоба видалення шерсті й дезінфекції 3 %-м спиртовим розчином йоду.

2. Проколювання шкіри і черепа в надочному жолобі туберкуліновою голкою з обмежувачем (на 4–5 мм).

3. У дорослих кролів зараження через трепанаційний отвір, зроблений на 2 см вище поперекової лінії, умовно проведеної між зіницями.

4. У мишей і пацюків голкою з обмежувачем (на 1–2 мм) проколювання шкіри і черепа в центрі квадрата, утвореного середньою сагітальною лінією і перпендикуляром до неї по зовнішньому краю очниць. Максимальна інфікувальна доза: миші – 0,03 мл, пацюки – 0,05 мл, мурчаки – 0,1 мл, кролі – 0,3 мл.

Індикація вірусів у організмі лабораторних тварин. Заражених тварин розміщують в ізоляторах і ведуть щоденне спостереження. *Ознаками репродукції вірусів* у організмі лабораторних тварин є клінічні симптоми, патологоанатомічні зміни і загибель (табл. 3.1). Треба мати на увазі, що загибель тварин у перші дні після зараження можуть спричинити токсичні чинники або травма. Клінічні ознаки в заражених лабораторних тварин найчастіше мають неспецифічний характер (наприклад, пригнічення, зниження апетиту, задуха тощо). Однак, в окремих випадках біопробою на лабораторних тваринах можна відтворити типову клінічну картину захворювання, зокрема хвороби Ауєскі на кролях та ящуру на мурчаках. Якщо тварини не реагують на зараження, їх убивають через проміжок часу, що дорівнює двом інкубаційним періодам, беруть при розтині відповідний матеріал і проводять наступний пасаж.

Розтин заражених лабораторних тварин роблять зразу після загибелі з метою аналізу патологоанатомічних змін і головне – відбору вірусовмісного матеріалу для ідентифікації виділеного збудника. Трупи дрібних тварин фіксують голками на дошці або кюветі з парафіном у спинному положенні. Для великих тварин використовують спеціальні столики або дошки з відповідними фіксувальними пристосуваннями. Розтин проводять із дотриманням правил асептики й антисептики. Основне правило розтину: до трупа можна торкатися тільки інструментами або руками в гумових рукавицях.

Таблиця 3.1

Культивування вірусів у організмі лабораторних тварин

Віруси	Методи зараження	Ознаки репродукції вірусів
1	2	3
Білі миші		
Ліссавірус сказу (збудник сказу)	і/ц, п/ш	Скуйовдження шерсті, горбатість спини, порушення координації рухів, параліч кінцівок, загибель
Альфагерпесвірус свиней 1 (збудник хвороби Ауєскі)	і/ц, п/ш	Паралічі, загибель
Вірус ящуру	п/ш, в/ч	Парези, паралічі, загибель, некроз скелетних м'язів і міокарда
Везикуловіруси Індіана, Алагоас, Кокал і Нью-Джерсі (збудники везикулярного стоматиту)	і/ц, в/ч	Скуйовдження шерсті, тремтіння, атаксія, параліч кінцівок, загибель
Альфагерпесвіруси коней 1 і 4 (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	і/ц	Симптоми енцефаломієліту, загибель
	в/ч, і/н	Загибель, гепатит
Вірус грипу А (штами вірусу коней, свиней, птахів)	і/н	Симптоми ураження дихальних шляхів, загибель, вогнищева пневмонія
Вірус японського енцефаліту	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
Віруси енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного і західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель
Білі пацюки		
Альфагерпесвірус свиней 1 (збудник хвороби Ауєскі)	п/ш, і/н	Паралічі, загибель

Продовження таблиці 3.1

1	2	3
Вірус грипу А (штами вірусу свиней)	і/н	Симптоми ураження дихальних шляхів, загибель
Вірус японського енцефаліту	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
Віруси енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного і західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель
Мурчаки		
Вірус ящуру	в/ш	Афти на лапках і слизовій оболонці ротової порожнини
Везикуловіруси Індіана, Алагоас, Кокал і Нью-Джерсі (збудники везикулярного стоматиту)	в/ш	Везикули на лапках і язиці
Альфагерпесвіруси коней 1 і 4 (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	в/ч	Аборт або загибель, некрози в печінці, крововиливи в легенях, гастроентерит
Вірус японського енцефаліту	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
Віруси енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного і західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель
Кролі		
Ліссавірус сказу (збудник сказу)	і/ц	Паралічі, загибель
Альфагерпесвірус свиней 1 (збудник хвороби Ауєскі)	п/ш, в/м	Збудження, свербіння, розчухи, паралічі, загибель
Вірус ящуру	п/ш, в/ч	Парези, паралічі, загибель, некроз скелетних м'язів і міокарда
Везикуловіруси Індіана, Алагоас, Кокал і Нью-Джерсі (збудники везикулярного стоматиту)	у слизову оболонку язика	Везикули на слизовій оболонці ротової порожнини

Закінчення таблиці 3.1

1	2	3
Вірус віспи корів	в/ш, у скарифіковану шкіру	Інфільтрати з некрозом і геморагіями, папули, пустули на шкірі
Вірус японського енцефаліту	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
Віруси енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного і західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаломієліту або енцефаломієліту, загибель
Вірус віспи кролів	в/ш, у скарифіковану шкіру	Набряк і некроз шкіри
Вірус міксоми (збудник міксоматозу кролів)	в/ш, у кон'юнктивальний мішок	Блефарокон'юнктивіт, риніт, пухлинні вузлики або драглисті набряки на шкірі
Вірус фіброми кролів	п/ш	Пухлини на шкірі з з некрозом та ерозіями
Каппапапіломавірус 2 (збудник папіломатозу кролів)	у скарифіковану шкіру	Папіломи на шкірі
Хом'яки		
Мастаденовіруси ВРХ A, B і C, агаденовірус ВРХ D	п/ш, в/ч, і/ц, у грудну порожнину	Пухлини
Вірус грипу А (штами вірусу свиней)	і/н	Симптоми ураження дихальних шляхів, загибель
Альфагерпесвіруси коней 1 і 4 (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	і/ц	Симптоми енцефаломієліту, загибель
	і/н, п/ш, в/ч	Загибель, гепатит
Вірус японського енцефаліту	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
Віруси енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного, західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель
Вірус саркоми Рауса	п/ш	Пухлини

Алгоритм розтину лабораторних тварин (рис. 3.5)

1. Фіксація трупів тварин, обробка шкіри спиртом або дезрозчином (3–5 %-ві розчини фенолу чи лізолу). Розріз шкіри по середній лінії від симфізу до шиї, а далі – в напрямку до кінцівок. Препарування шкіри і фіксація голками.

2. Розтин *черевної порожнини:* розріз черевної стінки по середній лінії від симфізу до мечоподібного відростка, а далі – під лінією діафрагми. Відведення вбік і фіксація утворених трикутників черевної стінки.

3. Відтягнення пінцетом кишечнику вліво до появи паренхіматозних органів. Відбір вірусовмісного матеріалу: шматочки печінки, селезінки, нирок, брижових лімфатичних вузлів, ділянок кишечнику (за наявності патологоанатомічних змін або з урахуванням клінічних ознак перед загибеллю). У дрібних тварин відбір цілих органів.

4. Розтин *грудної порожнини:* розрізання ребер і видалення їх разом із грудною кісткою. Відбір вірусовмісного матеріалу: легені, середостінні лімфатичні вузли, трахея.

5. Розтин *черепної порожнини.* Фіксація передніх кінцівок і голови тварини, яка лежить на череві. Розріз шкіри у ділянці шиї та в напрямку до очниць. Препарування шкіри разом із вухами і стягнення вперед, оголення черепної коробки. Розріз черепної коробки від великого мозкового отвору в напрямку до очниць. Розріз черепної кістки між очницями і видалення всієї вирізаної ділянки. У великих тварин – розпилювання кісток черепа. З основи черепа діставання головного мозку після підрізання черепномозкових нервів.

Патологічний матеріал від заражених лабораторних тварин беруть згідно з тропізмом вірусу і використовують для ідентифікації виділеного збудника. Матеріал зберігають у замороженому стані при –20...–70 °С.

а) б)

Рис. 3.5. Розтин миші:
1 – розтин черевної та грудної порожнин; 2 – розтин черепної порожнини
(Троценко М.І. та ін., 1989)

3.3.2. Ізоляція вірусів у курячих ембріонах

У вірусологічній практиці для виділення вірусів із патологічного матеріалу використовують *курячі ембріони*, які мають істотні *переваги* порівняно з лабораторними тваринами. Їм властива висока чутливість до вірусів, що пояснюється недостатнім розвитком імунної системи. Курячі ембріони стерильні, економічні й доступні для будь-якої вірусологічної лабораторії. Разом з тим, не можна повністю гарантувати стерильність цієї біологічної системи, оскільки курячі ембріони від заражених птахів можуть містити різні патогени (віруси лейкозу і саркоми Рауса, ортоавулавірус 1, метаавулавірус 2, грипу А, коронавірус, альфагерпесвірус 1, тремовірус А, віспи, аденовіруси, мікоплазми, сальмонели).

Для зараження використовують курячі ембріони віком від 5 до 12 діб із благополучних щодо інфекційних захворювань господарств. Ембріони старшого віку менш чутливі до вірусів, що пов'язано з підвищенням у них концентрації неспецифічних вірусних інгібіторів.

Будова курячого ембріона наведена на рис. 3.6. Зовні ембріон вкритий твердою пористою шкаралупою, до якої прилягає *підшкаралупна оболонка*. Біля тупого кінця яйця вона розділяється на два листки, де утворюється *повітряна камера*. До підшкаралупної оболонки прилягає *хоріоналантоїсна оболонка* (ХАО), що пронизана кровоносними судинами і виконує функцію органа дихання ембріона. ХАО обмежує *алантоїсну порожнину*, в якій накопичуються продукти обміну. Зародок знаходиться ексцентрично в амніотичній порожнині, що заповнена навколоплідною рідиною й оточена оболонкою. Зародок пуповиною зв'язаний із *жовтковим мішком*, який є резервуаром поживних речовин. У гострому кінці яйця знаходиться залишок білка, який містить лізоцим, що захищає зародок від стафілококової та інших інфекцій.

У лабораторії курячі ембріони інкубують у термостаті за температури 37 °С, вологості 60–70 % і відкритих вентиляційних отворах. Перед зараженням курячі ембріони розглядають на овоскопі в темному приміщенні. При цьому встановлюють їхню життєздатність: кровоносні судини ХАО наповнені кров'ю, зародок рухомий.

На шкаралупі простим олівцем відмічають межу повітряної камери і місцезнаходження зародка. Шкаралупу перед зараженням обробляють 2 %-м спиртовим розчином йоду, а іноді ще й протирають запаленим спиртовим тампоном.

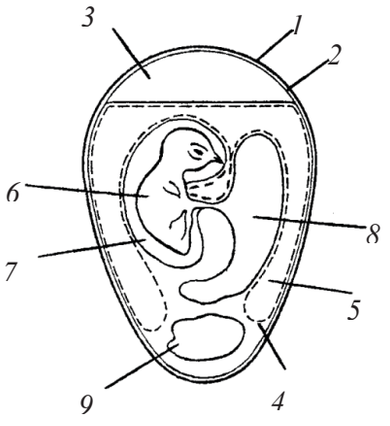


Рис. 3.6. Будова курячого ембріона 10-денного віку:
1 – шкаралупа; 2 – підшкаралупна оболонка; 3 – повітряна камера; 4 – хоріоналантоїсна оболонка; 5 – алантоїсна порожнина; 6 – зародок; 7 – амніотична порожнина; 8 – жовтковий мішок; 9 – білок
(Ніколау Ш.С. та ін., 1965)

Методи експериментального зараження курячих ембріонів. Розроблено *шість методів* експериментального зараження курячих ембріонів: 1) в алантоїсну порожнину (9–11-й день інкубації); 2) на ХАО (10–12-й день інкубації); 3) у жовтковий мішок (5–7-й день інкубації); 4) в амніотичну порожнину (6–10-й день інкубації); 5) у зародок (7–12-й день інкубації); 6) у кровоносні судини ХАО (11–12-й день інкубації).

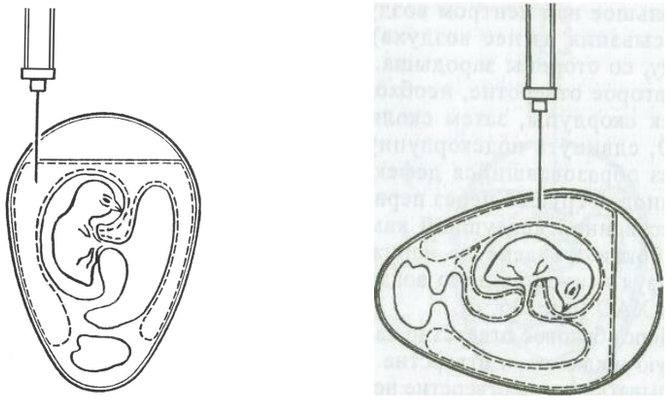
Останні два методи використовуються нечасто. Інокуляція інфекційного матеріалу безпосередньо в зародок нерідко супроводжується неспецифічною загибеллю внаслідок травмування. Зараження в кровоносні судини ХАО є технічно складним методом.

Зараження в ту чи іншу структуру курячого ембріона проводять у період її максимального розвитку, коли кількість клітин є найбільшою. Вибір методу зараження курячих ембріонів визначається тропізмом вірусу. Кожною пробою досліджуваного матеріалу заражають не менше чотирьох ембріонів у дозі 0,1–0,2 мл.

Алгоритм зараження в алантоїсну порожнину (*2 способи*, рис. 3.7)

1. Вертикальне розміщення ембріона. У шкаралупі висікання отвору на 5–6 мм вище межі повітряної камери. Введення голки вертикально на глибину 10–12 мм. Внесення вірусовмісного матеріалу і закриття отвору краплею розплавленого парафіну.

2. Горизонтальне розміщення ембріона. На боковій поверхні шкаралупи висікання отвору (попередньо на овоскопі вибирають безсудинну ділянку ХАО) і введення голки на глибину 2–3 мм. Для запобігання витікання рідини висікання ще одного отвіру над повітряною камерою. Після зараження закриття отворів краплею розплавленого парафіну.



1-й спосіб 2-й спосіб

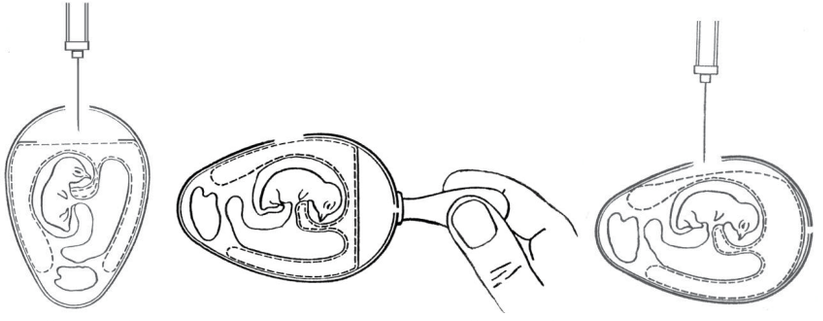
Рис. 3.7. Зараження курячого ембріона в алантоїсну порожнину

(Ніколау Ш.С. та ін., 1965)

Алгоритм зараження на ХАО (*2 способи*, рис. 3.8)

1. *Через природну повітряну камеру*. Вертикальне розміщення ембріона. У шкаралупі над повітряною камерою вирізання отвору діаметром 1,5–2 см. Пінцетом обережне знімання підшкаралупної оболонки (без пошкодження ХАО) і нанесення вірусовмісного матеріалу. Закриття отвору лейкопластиром.

2. *Через штучну повітряну камеру*. Горизонтальне розміщення ембріона. У шкаралупі висікання двох отворів: один невеликий – над центром повітряної камери, а другий діаметром 0,2–0,5 см – на боковій поверхні з боку зародка над безсудинною ділянкою ХАО, яку попередньо вибирають на овоскопі. Обережне проколювання оголеної підшкаралупної оболонки, не пошкоджуючи ХАО. Відсмоктування повітря з природної повітряної камери гумовою грушею з метою переміщення ХАО та утворення штучної повітряної камери. Нанесення вірусовмісного матеріалу на ХАО через боковий отвір. Закриття отвору на боці лейкопластиром, а над повітряною камерою – краплею розплавленого парафіну. Інкубація ембріона у горизонтальному положенні боковим отвором догори.



1-й спосіб 2-й спосіб

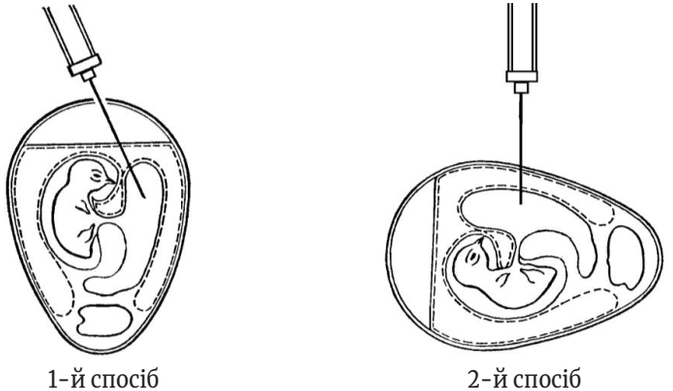
Рис. 3.8. Зараження курячого ембріона на ХАО

(Ніколау Ш.С. та ін., 1965)

Алгоритм зараження в жовтковий мішок (*2 способи*, рис. 3.9)

1. Вертикальне розміщення ембріона. Висікання отвору в шкаралупі над центром повітряної камери. Введення голки на глибину 3,5–4 см під кутом 45° до вертикальної осі в напрямку, протилежному місцезнаходженню зародка. Після інокуляції вірусовмісного матеріалу закриття отвору краплею розплавленого парафіну.

2. Горизонтальне розміщення ембріона, щоб жовтковий мішок був угорі, а зародок – внизу. Висікання отвору в шкаралупі з боку жовткового мішка на середині довжини яйця. Введення голки вертикально на глибину 1 см. Після зараження закриття отвору краплею розплавленого парафіну.



1-й спосіб 2-й спосіб

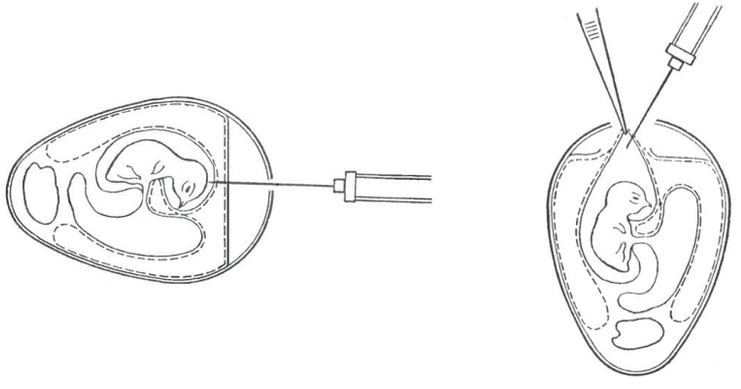
Рис. 3.9. Зараження курячого ембріона в жовтковий мішок

(Ніколау Ш.С. та ін., 1965)

Алгоритм зараження в амніотичну порожнину (*2 способи*, рис. 3.10)

1. *Закритий спосіб.* Проведення зараження на овоскопі. Горизонтальне розміщення ембріона. Висікання отвору в шкаралупі над центром повітряної камери. Введення голки із затупленим кінцем у напрямку до зародка, легким поштовхом проколювання амніона та інокуляція вірусовмісного матеріалу. Доказом того, що голка потрапила в амніон, є рух зародка в напрямку її пересування і відчуття слабого опору за введення матеріалу. Якщо голка знаходиться в алантоїсній порожнині, суспензія зі шприца вільно вводиться в яйце. Після зараження закриття отвору краплею розплавленого парафіну.

2. *Відкритий спосіб.* Вертикальне розміщення ембріона. У шкаралупі над повітряною камерою вирізання отвіру діаметром 1–1,5 см. Зняття пінцетом підшкаралупної оболонки. Введення пінцету із зімкненими браншами у напрямку до зародка, захоплення амніотичної оболонки разом із ХАО і підтягування зародка до отвору. Введення голки в амніон та інокуляція вірусовмісного матеріалу. Відпускання оболонок і закриття отвору лейкопластиром.



1-й спосіб 2-й спосіб

Рис. 3.10. Зараження курячого ембріона в амніотичну порожнину
(Ніколау Ш.С. та ін., 1965)

Алгоритм зараження в зародок (*2 способи*)

1. Заражають так само, як в амніон закритим способом, із тією різницею, що беруть гостру голку. Ознакою того, що голка потрапила в зародок, є підкорення його рухам голки.

2. Заражають так само, як в амніон відкритим способом. Через отвір у шкаралупі підтягують зародок. Голку вводять у різні ділянки тіла зародка або в головний мозок.

Алгоритм зараження в кровоносні судини ХАО (*2 способи*)

1. Проведення зараження на овоскопі. Вибір великої кровоносної судини, по ходу якої обережне видалення незначної ділянки шкаралупи. Нанесення краплі спирту на підшкаралупну оболонку, щоб вона стала прозорою. Введення тонкої голки в кровоносну судину, що підтверджується її рухливістю за незначних бокових рухів голки. Після зараження закриття отвору лейкопластиром.

2. Вертикальне розміщення ембріона, зрізання шкаралупи над повітряною камерою. Нанесення на підшкаралупну оболонку кілька крапель спирту, щоб вона стала прозорою. Вибір великої кровоносної судини і введення в неї тонкої голки, що підтверджується рухливістю судини за незначних бокових рухів голки. Після зараження закриття отвору лейкопластиром.

Індикація вірусів у курячих ембріонах. Заражені ембріони підписують простим олівцем, кладуть у термостат і щодня розглядають на овоскопі. Загиблі ембріони переносять у холодильник і витримують 16–18 год при 4 °С або 1–2 год при –10...–20 °С. Це значно полегшує їхній наступний розтин унаслідок ущільнення тканин і звуження кровоносних судин та дає можливість отримати чисті ембріональні рідини. Загибель ембріонів у перші 24 год після зараження зумовлена частіше всього бактеріальною чи мікозною контамінацією за нестерильної роботи або травмуванням зародка при зараженні. Така загибель вважається неспецифічною. Проте існують віруси, які можуть спричинити швидку загибель ембріонів (наприклад, високовірулентні пташині штами вірусу грипу А або ортоавулавірусу птахів 1). Якщо ембріони не гинуть, їх інкубують до моменту максимального накопичення збудника (кожний вірус має певний цикл репродукції), а потім умертвляють і розтинають (рис. 3.11).

Розтин курячих ембріонів проводять у стерильних умовах із метою аналізу патологоанатомічних змін і головне – відбору вірусовмісного матеріалу для ідентифікації виділеного збудника. Як вірусовмісний матеріал можуть бути використані алантоїсна й амніотична рідини, ХАО, жовтковий мішок, зародок (залежно від тропізму вірусу).

Алгоритм розтину курячих ембріонів

1. Протирання шкаралупи 2 %-м спиртовим розчином йоду і зрізання вище межі повітряної камери.

2. Проколювання підшкаралупної оболонки разом із ХАО (в безсудинній ділянці), притримування пінцетом структур ембріона і відбір пастерівською піпеткою до 10 мл алантоїсної рідини.

3. Введення піпетки в амніон під шию зародка і відбір до 1 мл амніотичної рідини.

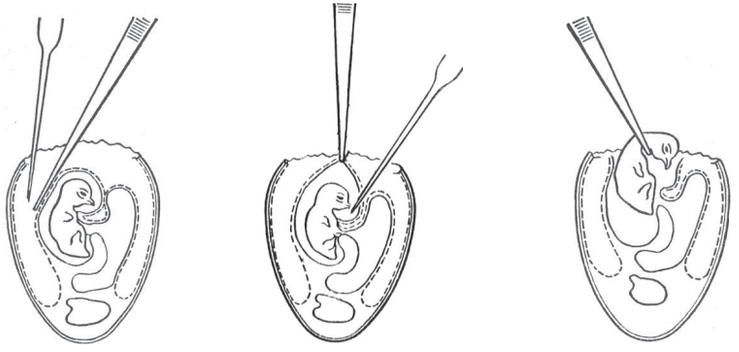


Рис. 3.11. Розтин курячого ембріона:
1 – відбір алантоїсної рідини; 2 – відбір амніотичної рідини; 3 – виймання зародка
(Ніколау Ш.С. та ін., 1965)

4. Піднімання пінцетом верхньої частини ХАО, зрізання ножицями і вміщення в чашку Петрі з 0,9 %-м розчином NaCl.

5. Виймання зародка, підтримуючи його за шию і відділяючи від пупкового канатика.

6. Внесення жовткового мішка і білка в чашку Петрі.

7. Виймання пінцетом частини ХАО, що залишилася на шкаралупі, і вміщення в чашку Петрі з 0,9 %-м розчином NaCl. Промивання ХАО до отримання прозорої рідини, розправляння двома пінцетами і розгляд на темному фоні.

8. Взяття жовткового мішка двома пінцетами, витискання його вмісту, перенесення в чашку Петрі з 0,9 %-м розчином NaCl і промивання.

Вірусовмісний матеріал, отриманий при розтині курячих ембріонів, перевіряють на стерильність (посіви на МПА, МПБ, МППБ, середовище Сабуро) і використовують для ідентифікації виділеного збудника. Зберігають матеріал при –20...–70 °С.

Ознаками репродукції вірусів у курячих ембріонах є загибель (у характерні для кожного виду вірусу строки), патологоанатомічні зміни і гемаглютинація з ембріональними рідинами (табл. 3.2). З *патологоанатомічних змін* типовими є помутніння і набряк ХАО, утворення на ХАО некротичних вузликів – віспин (рис. 3.12), вогнищ клітинної проліферації – бляшок (рис. 3.13), гіперемія, крововиливи й набряки на зародку, карликовість і муміфікація зародка (рис. 3.14), вогнища некрозу в паренхіматозних органах, зміна кольору печінки.

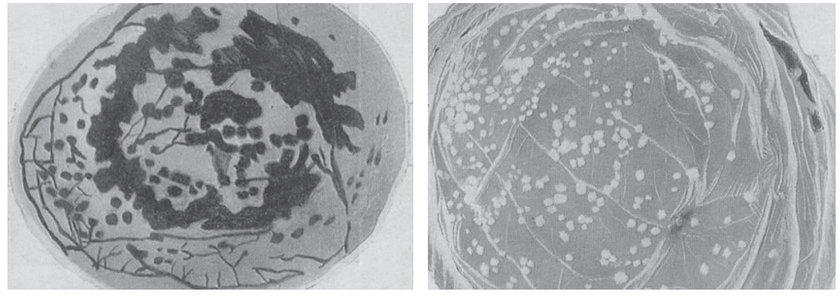
Таблиця 3.2

Культивування вірусів у курячих ембріонах

Віруси	Методи зараження	Ознаки репродукції вірусів
1	2	3
Вірус віспи корів	на ХАО, в алантоїсну порожнину	Загибель, геморагічні віспини на ХАО
Вірус віспи овець	на ХАО	Віспини на ХАО
Вірус віспи кіз	на ХАО	Віспини на ХАО
Вірус віспи кролів	на ХАО	Загибель, геморагічні віспини на ХАО, крововиливи на зародку
Вірус віспи курей	на ХАО	Загибель, віспини на ХАО
Везикуловіруси Індіана, Алагоас, Кокал і Нью-Джерсі (збудники везикулярного стоматиту)	на ХАО	Загибель, віспини на ХАО
Респіровірус ВРХ 3 (збудник парагрипу-3 ВРХ)	в алантоїсну порожнину, в амніон, на ХАО	РГА
Альфагерпесвірус свиней 1 (збудник хвороби Ауєскі)	на ХАО	Загибель, віспини на ХАО
Альфагерпесвіруси коней 1 і 4 (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	у жовтковий мішок, в алантоїсну порожнину, в амніон	Загибель, віспини на ХАО
Вірус грипу А штами вірусу коней	в алантоїсну порожнину, в амніон	РГА
Вірус грипу А штами вірусу свиней	в алантоїсну порожнину, в амніон	Крововиливи на зародку, РГА
Вірус грипу А штами вірусу птахів	в алантоїсну порожнину, в амніон	Загибель, крововиливи на зародку, РГА
Морбіллівірус собак (збудник чуми м'ясоїдних)	в алантоїсну порожнину, на ХАО, у жовтковий мішок	Загибель, помутніння ХАО
Вірус міксоми (збудник міксоматозу кролів)	на ХАО	Віспини на ХАО

Закінчення таблиці 3.2

1	2	3
Авіаденовірус курей А (збудник аденовірусної інфекції курей)	на ХАО, в кровоносні судини ХАО, в алантоїсну порожнину, в жовтковий мішок	Загибель, гіперемія, крововиливи, карликовість або кучерявість зародка; набряк, помутніння і некротичні вогнища на ХАО; некроз печінки, збільшення об'єму алантоїсної рідини, зменшення об'єму амніотичної рідини; РГА
Альфагерпесвірус птахів 1 (збудник інфекційного ларинготрахеїту птахів)	на ХАО	Загибель, некротично-вогнищеві та дрібновузликові ураження ХАО
Альфагерпесвіруси курячих 2 і 3 (збудники хвороби Марека)	на ХАО, в жовтковий мішок	Загибель, вогнища клітинної проліферації на ХАО (бляшки), збільшення печінки і селезінки
Ортоавулавірус птахів 1 (збудник ньюкаслської хвороби)	в алантоїсну порожнину, в амніон, на ХАО	Загибель, крововиливи на зародку, РГА
Коронавірус птахів (збудник інфекційного бронхіту курей)	в алантоїсну порожнину, в амніон, на ХАО	Загибель, карликовість і муміфікація зародка, набряк ХАО та амніотичної оболонки, збільшення об'єму алантоїсної рідини, зменшення об'єму амніотичної рідини, зморщування жовткового мішка, РГА
Авігепатовірус А (збудник вірусного гепатиту каченят)	на ХАО, в алантоїсну порожнину	Загибель, набряки, гіперемія та крововиливи на зародку, набряк ХАО й печінки, печінка жовто-сірого або жовто-зеленого кольору з вогнищами некрозу, ознаки жовтяниці (ембріональні рідини, вміст кишечнику і жовткового мішка зеленого кольору)
Вірус інфекційної бурсальної хвороби	на ХАО, в жовтковий мішок, в алантоїсну порожнину	Загибель, гіперемія, крововиливи, набряки і карликовість зародка, некротичні вогнища в печінці, селезінці й нирках
Вірус саркоми Рауса	на ХАО, в амніон, у кровоносні судини ХАО	Вогнища клітинної проліферації на ХАО (бляшки)



а) б)

Рис. 3.12. Віспини на ХАО курячих ембріонів, заражених вірусом віспи корів (а) і альфагерпесвірусом свиней 1 (б)

(Сюрін В.М. та ін., 1991)

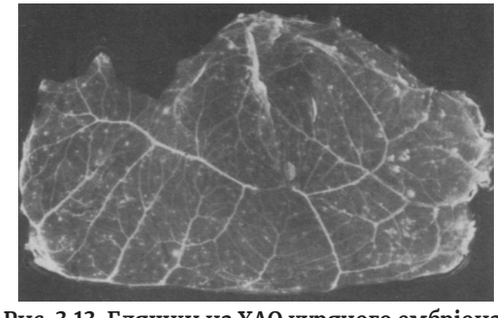


Рис. 3.13. Бляшки на ХАО курячого ембріона, зараженого альфагерпесвірусом птахів 2

(Сюрін В.М. та ін., 1998)

Рис. 3.14. Курячі ембріони 16-денного віку:

а – незаражений; б – заражений коронавірусом птахів

(Сюрін В.М. та ін., 1998)

Важливим методом індикації вірусів у курячих ембріонах є ***реакція гемаглютинації*** *(РГА)*, що ґрунтується на здатності вірусів склеювати

еритроцити певного виду. Ця властивість зумовлена наявністю у вірусів протеїну гемаглютиніну, за рахунок якого вони адсорбуються на поверхні еритроцитів. Один віріон приєднується одночасно до двох еритроцитів, і вони склеюються у вигляді пластівців, видимих неозброєним оком. РГА використовується для індикації в курячих ембріонах гемаглютинувальних вірусів (грипу А, ортоавулавірусу птахів 1, коронавірусу птахів, респіровірусу ВРХ 3, морбіллівірусу собак та ін.). Особливо цінна ця реакція за виявлення вірусів, які розмножуються в курячих ембріонах, але не зумовлюють жодних змін (наприклад, респіровірус ВРХ 3, слабовірулентні штами ортоавулавірусу птахів 1). Для постановки РГА на склі змішують краплю ембріональної рідини (алантоїсної або амніотичної) з краплею 5 %-ї суспензії еритроцитів певного виду. За наявності гемаглютинувального вірусу через 5–10 хв випадають пластівці склеєних еритроцитів.

3.3.3. Ізоляція вірусів у культурах клітин

Найдосконалішою моделлю для виділення вірусів із патологічного матеріалу є *культури клітин*. Вони знімають видові обмеження культивування вірусів, оскільки *in vitro* можна вирощувати будь-які клітини різних видів тварин. Немає єдиної клітинної культури, що була б придатною для ізоляції будь-якого вірусу. Тому в лабораторній діагностиці вірусних інфекцій тварин зазвичай застосовують кілька видів клітинних культур залежно від того, який вірус передбачається виділити.

У вірусологічній практиці найчастіше використовують **одношарові (моношарові) культури клітин**. Це клітини *in vitro*, отримані внаслідок диспергування тканин, які прикріплюються до субстрату і розмножуються, утворюючи моношар (на склі пробірок, флаконів, матраців, лунок мікропланшетів). Одношарові культури клітин поділяються на *первинні, субкультури, перещеплювані* та *диплоїдні.*

Первинні (первинно-трипсинізовані) культури клітин виготовляють з органів і тканин, що взяті безпосередньо з організму здорової тварини не пізніше 2–3 год після забою (наприклад, нирки, сім'яники, легені, шкіра тощо). Краще культивуються *in vitro* клітини ембріональних тканин, а також тварин раннього віку, оскільки вони мають вищу потенцію росту. Адаптація вірусів до первинних культур проходить успішніше, якщо вони отримані з органів природно сприйнятливих тварин.

Алгоритм виготовлення первинних культур клітин

1. Подрібнення тканини ножицями на шматочки розміром 2–5 мм, промивання кілька разів розчином Хенкса до одержання прозорої рідини.

2. Перенесення тканини в колбу з магнітиком, додавання протеолітичного ензиму (для дезагрегації тканини на окремі клітини), найчастіше – 0,25 %-го розчину трипсину в співвідношенні 1:10, поміщення на магнітну мішалку.

3. Трипсинізація:

а) *метод теплої трипсинізації* частіше використовують для диспергування ембріональних тканин. Трипсинізацію проводять при 37 °С дробно декілька разів по 5–30 хв (залежно від типу тканини). Першу порцію трипсину виливають. Трипсин із клітинами, що відділилися, зливають через 2–3 шари марлі в колбу, яку поміщають на лід або в холодильник для припинення дії ензиму. До тканини, що залишилася в колбі, додають свіжу порцію трипсину і знову трипсинізують. Трипсинізацію здійснюють 3–5 разів до повного виснаження тканини.

б) *метод холодної трипсинізації* використовують для диспергування тканин дорослих тварин; проводять у холодильнику при 4–6 °С 12–16 год.

4. Внесення суспензії клітин у центрифужні пробірки (флакони) і центрифугування при 1000 об/хв 10–15 хв. Видалення трипсину, внесення до осаду клітин невеликої кількості ростового середовища (199, Ігла або 0,5 %-й гідролізат лактоальбуміну з додаванням 5–10 % сироватки крові ВРХ).

5. Підрахунок кількості клітин у камері Горяєва* і розведення суспензії клітин ростовим середовищем до оптимальної посівної концентрації (200–500 тис. клітин у 1 мл).

6. Внесення суспензії клітин у пробірки (по 1 мл), лунки мікропланшетів (по 0,2 мл) або матраци (10–15 % від об'єму), щільне закриття гумовими пробками (для попередження залуження середовища) і поміщення в термостат при 37°С. На пробірках проведення поздовжньої лінії восковим олівцем або маркером по склу, вміщення в лотки з кутом нахилу 5 ° рискою догори.

7. Після формування моношару зміна ростового середовища на підтримувальне (без сироватки крові ВРХ) і використання культури клітин для зараження вірусом або для пересіву.

У своєму розвитку культура клітин проходить *три фази*. Перша фаза – *адаптації*, триває 2–24 год і характеризується *адгезією* клітин, тобто прикріпленням їх до скла. Друга фаза – *логарифмічного росту*, супроводжується

* *Підрахунок кількості клітин у камері Горяєва:* до 1 мл суспензії клітин додають 1 мл 0,1 %-го розчину кристалвіолету (на 0,1 н розчині лимонної кислоти), перемішують, заповнюють камеру Горяєва і підраховують у двох камерах нефарбовані клітини з чіткими контурами та ядрами. Кількість клітин у 1 мл суспензії (Х) визначають за формулою:

$$X = \frac{A \; x \; 2 \; x \; 1000}{0,9}$$, де

А – середня кількість клітин в одній камері; 2 – коефіцієнт розведення суспензії; 1000 – кількість мм³ у 1 мл; 0,9 – об'єм камери Горяєва в мм³.

діленням клітин, які поступово покривають поверхню скла. Третя фаза – *стаціонарна*, характеризується формуванням через 3–5 діб моношару внаслідок *контактної інгібіції* клітин, тобто припинення їхнього поділу за контакту (рис. 3.15, 3.16). Швидкість утворення моношару на склі залежить від виду тканини, віку тварини, якості живильного середовища, посівної концентрації клітин та інших факторів. Моношар зберігає життєздатність упродовж 1–3 тижнів (за умови періодичної зміни живильного середовища, яке закислюється продуктами метаболізму клітин). З часом клітини старіють, і настає їхня *неспецифічна дегенерація:* вони округлюються, відриваються від скла і гинуть.

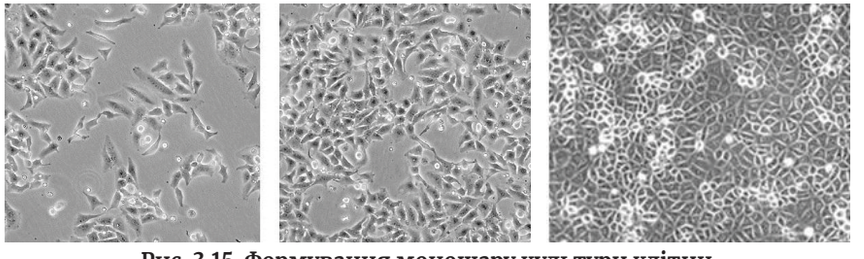
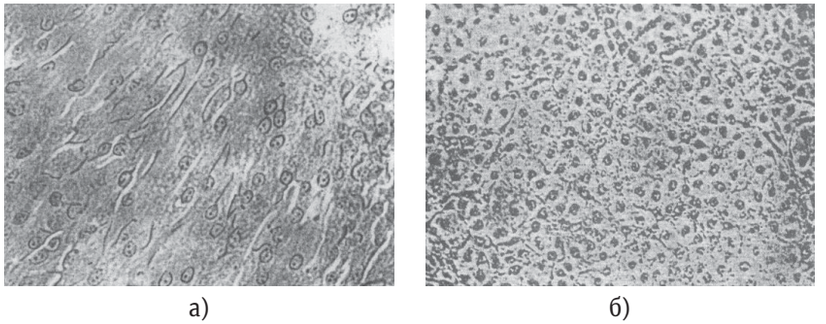


Рис. 3.15. Формування моношару культури клітин

(https://docplayer.ru/55714801-Soderzhanie-referat-5-oboznacheniya-i-sokrashcheniya-6-vvedenie-7-osnovnaya-chast-8.html)



а) б)

Рис. 3.16. Первинні культури клітин сім'яників теляти (а) і нирок свині (б)

(Ліхачов М.В. та ін., 1973; Сюрін В.М. та ін., 1984)

Первинні культури позбавлені багатьох клітин, які присутні у вихідній тканині, оскільки не всі клітини здатні прикріпитися до субстрату і вижити в умовах *in vitro*. Проте клітини первинних культур гетерогенні, і в них найповніше представлені типи клітин тієї тканини, звідки вони

отримані. Первинні культури високочутливі до вірусів, онкогенно безпечні. *Недоліком* їх є значна трудомісткість виготовлення, а також можливість контамінації латентними вірусами і мікоплазмами, що персистують в організмі тварин, тканини яких використовують для трипсинізації.

Субкультури клітин виготовляють із первинних, вирощених у матрацах, після формування моношару. Клітини знімають зі скла 0,25 %-м розчином трипсину або 0,02 %-м розчином версену (експозиція 15–30 хв при 37 °С до появи перших ознак відшарування клітин), ресуспендують у ростовому середовищі та пересівають у матраци, пробірки або мікропланшети. Через 3–5 діб формується моношар субкультури клітин. За чутливістю до вірусів субкультури клітин не відрізняються від первинних. Проте за субкультивування кількість клітин збільшується в 2–2,5 рази. Крім того, з'являється можливість виявити контамінацію клітин вірусами і мікоплазмами, а також отримати однорідніщу популяцію клітин. Субкультури клітин можна отримати за 2–5 пересівів, зрідка – до 8–10. Наступні пасажі призводять до зміни морфології клітин та їхньої загибелі. Якщо клітинні культури пройшли понад 10 пасажів, вони перебувають на стадії переходу до диплоїдних або перещеплюваних.

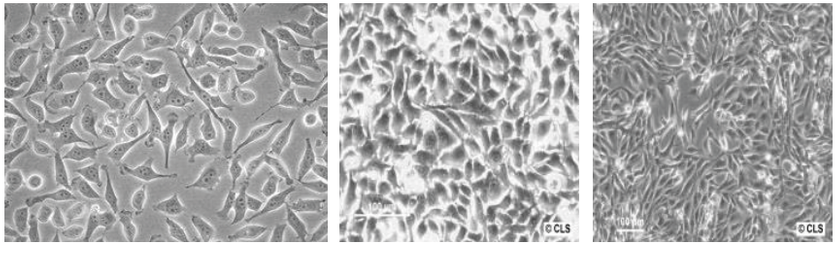
Перещеплювані культури клітин (син.: **стабільні**, або **постійні**, **клітинні лінії**) виготовляють із первинних шляхом тривалих пересівів (не менш як 70 разів із триденними інтервалами). Такі клітини, як правило, мають змінений каріотип порівняно з вихідною культурою (гетероплоїдний набір хромосом), необмежений строк життя, і багато з них виявляють онкогенні властивості.

Виникнення перещеплюваних клітинних ліній – нечасте явище. Їх вдається отримати з популяції клітин первинних культур, які мають підвищену активність росту і розмноження. Щодо причин появи перещеплюваних ліній клітин існують різні точки зору, зокрема вважають, що вони з'являються внаслідок мутацій або активізації клітинних онкогенів.

Перещеплювані культури клітин можна одержати як із нормальних, так і пухлинних тканин тварин і людини. Серед них широко застосовуються такі клітинні лінії, як ***HeLa*** (з карциноми шийки матки жінки), ***Hep-2*** (з карциноми гортані людини), ***KB*** (з карциноми ротової порожнини людини), ***L*** (з підшкірної сполучної тканини миші), ***BHK-21*** (з нирки сірійського хом'яка), ***Vero*** (з нирки африканської зеленої мавпи) та багато інших (рис. 3.17).

Перещеплювані культури клітин мають *переваги* порівняно з первинними. Їхнє застосування вирішує проблему сировини, виключає необ-

хідність постійного постачання свіжими тканинами. Перещеплювані культури складаються з відносно однорідних клітин (епітеліоїдних, фібробластоїдних), що забезпечує стандартні умови репродукції вірусів. Окрім того, за пересівів з'являється можливість виявити контамінацію культури вірусами і мікоплазмами. Проте перещеплювані культури мають серйозний *недолік:* схильність до малігнізації (злоякісного переродження).



а) б) в)

Рис. 3.17. Перещеплювані культури клітин HeLa (а), HEp-2 (б) і Vero (в)

(https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/mm/scc112?lang=en&region=UA, http://sputnic-group.ru/catalog/section_1396906/, http://sputnic-group.ru/catalog/section_1397194)

Диплоїдні культури клітин (син.: **диплоїдні клітинні лінії)** – це морфологічно однорідні популяції клітин, стабілізовані в процесі культивування *in vitro*, які мають обмежений строк життя, зберігають каріотип, властивий вихідній тканині, вільні від контамінантів і не виявляють онкогенної активності за трансплантації хом'ячкам.

Диплоїдні культури клітин виготовлені з різних тканин ембріона людини (легені (рис. 3.18), нирки, серце, шкірна і м'язова тканини) і тварин (нирки ембріонів корів, овець, свиней; нирки телят, ягнят, поросят та ін.). Процес *одержання диплоїдної культури клітин* проходить у три етапи: 1) виготовлення посівного пулу клітин і заморожування його основної частини; 2) контроль диплоїдності; 3) накопичення диплоїдних клітин безпосередньо для репродукції вірусів. Строк життя диплоїдної культури клітин обмежений – 40–60 пасажів. Далі поступово настає дегенерація клітин.

Диплоїдні культури мають *переваги* порівняно з первинними і перещеплюваними. Вони стерильні щодо вірусних контамінантів і мікоплазм, позбавлені онкогенної активності, здатні роками зберігатися в замороженому стані, забезпечують стандартні умови для репродукції вірусів. Тому диплоїдні культури клітин є оптимальною біологічною системою для культивування вірусів.

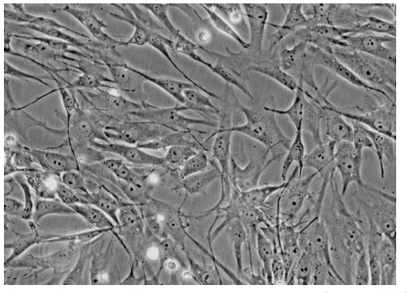


Рис. 3.18. Диплоїдна культури клітин Wi-38

(https://naked-science.ru/article/sci/liniya-kletok-wi-38-spasla-10)

Для виділення вірусів, які важко адаптуються до культур клітин, використовують **метод співкультивування**. Він полягає в одночасному культивуванні клітин трипсинізованої зараженої тканини і чутливих клітин моношарової культури (зокрема перещеплюваної). Цей метод застосовують при вивченні хронічних і повільних вірусних інфекцій.

За латентних інфекцій нечасто вдається виділити вірус традиційним шляхом зараження клітинних культур суспензією з патологічного матеріалу. У таких випадках застосовують **метод культивування уражених тканин**: із досліджуваного матеріалу готують первинні культури клітин, що призводить до демаскування латентного збудника.

Для виділення вірусів використовують також **органні культури**. Це підтримання *in vitro* фрагментів органів і тканин при збереженні їхньої структури та функції. Органні культури не здатні до розмноження. При вивченні респіраторних вірусних інфекцій широко застосовують метод органного культивування носового, трахеального і бронхіального епітелію. Для цього шматочки тканини розміром 1–3 мм вміщують на скарифіковане дно пластикової чашки Петрі, вносять живильне середовище (агар, зсіла плазма або синтетичне) в такій кількості, щоб фрагменти тканини знаходилися на його поверхні. Поживні речовини проникають в експлантат шляхом дифузії. Це створює умови для збереження органоспецифічної диференціації експлантата за відсутності або помірного розростання його тканин. При цьому зберігається не лише структура тканини, але й деякі функціональні особливості, наприклад, миготіння війок, яке припиняється внаслідок репродукції вірусів.

Розчини і живильні середовища для культури клітин. Робота з культурою клітин вимагає абсолютної стерильності, ретельної підготовки посуду, відповідних розчинів, живильних середовищ і високої якості води.

Для виготовлення живильних середовищ і за різних маніпуляцій із культурою клітин (відмивання тканини від кров'яних елементів, відмивання культури від ростового середовища, розведення вірусу) використовують *збалансовані сольові розчини Хенкса* та *Ерла.* Вони містять солі натрію, калію, магнію й кальцію, а також глюкозу, що забезпечує збереження pH, осмотичного тиску в клітинах і відповідну концентрацію необхідних неорганічних речовин.

Диспергувальний 0,25 %-й розчин трипсину застосовують для дезагрегації тканини на окремі клітини і для зняття клітин зі скла за пересівів. *Диспергувальний 0,02 %-й розчин версену* (натрієва сіль етилендиамінтетраоцтової кислоти) використовують для зняття клітин зі скла.

Для вирощування культури клітин широко застосовують *синтетичні середовища 199* та *Ігла*. До складу середовища 199 входять понад 60 компонентів: 20 амінокислот, 16 вітамінів, складові частини нуклеїнових кислот (пурини, піримідини), коферменти, відновники, джерела ліпідів і вуглеводів, 7 мінеральних солей, глюкоза. Середовище Ігла складається з 13 амінокислот, 8 вітамінів, 6 мінеральних солей, глюкози. Крім того, використовують *напівсинтетичні середовища*, які є ферментативними гідролізатами різних білкових речовин, найчастіше *0,5 %-й розчин гідролізату лактоальбуміну* (середовище ГЛА).

До всіх живильних середовищ (іноді – до розчинів Хенкса та Ерла) додають *індикатор феноловий червоний* (0,002 %) для контролю pH. За нейтрального значення pH колір середовища червоно-оранжевий. У міру підкислення продуктами метаболізму клітин pH середовища знижується, і воно поступово жовтіє, що слугує сигналом для його заміни. У разі зрушення pH у лужний бік середовище стає малинового кольору. Це, як правило, буває тоді, коли пробірки або матраци, де культивуються клітини, нещільно закриті гумовими пробками.

Для знищення бактеріальної мікрофлори до живильних середовищ і розчинів додають *антибіотики:* 100 ОД/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. За потреби використовують ністатин 50 ОД/мл для пригнічення росту плісняви.

За призначенням живильні середовища поділяються на дві групи: *ростові* та *підтримувальні*. Ростові середовища застосовують у перші дні культивування клітин; вони забезпечують життя і розмноження клітин. До складу ростових середовищ входить 5–10 % сироватки крові (частіше ВРХ), що містить фактори адгезії й росту, без яких клітини не зможуть прикріпитися до скла і ділитися. Підтримувальні середовища не містять

сироватки крові; вони забезпечують життєдіяльність клітин і використовуються після формування моношару та зараження культури клітин вірусом.

Консервування культур клітин. Клітинні культури часто необхідно законсервувати, щоб мати запас клітин із певною біологічною характеристикою. Це стосується насамперед диплоїдних і перещеплюваних клітинних ліній. На сьогоднішній день із тканин людини і тварин отримані тисячі клітинних ліній, які зберігаються в національних банках клітинних культур різних країн.

Найкращим методом консервування клітин є *заморожування в рідкому азоті* (–196 °С). Для цього клітини знімають зі скла матраців трипсином або версеном і суспендують у живильному середовищі в концентрації 10^6 клітин на 1 мл. Як захисні речовини до середовища додають 10–40 % сироватки крові ВРХ і 10 % диметилсульфоксиду або гліцерину. Суспензію розливають в ампули по 3 мл, запаюють і витримують 1–2 год при 4 °С для контакту з консервантом. Потім клітини заморожують у суміші етилового спирту із сухим льодом до –70 °С, поступово знижуючи температуру, і вміщують на зберігання в посудини Дюара з рідким азотом. При цьому клітини мають майже необмежений строк зберігання за повної відсутності ризику механічного пошкодження.

Життєздатність заморожених клітин відновлюють, вміщуючи ампулу з клітинами у водяну баню з температурою 37 °С за легкого струшування на 1–2 хв. Потім суспензію клітин виливають у матрац, додають відповідну кількість ростового середовища і культивують у термостаті при 37 °С. Через добу змінюють середовище для видалення консерванту.

Транспортують культури клітин у матрацах із моношаром, які доверху заливають живильним середовищем із 5 % сироватки крові ВРХ. Можна транспортувати суспензію клітин при 4 °С. За сприятливих умов, що виключають перегрівання або заморожування клітин, 80–90 % їх зберігає життєздатність упродовж 7–8 діб.

Індикація вірусів у культурі клітин

Алгоритм зараження культури клітин:

1. Видалення ростового середовища з пробірок, лунок мікропланшетів або матраців із сформованим моношаром клітин, промивання культури 1–2 рази розчином Хенкса.

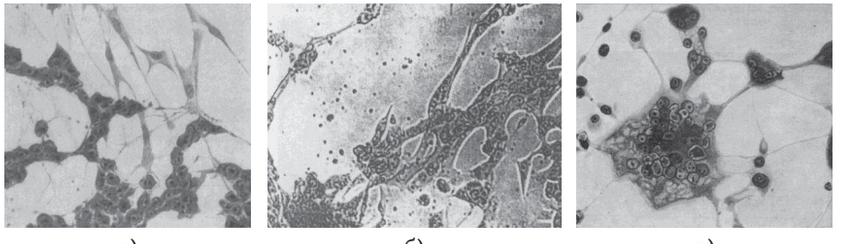
2. Внесення в пробірки і лунки мікропланшетів по 0,1–0,2 мл вірусовмісної суспензії (зараження кожною пробою по 4–10 пробірок або лунок мікропланшетів із культурою клітин), у матраци – 1–1,5 % від об'єму.

Експозиція 1–2 год за кімнатної температури або при 37 °С (для адсорбції вірусу на плазмолемі клітин).

3. Видалення вірусовмісної суспензії і внесення підтримувального середовища: в пробірки – по 1 мл, у лунки мікропланшетів – по 0,2 мл, у матраци – 10–15 % від об'єму. Експозиція в термостаті при 37 °С упродовж 1–2 тижнів і щоденний розгляд під малим збільшенням мікроскопа.

При виділенні вірусу з патологічного матеріалу деякі проби (наприклад, кал) можуть мати токсичну дію на клітини. Тому після адсорбції вірусу моношар клітин відмивають 1–2 рази розчином Хенкса (або живильним середовищем), а потім вносять підтримувальне середовище.

Основною ознакою розмноження вірусу в культурі клітин є ***цитопатогенна дія (ЦПД)***, або ***цитопатичний ефект (ЦПЕ)***. Це будь-які морфологічні зміни клітин, які виникають унаслідок репродукції вірусу (рис. 3.19). Розрізняють *три основні форми ЦПД:*



а) б) в)

Рис. 3.19. Цитопатогенна дія вірусів:
1 – округлення клітин; 2 – фрагментація клітин; 3 – утворення симпластів
(Сюрін В.М. та ін., 1991; Ліхачов М.В. та ін., 1973)

1) *округлення клітин* – під дією вірусу клітини, що в нормі розпластані на склі, втрачають зв'язки між собою, зморщуються, округлюються, відділяються від скла, переходять у культуральну рідину і гинуть;

2) *фрагментація клітин* – під дією вірусу клітини розпадаються на окремі фрагменти, відділяються від скла і переходять у культуральну рідину у вигляді клітинного детриту;

3) *утворення симпластів* (син.: *синцитії, полікаріоцити*) – під дією вірусу плазмолеми сусідніх клітин зливаються, і виникають гігантські багатоядерні клітини.

ЦПД проявляється через 3–14 діб (залежно від виду вірусу і типу культури клітин) та оцінюється в плюсах:

+ (25 %) – деструкція окремих клітин культури;

++ (50 %) – деструкція половини клітин культури;

+++ (75 %) – деструкція більшості клітин культури, утворення пустот у моношарі внаслідок відривання клітин від скла;

++++ (100 %) – деструкція всіх клітин культури, на склі залишаються невеликі вогнища змінених клітин.

Для отримання максимальної концентрації вірусу пробірки і матраци із зараженою культурою клітин виймають із термостату на кінцевих стадіях ЦПД (3–4 плюси).

Вірус, який розмножується в культурі клітин, накопичується поступово в культуральній рідині. Проте частина вірусу може залишатися в незруйнованих клітинах. Для звільнення клітинно-зв'язаного вірусу клітини дезінтегрують 2–3-разовим заморожуванням – відтаванням або ультразвуком.

ЦПД вірусів потрібно відрізняти від неспецифічної дегенерації клітин, що спостерігається за старіння культури. Тому для контролю залишають 4–6 пробірок (або лунок мікропланшетів) із незараженою культурою, в яких лише змінюють середовище. Крім того, слід пам'ятати про дегенерацію клітин, зумовлену токсичною дією досліджуваного матеріалу. Для виключення цього в разі потреби проводять додатковий пасаж: інфікованою культуральною рідиною заражають нові пробірки (лунки мікропланшетів) з культурою клітин. Якщо дегенерація була зумовлена токсичним фактором, то ЦПД у другому пасажі не проявляється.

Характерним для ЦПД багатьох вірусів є утворення *внутрішньоклітинних тілець-включень*. Для їхнього виявлення культуру клітин, вирощену на покривних скельцях у пробірках або пеніцилінових флаконах, заражають досліджуваною вірусовмісною суспензією, потім фіксують відповідним методом (фіксатори Буена, Карнуа, Ценкера або метиловий спирт) і фарбують гематоксилін-еозином. При цьому ядра клітин забарвлюються в синій колір, цитоплазма – в рожевий, а тільця-включення – в синій (базофільні) чи рожевий (ацидофільні, або еозинофільні) колір, що залежить від властивостей вірусу.

Деякі онкогенні віруси (зокрема вірус саркоми Рауса) можуть спричинити в культурі клітин ***цитопроліферативний (трансформувальний) ефект***. Він полягає в утворенні фокусів трансформації, що складаються зі скупчень кількох шарів округлих клітин, які під впливом вірусу втратили властивість контактної інгібіції та набули здатності до безперервного поділу (рис. 3.20).

Індикацію вірусів у культурі клітин можна провести за явищем ***гемадсорбції***. Це прикріплення еритроцитів до плазмолеми клітин, заражених гемаглютинувальним вірусом (наприклад, збудниками грипу ссавців

і птахів, парагрипу-3 ВРХ, ньюкаслської хвороби). Гемадсорбція виникає за рахунок вірусного протеїну гемаглютиніну, що модифікує клітинну плазмолему, і вона стає спорідненою з рецепторами еритроцитів. Кожний вірус здатний спричинити гемадсорбцію еритроцитів того виду, який він аглютинує, причому гемадсорбція проявляється швидше, ніж ЦПД.

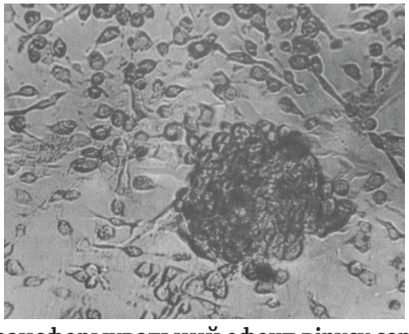


Рис. 3.20. Трансформувальний ефект вірусу саркоми Рауса в первинній культурі фібробластів курячого ембріона
(Тімаков В.Д., 1985)

Для постановки *реакції гемадсорбції (РГАд)* у 2–4 пробірки з інфікованою культурою клітин через 3–5 діб після зараження вносять по 0,2 мл 0,4–0,5 %-ї суспензії еритроцитів певного виду. Пробірки витримують у горизонтальному положенні 10–15 хв за кімнатної температури або 30–40 хв при 4 °С (залежно від виду вірусу), злегка струшують і розглядають під малим збільшенням мікроскопа. Для контролю такі самі маніпуляції проводять із незараженою культурою клітин. Реакція вважається позитивною, якщо в пробірках з інфікованою культурою еритроцити прикріпилися до поверхні клітин, а в контрольних – гемадсорбція відсутня. Гемадсорбція буває дифузною, вогнищевою або лише по периферії моношару у вигляді «намиста», що залежить від виду вірусу і культури клітин (рис. 3.21).

Бувають випадки, коли вірус не має гемаглютинувальних властивостей, проте проявляє гемадсорбцію. Це стосується, зокрема, вірусу африканської чуми свиней. Механізм гемадсорбції невідомий, припускається наявність у вірусу гемадсорбівного антигену.

Для індикації вірусів у культурі клітин можна застосовувати ***метод бляшок***. Це обмежені вогнища загиблих під дією вірусу клітин у суцільному моношарі культури. Для отримання бляшок культуру клітин, вирощену в матрацах, промивають розчином Хенкса і заражають вірусом

(у невисокій концентрації). Після контакту 1–2 год при 37 °С видаляють вірусовмісну рідину і вносять *спеціальне агарове покриття*, до складу якого входять такі компоненти: агар, розчин Ерла, сироватка крові ВРХ, натрію гідрокарбонат, антибіотики та індикатор нейтральний червоний. Усі компоненти змішують у певному співвідношенні* за температури 50–55 °С. При нашаруванні на культуру середовище охолоджують до 37 °С. Через 30–60 хв після застигання середовища матраци вміщують у термостат при 37 °С, загорнувши у світлонепроникний матеріал, бо індикатор має фотодинамічний вплив на клітини і в разі доступу світла може інгібувати утворення бляшок. Інкубацію проводять клітинами догори. Спостерігають за появою бляшок упродовж 4–12 діб.

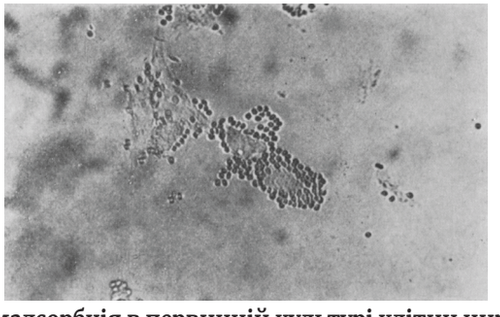


Рис. 3.21. Гемадсорбція в первинній культурі клітин нирок теляти, зараженій респіровірусом ВРХ 3
(Штарке Г. та ін., 1970)

За цей час адсорбований вірус проникає всередину клітин, проходить повний цикл репродукції. Віріони потомства можуть уражати лише сусідні клітини, оскільки культура вкрита агаровим середовищем, що обмежує поширення вірусу. Тому в суцільному моношарі живих клітин виникають вогнища зруйнованих клітин унаслідок репродукції вірусу. Над живими клітинами середовище підкислюється продуктами метаболізму і стає червоно-рожевого кольору. Над вогнищами загиблих клітин середовище безбарвне. Це і є бляшки (рис. 3.22). Кожна бляшка є результатом репродукції одного віріона, але за умови інфікування культури високими

* Склад агарового покриття за Уоллісом – Мельником: 1,5%-й розчин агару американської фірми «Діфко» (або освітлений очищений 2,5%-й розчин агару) на тричі дистильованій воді – 90 мл, розчин Ерла в 10-разовій концентрації – 18 мл, тричі дистильована вода – 59,4 мл, сироватка крові ВРХ – 4 мл, 7,5%-й розчин $NaHCO_3$ – 10,8 мл, пеніцилін (100 тис. ОД/мл) – 0,18 мл, стрептоміцин (100 тис. мкг/мл) – 0,18 мл, нейтральний червоний (1:1000) – 3 мл.

розведеннями вірусу, щоб виключити множинність зараження клітин. За високої концентрації вірусу бляшки зливаються.

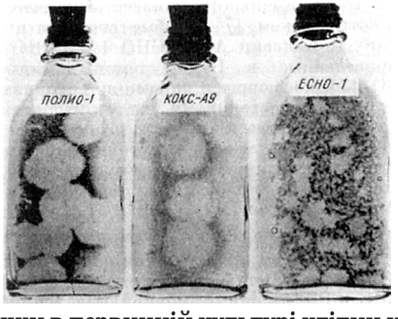


Рис. 3.22. Бляшки в первинній культурі клітин нирок мавпи, зараженій ентеровірусами С і В

(Ніколау Ш.С. та ін., 1965)

Час появи й морфологія бляшок залежать від виду і штаму вірусу, типу культури клітин та умов культивування. Деякі віруси утворюють бляшки без агарового покриття, що пов'язано з особливостями їхньої репродукції (наприклад, альфагерпесвіруси птахів 2 і 3).

Метод бляшок технічно складний для виконання, тому використовується в основному для титрування вірусів, а також із метою отримання генетично однорідних популяцій вірусів (клонів) при дослідженні їхніх генетичних властивостей.

Існують нецитопатогенні віруси, які розмножуються в культурі клітин без прояву ЦПД. Для їхньої індикації використовують методи, які ґрунтуються на явищах *інтерференції* та *екзальтації вірусів*.

Інтерференція – це здатність деяких вірусів пригнічувати репродукцію інших. На основі інтерференції можна виявити в культурі клітин нецитопатогенні віруси шляхом спільного культивування їх із цитопатогенними вірусами, репродукцію яких вони гальмують. Так, якщо культуру клітин заразити спочатку нецитопатогенним пестівірусом С (збудником класичної чуми свиней), а потім – вірусом ящуру, то ЦПД вірусу ящуру не проявляється внаслідок явища інтерференції. Або інший приклад: нецитопатогенні штами альфакоронавірусу 1 (збудника трансмісивного гастроентериту свиней) гальмують розвиток ЦПД пестівірусів А і В (збудників вірусної діареї ВРХ).

Феномен ***екзальтації*** полягає в прояві ЦПД у культурі клітин, зараженій двома вірусами: один із них нецитопатогенний, а другий – цитопатогенний,

але в цій культурі не розмножується. Наприклад, екзальтація ортоавулавірусу птахів 1 (збудника ньюкаслської хвороби) пестівірусом С у культурі клітин сім'яників поросят (клітини, заражені нецитопатогенним пестівірусом С, під дією ортоавулавірусу птахів 1 лізуються). Інший приклад: екзальтація ортоавулавірусу птахів 1 в культурі клітин сім'яників телят у присутності нецитопатогенних штамів пестівірусів А і В.

Орієнтовним методом виявлення вірусів у культурі клітин є ***кольорова (або метаболічна) проба***. Вона полягає в тому, що в незаражених культурах під впливом продуктів метаболізму клітин живильне середовище, яке містить індикатор феноловий червоний, підкислюється і стає жовтого кольору. У той час у заражених культурах клітини гинуть під дією вірусу, і середовище зберігає червоний колір. Найчіткіші результати одержують стосовно вірусів із високою швидкістю репродукції при культивуванні їх у культурах, що повільно ростуть. Вірогідність кольорової проби невисока, тому цей метод використовується у вірусологічній практиці нечасто.

Для індикації та ідентифікації вірусів у клітинах зараженої культури застосовують також ***ЕМ***, ***РІФ*** та ***ІЕА*** (методи описані в підрозділах 3.2.2, 3.5.8 і 3.5.9).

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Назвіть мету використання лабораторних тварин у вірусології та вимоги до них. **2.** Опишіть методи експериментального зараження лабораторних тварин і техніку розтину. **3.** Назвіть види вірусів, що культивуються в організмі лабораторних тварин, та ознаки їхньої репродукції. **4.** З якою метою використовують курячі ембріони у вірусології та які вимоги до них? **5.** Розкажіть про методи експериментального зараження курячих ембріонів і техніку розтину. **6.** Які види вірусів культивують у курячих ембріонах та ознаки їхньої репродукції? **7.** Охарактеризуйте культуру клітин як найдосконаліший об'єкт для культивування вірусів. **8.** Опишіть класифікацію тканинних культур і принцип їхнього виготовлення. **9.** Як проводять індикацію вірусів у культурі клітин?

ТЕМА 3.4. ТИТРУВАННЯ ВІРУСІВ

За виділення вірусів у чутливих біологічних системах виникає необхідність їхнього кількісного визначення в одиниці об'єму вірусовмісного матеріалу, що важливо для наступної серологічної ідентифікації збудників.

Віруси титрують за інфекційною та гемаглютинувальною активністю, відповідно визначають *інфекційний* і *гемаглютинувальний титри*.

3.4.1. Титрування вірусів за інфекційною активністю

Оскільки чутливість біологічних систем до вірусів (навіть високовірулентних штамів) коливається в широких межах, інфекційний титр у переважній більшості випадків можна визначити як статистичну величину. За одиницю інфекційного титру прийнята ***50 %-ва ефективна доза – $ЕД_{50}$***. Це така доза вірусу, яка спричинює інфекційний ефект у 50 % заражених біологічних систем. Залежно від виду тест-об'єкта і форми прояву інфекційної дії вірусу $ЕД_{50}$ називається по-різному в кожному конкретному випадку (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Значення $ЕД_{50}$

Тест-об'єкти	Інфекційна дія вірусу	Назви $ЕД_{50}$
Лабораторні тварини	Загибель	$ЛД_{50}$ – 50%-ва летальна доза
	Клінічні ознаки або патологоанатомічні зміни	$ІД_{50}$ – 50%-ва інфекційна доза
Курячі ембріони	Загибель	$ЕЛД_{50}$ – 50%-ва ембріональна летальна доза
	Патологоанатомічні зміни	$ЕІД_{50}$ – 50%-ва ембріональна інфекційна доза
Культура клітин	Цитопатичний ефект	$ТЦД_{50}$ – 50%-ва тканинна цитопатична доза

Алгоритм визначення $ЕД_{50}$

1. Приготування послідовних 10-разових розведень вірусу на 0,9 %-му розчині NaCl, розчині Хенкса або середовищі для культури клітин (залежно від виду тест-об'єкта). У кінцевих розведеннях інфекційна дія вірусу не повинна проявлятися.

2. Зараження кожним розведенням вірусу в однаковому об'ємі рівної кількості чутливих тест-об'єктів (не менше 4).

3. Спостереження за зараженими тест-об'єктами упродовж 5–12 діб, облік результатів інфекційної дії вірусу (загибель, клінічні ознаки, патологоанатомічні зміни чи ЦПД).

4. Розрахунок статистичним методом (найчастіше методом Ріда і Менча) розведення вірусу, яке спричинює 50 %-й інфекційний ефект.

5. Визначення кількості $ЕД_{50}$ в такому самому об'ємі нерозведеного вірусу і перерахунок кількості $ЕД_{50}$ на 1 мл вірусовмісної суспензії.

Розрахунок $ЕД_{50}$ за методом Ріда і Менча. *Приклад:* протитрувати вірус ектромелії на білих мишках, заражаючи їх внутрішньочеревно в об'ємі по 0,5 мл по 6 мишок на одне розведення вірусу; титр вірусу визначити в $ЛД_{50}$.

Метод Ріда і Менча ґрунтується на інтерполяції фактичних результатів титрування й отриманні кумулятивних даних. Це дає змогу штучно збільшити кількість тест-об'єктів і відповідно зменшити погрішність розрахунку $ЛД_{50}$. Виходять із логічного припущення, що мишка, яка вижила при зараженні високою дозою вірусу, тим більше виживе від меншої дози. І навпаки, тварина, що загинула від низької дози вірусу, тим більше загине від високої дози.

Виходячи з таких міркувань, підсумовують фактичні дані (табл. 3.4). Спочатку отримують кумулятивні дані щодо тварин, які вижили, додаючи їхню кількість від більших доз вірусу до менших (↓).

Таблиця 3.4

Титрування вірусів за методом Ріда і Менча

Розведення вірусу	Фактичні дані		Кумулятивні дані			
	Вижило ↓	Загинуло ↑	Вижило	Загинуло	Відношення загиблих до заражених	Відсоток летальності
10^{-1}	0	6	0	17	17 : 17	100
10^{-2}	1	5	1	11	11 : 12	91,7
10^{-3}	2	4	3	6	6 : 9	66,7
10^{-4}	4	2	7	2	2 : 9	22,2
10^{-5}	6	0	13	0	0 : 13	0
10^{-6}	6	0	19	0	0 : 19	0

Від розведення вірусу 10^{-1} жодна мишка не вижила, а від розведення 10^{-2} вижила одна. Ці цифри переписують у відповідну графу кумулятивних даних, оскільки нема що підсумовувати. Від розведення 10^{-3} фактично вижило 2 мишки плюс 1, що вижила від більшої дози вірусу (10^{-2}), разом буде 3. Від розведення 10^{-4} фактично вижило 4 мишки плюс 1 і 2, які вижили від більших доз (10^{-2} і 10^{-3}), разом буде 7. Від розведення 10^{-5} фактично вижило 6 мишок плюс 1, 2, і 4, які вижили від більших доз (10^{-2}, 10^{-3} і 10^{-4}), разом буде 13. А за розведення 10^{-6}, якщо скласти всі дані, отримаємо 19 мишок.

Так само одержують кумулятивні дані щодо тварин, які загинули, підсумовуючи їхню кількість від менших доз вірусу до більших (↑). Потім вираховують відсоток летальності для кожного розведення вірусу, користуючись отриманими кумулятивними даними.

Розведення вірусу, яке містить 1 $ЛД_{50}$, визначають за формулою:

$$\lg ЛД_{50} = \lg B - \frac{b-50}{b-a} \times \lg d,$$

де lg $ЛД_{50}$ – ступінь розведення вірусу, що містить 1 $ЛД_{50}$; B – розведення вірусу, яке дає ефект більший ніж 50 % (10^{-3}); в – відсоток, що відповідає розведенню B (66,7); a – відсоток, що відповідає розведенню, яке дає ефект менший ніж 50 % (22,2); d – коефіцієнт розведення вірусу (10).

$$\lg ЛД_{50} = \lg 10^{-3} - \frac{66,7-50}{66,7-22,2} \times \lg 10 = -3 - \frac{16,7}{44,5} \times 1 = -3 - 0,37 = -3,37.$$

Отже, 0,5 мл вірусу, розведеного в $10^{-3,37}$ разів, містить 1 $ЛД_{50}$. Тоді в 0,5 мл нерозведеної вірусовмісної суспензії міститься $10^{3,37}$ $ЛД_{50}$. Значить, титр вірусу становить:

$$T = 10^{3,37} \cdot ЛД_{50}/0,5 \text{ мл, або } 2 \times 10^{3,37} \ ЛД_{50}/\text{мл},$$

або, якщо перевести в абсолютне число, 4688 $ЛД_{50}$/мл.

Розведення вірусу, яке містить 1 $ЛД_{50}$, можна знайти іншим способом:

$$X = \frac{b-50}{b-a} \times \lg d = \frac{66,7-50}{66,7-22,2} \times 1 = \frac{16,7}{44,5} = 0,37.$$

Різниця між відсотками вище 50 % і 50 % становить 16,7, а різниця між відсотками вище 50 % і нижче 50 % – 44,5. Відношення 16,7 : 44,5 показує, на яку величину відрізняється розведення вірусу 10^{-3} від того, що ми шукаємо, якщо його помножити на логарифм коефіцієнта розведення (lg10 = 1): $10^{-3-0,37} = 10^{-3,37}$. Далі визначають титр вірусу, як зазначено вище.

Визначення інфекційного титру вірусів у БУО і ВУО. Інфекційну активність вірусів можна оцінити за одиничним ефектом – появі в тест-об'єктів локальних уражень, а саме: утворення бляшок у культурі клітин і віспин на ХАО курячого ембріона. Відповідно інфекційний титр вірусів визначають у ***бляшкоутворювальних одиницях*** *(БУО)* і ***віспоутворювальних одиницях*** *(ВУО)*. ***1 БУО*** – це доза вірусу, яка спричинює утворення однієї бляшки в культурі клітин. ***1 ВУО*** – це доза вірусу, яка спричинює утворення однієї віспини на ХАО курячого ембріона.

Для визначення інфекційного титру вірусу в БУО або ВУО певним розведенням вірусовмісного матеріалу в однаковому об'ємі заражають кілька матраців із культурою клітин або курячих ембріонів на ХАО.

Через відповідний час підраховують кількість бляшок або віспин. Титр вірусу визначають за формулою:

$$T = \frac{n}{V \times a},$$

де n – середнє арифметичне кількості бляшок на один матрац або віспин на один курячий ембріон; V – об'єм вірусу; a – розведення вірусу.

Приклад. Визначити титр вірусу віспи курей у суспензії зі шматочків ураженої шкіри. Вірусовмісним матеріалом у розведенні 1 : 10 заразили 4 курячі ембріони на ХАО в об'ємі по 0,2 мл. Через 6 діб інкубації зробили розтин курячих ембріонів і підрахували кількість віспин. Їх виявилося 9, 7, 10 і 14.

$$n = \frac{9+7+10+14}{4} = \frac{40}{4} = 10$$

$$V = 0,2 \text{ мл}$$

$$a = 1:10 = 0,1$$

$$T = \frac{10}{0,2 \times 0,1} = \frac{10}{0,02} = 500 \text{ ВУО / мл}$$

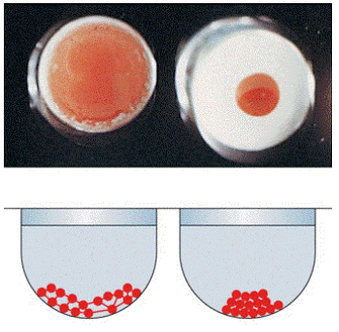
Визначення інфекційної активності вірусу за бляшкоутворенням є вірогідним методом, на один-два порядки чутливішим від титрування за цитопатичним ефектом. Проте він зустрічає технічні труднощі, пов'язані з отриманням бляшок. Стосовно віспин, то використання їх для титрування вірусів обмежується досить нечисленною групою вірусів, здатних утворювати некротичні вогнища на ХАО курячого ембріона.

3.4.2. Титрування вірусів за гемаглютинувальною активністю

Гемаглютинація – це здатність вірусів склеювати еритроцити за рахунок протеїну *гемаглютиніну*, який знаходиться в капсидній або суперкапсидній оболонці віріонів (залежно від складності їхньої організації). Механізм гемаглютинації полягає в адсорбції віріонів на поверхні еритроцитів та утворенні «містків» між ними, внаслідок чого еритроцити склеюються й осідають на дно пробірки або лунки планшета у вигляді *«парасольки»*. Неаглютиновані еритроцити осідають у вигляді *«ґудзика»* (рис. 3.23). Процес гемаглютинації є оборотним. Віруси, що адсорбувалися на еритроцитах, можуть звільнитися з їхньої поверхні під дією вірусного ензиму *нейрамінідази*.

Кожний гемаглютинувальний вірус здатний склеювати еритроцити тварин певних видів, за відповідної температури й pH середовища

(табл. 3.5). ***Реакція гемаглютинації*** *(РГА)* дає змогу швидко виявити гемаглютинувальні віруси в патологічному матеріалі від хворих тварин і заражених лабораторних тварин, в алантоїсній та амніотичній рідинах курячих ембріонів і в культуральній рідині.



1 2

Рис. 3.23. Результат РГА:
1 – осад еритроцитів у вигляді «парасольки»;
2 – осад еритроцитів у вигляді «ґудзика»
(Cummings B., 2007)

У РГА визначають гемаглютинувальний титр вірусу, який вимірюється в *гемаглютинувальних одиницях (ГАО).*

Алгоритм РГА

1. Приготування дворазових розведень вірусу на 0,9 %-му розчині NaCl в однаковому об'ємі (0,5 мл, 0,2 мл, 0,1 мл, найчастіше – 0,05 мл, 0,025 мл або 0,02 мл).

2. Додавання до кожного розведення вірусу рівного об'єму 1 %-ї суспензії еритроцитів певного виду.

3. Остання лунка – без вірусу, для контролю еритроцитів на спонтанну гемаглютинацію.

4. Струшування планшетів, експозиція певний час за відповідної температури (4 °С, 18–22 °С або 37 °С) залежно від виду вірусу, найчастіше 60 хв за кімнатної температури.

5. Облік результатів реакції в плюсах після повного осідання еритроцитів у контрольній лунці (рис. 3.24):

++++ – всі еритроцити аглютиновані й утворюють суцільний шар у вигляді «парасольки» з опалими краями;

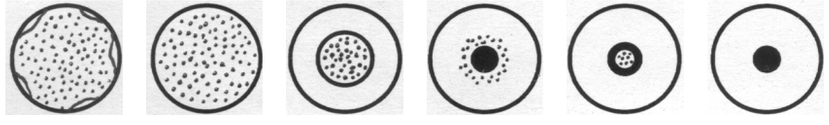
+++ – всі еритроцити аглютиновані й утворюють «парасольку» з рівними краями;

++ – більшість еритроцитів аглютинована й утворює «парасольку», по краях якої відмічається тонке кільце з неаглютинованих еритроцитів;

+ – більшість еритроцитів не аглютинована й утворює осад у вигляді «ґудзика», по краях якого є незначна «парасолька» (або по краях «парасольки» розміщується широке кільце з неаглютинованих еритроцитів);

– – всі еритроцити не аглютиновані й осіли у вигляді «ґудзика» з рівними краями.

6. ***1 ГАО*** – найбільше розведення вірусу, яке спричинює чітко виражену гемаглютинацію (не менше ніж на 2 плюси). Кількість ГАО в нерозведеній вірусовмісній суспензії виражає титр вірусу.



++++ +++ ++ + + –

Рис. 3.24. Оцінка результатів РГА

Показником гемаглютинувального титру вірусу є число, обернено пропорціональне його розведенню. Наприклад, якщо 1 ГАО міститься в розведенні вірусу 1 : 128, то його титр становить 128 ГАО. При позначенні гемаглютинувального титру об'єм вірусовмісного матеріалу можна не вказувати, оскільки об'єм титрування не має істотного впливу на результати РГА (завжди змішують рівні об'єми вірусу та 1 %-ї суспензії еритроцитів).

Таблиця 3.5

Гемаглютинувальні властивості вірусів тварин

Віруси	Еритроцити	Температура, °С	pH
1	2	3	4
Ліссавірус сказу (збудник сказу)	Гуски, курки, мавпи, мурчака, пацюка, вівці, людини (0 група крові)	0–4	6,2–6,4
Везикуловіруси Індіана, Алагоас, Кокал і Нью-Джерсі, (збудники везикулярного стоматиту)	Гуски	4	5,8

Продовження таблиці 3.5

1	2	3	4
Вірус віспи корів	Курки	37	7,2
Вірус віспи курей	Курки	37	7,2–7,4
Вірус орф (збудник контагіозної ектими овець і кіз)	Людини (0 група крові)	37	7,2
Вірус лейкозу ВРХ	Миші	4	6,0
Респіровірус ВРХ 3 (збудник парагрипу-3 ВРХ)	Мурчака, кроля, миші, корови, вівці, кози, свині, буйвола, мавпи, голуба, гуски, індика	4,18–22,37	5,7–7,2
Альфагерпесвірус ВРХ 1 (збудник інфекційного ринотрахеїту ВРХ)	Миші, пацюка, хом'яка, мурчака, людини (0 група крові)*	4	7,2
Мастаденовіруси ВРХ A, B і C, атаденовірус ВРХ D (збудники аденовірусної інфекції ВРХ)	Миші, пацюка	4	7,2–7,4
Ротавіруси A, B і C (збудники ротавірусної інфекції ВРХ)	Мурчака, людини (0 група крові)	37	7,2–7,4
Бетакоронавірус 1 (збудник коронавірусної інфекції ВРХ)	Миші, пацюка, хом'яка	18–22	7,2
Альфакоронавірус 1 (збудник трансмісивного гастроентериту свиней)	Курки, мурчака, корови	4	7,2
Вірус інфекційної анемії коней	Мурчака	4,18–22,37	5,5–7,5
Морбіллівірус собак (збудник чуми м'ясоїдних)	Курки, мурчака	18–22	7,0
Мастаденовірус собак A (збудник інфекційного гепатиту собак)	Пацюка, мурчака, людини (0 група крові)	18–22	6,5–7,5
Авіаденовірус курей A (збудник аденовірусної інфекції курей)	Пацюка	37	7,2
Вірус грипу A штами вірусу свиней	Курки, качки, галки, тхора, мурчака, пацюка, собаки, їжака, людини (0 група крові)	18–22	7,2

Закінчення таблиці 3.5

1	2	3	4
Вірус грипу A штами вірусу коней	Курки, качки, гуски, голуба, мурчака, пацюка, миші, хом'яка, кроля, кішки, собаки, корови, вівці, свині, коня, людини (0 група крові)	18–22	7,2
Вірус геморагічної хвороби кролів	Вівці, курки, людини (0 група крові)	18–22 °C	7,2
Вірус грипу A штами вірусу птахів	Курки, мурчака, кроля, коня, вівці, людини (0 група крові)	18–22	7,2
Ортовулавірус птахів 1 (збудник ньюкаслської хвороби)	Курки, голуба, індика, мурчака, миші, корови, вівці, кози, свині, коня, людини (0 група крові)	18–22	7,2
Коронавірус птахів (збудник інфекційного бронхіту курей)	Курки**	18–22,37	7,2

Примітка: *після концентрації ПЕГ-6000 або ультрацентрифугуванням; **після обробки трипсином або фосфоліпазою С.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Що таке титр вірусу та яке його практичне значення? **2.** Назвіть одиниці виміру інфекційного титру вірусу. **2.** Розкажіть про титрування вірусів за методом Ріда і Менча. **3.** Як визначають інфекційний титр вірусу в БУО і ВУО? **4.** Що таке гемаглютинація? Охарактеризуйте гемаглютинувальні властивості вірусів. **5.** Розкажіть методику постановки РГА і визначення титр вірусу в ГАО.

ТЕМА 3.5. СЕРОЛОГІЧНІ МЕТОДИ ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСІВ ТА АНТИТІЛ

3.5.1. Загальні принципи серологічних реакцій

В основі *серологічних реакцій* лежить специфічна взаємодія антигенів (вірусних протеїнів) та антитіл. Серологічні реакції мають дуже важливе

значення в лабораторній діагностиці вірусних інфекцій тварин. Їх широко використовують у повсякденній діагностичній практиці, а саме: 1) для *експрес-діагностики* – швидкого виявлення вірусних антигенів безпосередньо в патологічному матеріалі від хворих і загиблих тварин; 2) для *ідентифікації вірусу*, виділеного в чутливих біологічних системах (лабораторних тваринах, курячих ембріонах або культурах клітин); 3) для *серологічної (ретроспективної) діагностики* – встановлення зростання титру антитіл у парних сироватках крові тварин-реконвалесцентів.

У вірусологічній практиці найчастіше застосовують такі серологічні реакції, як реакція нейтралізації (РН), реакція затримки гемаглютинації (РЗГА), реакція непрямої гемаглютинації (РНГА), реакція затримки гемадсорбції (РЗГАд), реакція зв'язування комплементу (РЗК), реакція дифузійної преципітації (РДП), реакція імунофлуоресценції (РІФ), імуноензимний аналіз (ІЕА), імунохроматографічний аналіз (ІХА) Вибір серологічної реакції для ідентифікації вірусу або антитіл визначається в основному властивостями самого збудника, а також можливостями лабораторії та кваліфікацією персоналу. У кожної серологічної реакції є свої переваги і недоліки.

З метою швидкого виявлення вірусних антигенів у патологічному матеріалі найчастіше використовують РІФ та ІЕА. Для серологічної ідентифікації ізольованих у лабораторних об'єктах вірусів застосовують РЗГА, коли збудник виявив гемаглютинувальні властивості. Якщо вірус виділяли в культурі клітин і він виявив гемадсорбівні властивості, тоді ідентифікують його у РЗГАд. За відсутності гемаглютинувальних і гемадсорбівних властивостей ідентифікацію вірусу проводять за допомогою РН у тій біологічний системі, в якій він був виділений. Якщо вірус нецитопатогенний, тоді надійним методом ідентифікації його в культурі клітин є РІФ.

За ретроспективної діагностики треба мати на увазі, що в сироватках крові тварин-реконвалесцентів, окрім антитіл, завжди містяться *вірусні інгібітори* (термолабільні й термостабільні). Вони можуть імітувати позитивний результат серологічних реакцій і призвести до діагностичної помилки, у зв'язку з чим їх потрібно інактивувати. Від *термолабільних інгібіторів* сироватки крові звільняють прогріванням при 56–60 °С упродовж 30 хв. Для видалення *термостабільних інгібіторів* застосовують різні методи обробки сироваток (каоліном, бентонітом, активованим вугіллям тощо) залежно від виду тварини, від якої отримана сироватка, і вірусу, що використовується як антиген у серологічній реакції.

У разі дослідження сироваток крові в таких серологічних реакціях, як РЗГА і РНГА, треба враховувати наявність сироваткових неспецифічних аглютинінів проти еритроцитів тварин. Для видалення цих аглютинінів досліджувані сироватки обробляють еритроцитами тварин того виду, які будуть використані в реакції.

За проведення РЗК треба враховувати *антикомплементарну активність* сироваток, тобто здатність зв'язувати комплемент і таким чином перешкоджати гемолізу еритроцитів. Для позбавлення сироваток антикомплементарних властивостей їх обробляють комплементом мурчака, ембріональною сироваткою, вуглекислим газом та ін.

Для постановки серологічних реакцій біологічна промисловість випускає *набори діагностикумів*, які складаються з антигенів і сироваток (специфічних, нормальних) та розраховані на проведення комплексних досліджень: експрес-діагностики, ідентифікації ізольованих у лабораторних об'єктах вірусів і ретроспективної діагностики. *Специфічні антигени* отримують з ембріональних рідин (алантоїсної, амніотичної) заражених курячих ембріонів або з культуральних вірусовмісних рідин, а *нормальні антигени* – від незаражених біологічних об'єктів або із суспензій тканин здорових тварин. *Специфічні сироватки* отримують шляхом імунізації тварин-донорів, а *нормальні сироватки* беруть від здорових тварин. Технологія виготовлення та контроль діагностикумів (на стерильність, активність і специфічність) здійснюється на біофабриках згідно з діючими інструкціями. На кожний діагностикум затверджена настанова щодо його практичного використання в умовах лабораторії. Деякі діагностичні набори готують експериментальними серіями в науково-дослідних закладах. Нині лабораторії використовують діагностичні набори для діагностики багатьох вірусних інфекцій тварин, зокрема сказу, ящуру, лейкозу ВРХ, парагрипу-3 ВРХ, інфекційного ринотрахеїту ВРХ, хвороби Тешена, інфекційної анемії коней, грипу коней, грипу птахів, ньюкаслської хвороби, інфекційного бронхіту птиці, лейкозу птиці.

3.5.2. Реакція нейтралізації

Суть РН: антитіла блокують інфекційну активність вірусу за рахунок взаємодії з прикріплювальними протеїнами віріонів (відповідальними за адсорбцію на плазмолемі клітини), унаслідок чого вірус утрачає здатність репродукуватися в чутливих біологічних системах (рис. 3.25).

РН ставлять на лабораторних тваринах (найчастіше новонароджених білих мишенятах), курячих ембріонах або в культурах клітин та оцінюють

результати за *відсутністю інфекційного ефекту*, а саме: 1) у лабораторних тварин – відсутність захворювання і загибелі; 2) у курячих ембріонах – відсутність загибелі та патологоанатомічних змін; 3) у культурах клітин – відсутність ЦПД, бляшок і гемадсорбції.

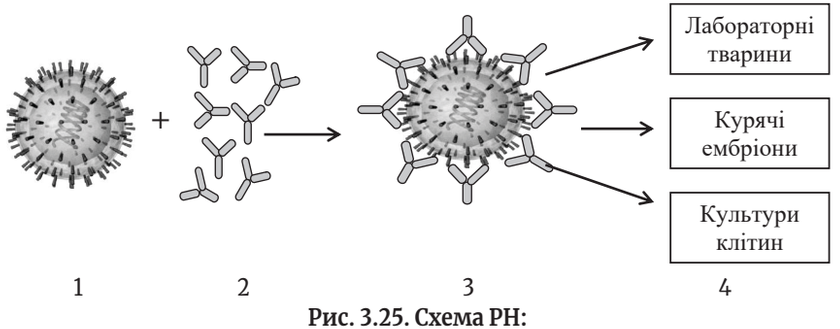


Рис. 3.25. Схема РН:
1 – вірус; 2 – антитіла; 3 – блокування антитілами вірусних прикріплювальних протеїнів; 4 – зараження тест-об'єктів

Ідентифікація вірусу в РН

*Компоненти реакції:*1) досліджуваний вірус; 2) специфічна і нормальна сироватки; 3) тест-об'єкти (білі мишенята або мікропланшети з культурою клітин); 4) 0,9 %-й розчин NaCl, розчин Хенкса або середовище для культури клітин.

Алгоритм РН

1. Визначення робочої дози вірусу:

Титрування досліджуваного вірусу за методом Ріда і Менча, визначення 1 $ЕД_{50}$ (див. стор. 202). Приготування робочої дози вірусу для основного досліду з розрахунку 100 або 1000 $ЕД_{50}$ на один тест-об'єкт.

2. Основний дослід РН:

а) приготування дворазових розведень специфічної та нормальної сироваток від 1:4 до 1:128 в об'ємі 0,5 мл (кількість розведень специфічної сироватки має перевищувати її титр на одне розведення);

б) додавання до кожного розведення специфічної та нормальної сироваток по 0,5 мл досліджуваного вірусу в робочій дозі 100 або 1000 $ЕД_{50}$ на один тест-об'єкт;

в) струшування сумішей вірусу із сироватками та експозиція 1–2 год за кімнатної температури або 37 °С чи 16–18 год при 4 °С залежно від виду вірусу.

г) зараження кожною сумішшю вірусу із сироватками по 4 тест-об'єкти в однаковому об'ємі (мишенята – по 0,01 мл і/ц і 0,1–0,2 мл в/ч або п/ш; курячі ембріони – по 0,2 мл; пробірки з культурою клітин – по 0,2 мл суміші та 0,8 мл середовища; лунки мікропланшетів із культурою клітин – по 0,1 мл суміші та 0,1 мл середовища);

д) спостереження за зараженими тест-об'єктами 5–12 діб, облік результатів реакції;

е) вірус вважається ідентифікованим, якщо специфічна сироватка до титру антитіл нейтралізує інфекційну активність досліджуваного вірусу в робочій дозі 100 або 1000 $ЕД_{50}$ на один тест-об'єкт за умови прояву інфекційного ефекту в присутності нормальної сироватки;

є) *контролі реакції*:

– контроль вірусу на інфекційну активність (зараження 4 тест-об'єктів робочою дозою вірусу 100 або 1000 $ЕД_{50}$ у розведенні 1: 2);

– контроль робочої дози вірусу 100 або 1000 $ЕД_{50}$ (приготування 10-разових розведень робочої дози вірусу включно до 0,1 $ЕД_{50}$ і зараження кожним розведенням по 4 тест-об'єкти);

– контроль специфічної і нормальної сироваток на токсичність (інокуляція 4 тест-об'єктам сироватки в розведенні 1: 8);

– контроль тест-об'єктів (4 тест-об'єкти – не заражені, в культурі клітин – зміна живильного середовища).

Вищенаведену методику постановки РН можна застосовувати і для ***виявлення антитіл***. Для цього до дворазових розведень досліджуваної сироватки додають вірус у робочій дозі 100 або 1000 $ЕД_{50}$ на один тест-об'єкт і після контакту заражають чутливі тест-об'єкти. Розраховують за методом Ріда і Менча розведення сироватки, яке захищає 50 % тест-об'єктів від інфекційної дії вірусу в робочій дозі 100 або 1000 $ЕД_{50}$. Це розведення сироватки є показником *титру вірусонейтралізувальних антитіл.*

Перевага РН в її універсальності: РН можна ставити з усіма вірусами і на всіх біологічних об'єктах, що використовуються для виділення збудників. Проте ця реакція дуже трудомістка, вимагає багато часу, зусиль і матеріальних затрат.

3.5.3. Реакція затримки гемаглютинації

Суть РЗГА: антитіла гальмують гемаглютинувальну активність вірусу за рахунок блокування гемаглютиніну на поверхні віріона (рис. 3.26).

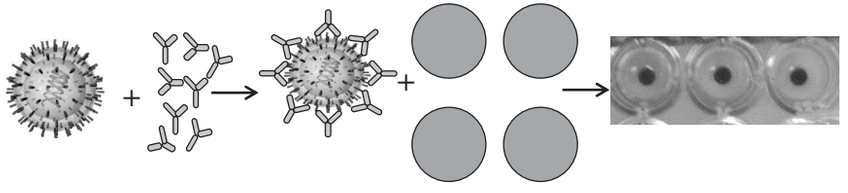


Рис. 3.26. Схема РЗГА:

1 – вірус; 2 – антитіла; 3 – блокування антитілами вірусного гемаглютиніну; 4 – еритроцити; 5 – затримка гемаглютинації

РЗГА використовується для діагностики грипу ссавців і птахів, парагрипу-3 ВРХ, чуми м'ясоїдних, ньюкаслської хвороби та ін.

Ідентифікація вірусу в РЗГА

*Компоненти реакції:*1) досліджуваний вірус; 2) специфічна і нормальна сироватки; 3) 1%-ва суспензія еритроцитів; 5) 0,9%-й розчин NaCl.

Алгоритм РЗГА

1. Визначення робочої дози вірусу

Титрування досліджуваного вірусу в РГА в об'ємі 0,02 мл, визначення 1 ГАО (див. стор. 207). Приготування робочої дози вірусу для основного досліду 4 ГАО. Наприклад, якщо 1 ГАО встановлена при розведенні вірусу 1:64, тоді для приготування робочої дози 4 ГАО вірус розводять 1:16, тобто до 1 мл вірусу додають 15 мл 0,9%-го розчину NaCl.

2. Контроль робочої дози вірусу 4 ГАО

Титрування робочої дози досліджуваного вірусу 4 ГАО в РГА в об'ємі 0,02 мл (2 ГАО, 1 ГАО, 0,5 ГАО, 0,25 ГАО). У перших двох лунках має бути чітка гемаглютинація (на 3 і 2 плюси), а в інших – відсутня.

У разі отримання інших результатів концентрацію вірусу в робочій дозі виправляють додаванням 0,9%-го розчину NaCl (якщо гемаглютинація спостерігається більше ніж у двох лунках) або вірусу (якщо гемаглютинація відмічається менше ніж у двох лунках) і наново ставлять контроль 4 ГАО.

3. Основний дослід РЗГА:

а) приготування дворазових розведень специфічної та нормальної сироваток на 0,9%-му розчині NaCl від 1: 10 до 1: 1280 в об'ємі 0,02 мл;

б) внесення у всі лунки по 0,02 мл робочої дози досліджуваного вірусу 4 ГАО.

в) струшування планшетів, експозиція від 30 хв до 18 год за відповідної температури (4 °С, 18–22 °С або 37 °С) залежно від виду вірусу, найчастіше – 30–60 хв за кімнатної температури;

г) внесення у всі лунки по 0,02 мл 1%-ї суспензії еритроцитів*;

д) струшування планшетів, експозиція 60–90 хв за кімнатної температури, облік результатів реакції;

е) вірус вважається ідентифікованим, якщо специфічна сироватка гальмує гемаглютинувальну активність досліджуваного збудника до її титру за умови повної гемаглютинації в присутності нормальної сироватки;

є) *контролі реакції*:

– контроль специфічної та нормальної сироваток (0,02 мл сироватки в розведенні 1: 10 + 0,02 мл 1%-ї суспензії еритроцитів);

– контроль еритроцитів (0,02 мл 1%-ї суспензії еритроцитів + 0,04 мл 0,9%-го розчину NaCl).

Цю методику використовують і для ***виявлення антитіл***. Для цього до дворазових розведень досліджуваної сироватки додають вірус у робочій дозі 4 ГАО і після контакту – 1%-ву суспензію еритроцитів. За *титр антитіл* приймають найвище розведення сироватки, яке зумовлює повну затримку гемаглютинації.

Позитивним у РЗГА є простота і доступність методики, висока чутливість, швидкість отримання результатів. Недолік реакції – вплив на результат неспецифічних інгібіторів гемаглютинації, які містяться в нормальних сироватках крові тварин і людини.

3.5.4. Реакція непрямої гемаглютинації

Суть РНГА: еритроцити, які сенсибілізовані вірусними антигенами або антитілами, здатні аглютинуватися в присутності гомологічних імунних компонентів (рис. 3.27).

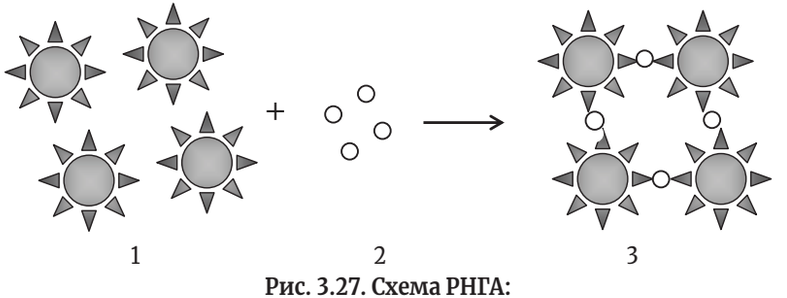


Рис. 3.27. Схема РНГА:

1 – антитільний еритроцитарний діагностикум; 2 – вірус; 3 – непряма гемаглютинація

* В іншій модифікації РЗГА до суміші сироватки з вірусом додають такий самий об'єм 1%-ї суспензії еритроцитів (у цьому випадку 0,04 мл).

РНГА треба відрізняти від РГА: в РГА еритроцити склеюються в результаті їхньої безпосередньої взаємодії з вірусами (за рахунок вірусного гемаглютиніну), а в РНГА – комплексами антиген – антитіло. РНГА використовується для діагностики ящуру, хвороби Ауєскі, інфекційного ринотрахеїту ВРХ, аденовірусної інфекції ВРХ, класичної чуми свиней, лейкозу птахів, інфекційного ларинготрахеїту птахів, реовірусної інфекції птахів, синдрому зниження несучості, вірусного гепатиту каченят та ін.

Ідентифікація вірусу в РНГА

Компоненти реакції: 1) досліджуваний вірус; 2) специфічний антиген і специфічна сироватка; 3) 1%-й антитільний еритроцитарний діагностикум; 4) 0,9%-й розчин NaCl (з 1% НСК).

Алгоритм РНГА

1. Етапи виготовлення антитільного еритроцитарного діагностикуму:

1) *стабілізація еритроцитів* барана або людини 0 групи відповідним методом: формаліном (2–18 год при 37 °С за постійного перемішування на магнітній мішалці), глутаральдегідом (30 хв при 4 °С) або акролеїном (20 хв за кімнатної температури). Стабілізовані еритроцити у вигляді 3%-ї суспензії можуть зберігатися при 4 °С кілька років, не гемолізуючись;

2) *танізація еритроцитів* – обробка стабілізованих еритроцитів розчином таніну (1:20 000–1:50 000) 10–15 хв при 37 °С. Танізовані еритроцити здатні адсорбувати протеїни, в тому числі антитіла. Їх зберігають у вигляді 1–3%-ї суспензії при 4 °С до 7 діб;

3) *сенсибілізація еритроцитів* – обробка танізованих еритроцитів гамма-глобуліновою фракцією імунної сироватки (в оптимальній концентрації 0,1–1,0 мг/мл) впродовж 30 хв при 56 ºС. Відмиті сенсибілізовані еритроцити розводять на ФБР (з 1% НСК) до 1%-ї концентрації. Їх можна зберігати при 4 ºС кілька місяців.

2. Основний дослід РНГА:

1) приготування дворазових розведень досліджуваного вірусу від 1:2 до 1:256 на 0,9%-му розчині NaCl (з 1% НСК) в об'ємі 0,02 мл;

2) додавання до кожного розведення досліджуваного вірусу по 0,02 мл 1%-го антитільного еритроцитарного діагностикуму;

3) остання лунка – без вірусу, для контролю антитільного еритроцитарного діагностикуму на спонтанну гемаглютинацію;

4) струшування планшетів, експозиція 1,5–2 год за кімнатної температури, облік результатів реакції (так само, як РГА, див. стор. 207) після повного осідання антитільного еритроцитарного діагностикуму в контрольній лунці;

5) вірус вважається ідентифікованим за гемаглютинації не менше ніж на 2 плюси.

6. *Контролі реакції*:

– контроль антитільного еритроцитарного діагностикуму:

1) 0,02 мл 1%-го еритроцитарного діагностикуму + 0,02 мл 0,9%-го розчину NaCl з 1% НСК;

2) 0,02 мл 1%-го еритроцитарного діагностикуму + 0,02 мл специфічної сироватки в розведенні 1:50;

– контроль специфічності:

1) постановка РНГА зі специфічним антигеном;

2) 0,02 мл досліджуваного вірусу + 0,02 мл специфічної сироватки 1:50 + 0,02 мл 1%-го антитільного еритроцитарного діагностикуму.

Цю методику використовують і для ***виявлення антитіл*** за допомогою *антигенних еритроцитарних діагностикумів*, які представляють собою еритроцити, сенсибілізовані вірусними антигенами. Принцип їхнього виготовлення такий самий, як і антитільних еритроцитарних діагностикумів: стабілізація, танізація та сенсибілізація еритроцитів. Для виявлення антитіл до дворазових розведень досліджуваної сироватки додають 1%-й еритроцитарний антиген. За *титр антитіл* приймають найвище розведення сироватки, яке зумовлює гемаглютинацію не менш ніж на 2 плюси.

РНГА характеризується високою чутливістю, простою технікою постановки, швидкістю отримання результатів. Недолік реакції – труднощі в приготуванні стабільних еритроцитарних діагностикумів.

3.5.5. Реакція затримки гемадсорбції

Суть РЗГАд: антитіла взаємодіють із модифікованою плазмолемою клітин культури, зараженої гемаглютинувальним вірусом, унаслідок чого клітини втрачають здатність адсорбувати еритроцити.

РЗГАд використовується для ідентифікації збудників грипу ссавців і птахів, парагрипу-3 ВРХ, ньюкаслської хвороби та інших гемаглютинувальних вірусів. Особливо цінна ця реакція в тих випадках, коли цитопатичні зміни недостатньо виражені.

Ідентифікація вірусу в РЗГАд

Компоненти реакції: 1) досліджуваний вірус (пробірки або мікропланшети із зараженою культурою клітин); 2) специфічна сироватка; 3) 0,5%-ва суспензія еритроцитів; 4) розчин Хенкса.

Алгоритм РЗГАд

1. З 4–8 пробірок (або лунок мікропланшетів) з інфікованою культурою клітин видалення живильного середовища, дворазове промивання культури розчином Хенкса.

2. Внесення в половину пробірок по 0,2 мл специфічної сироватки (нерозведеної або в розведенні 1:10) і 0,6 мл розчину Хенкса (в лунки мікропланшетів – по 0,02 мл специфічної сироватки і 0,18 мл розчину Хенкса), в інші (контрольні) пробірки – тільки розчин Хенкса по 0,8 мл (у контрольні лунки мікропланшетів – по 0,2 мл). Експозиція 20–30 хв за кімнатної температури.

3. Внесення у всі пробірки по 0,2 мл 0,5 %-ї суспензії еритроцитів (у лунки мікропланшетів – по 0,05 мл). Експозиція 10–15 хв за кімнатної температури або 30–40 хв при 4 °С, легке струшування і розгляд під малим збільшенням мікроскопа.

4. Облік результатів реакції: вірус ідентифікований за відсутності гемадсорбції в пробірках (або лунках мікропланшетів) зі специфічною сироваткою та наявності гемадсорбції в контрольних зразках (з розчином Хенкса).

Недоліком РЗГАд є вплив на вірогідність результатів неспецифічних інгібіторів гемаглютинації, що містяться в сироватках, які використовують для постановки реакції.

3.5.6. Реакція зв'язування комплементу

Суть РЗК: вірусні антигени взаємодіють з антитілами в присутності комплементу, внаслідок чого затримується гемоліз за додавання гемолітичної системи.

РЗК використовується для діагностики багатьох вірусних інфекцій (ящур, везикулярний стоматит, хвороба Ауєскі, аденовірусна інфекція ВРХ та ін.).

Компоненти РЗК: 1) вірусні антигени; 2) сироватки; 3) комплемент; 4) гемолізин (гемолітична сироватка); 5) 3 %-ва суспензія еритроцитів барана.

У РЗК беруть участь *дві системи антиген – антитіло:* специфічна (вірусологічна) і гемолітична. До *специфічної системи* належать вірусні антигени і сироватки з гомологічними антитілами, а до *гемолітичної* – гемолізин та еритроцити барана.

Гемолізин являє собою антисироватку (антитіла) щодо еритроцитів барана (антигену). Його отримують на біофабриках шляхом імунізації кролів еритроцитами барана.

Комплемент – це складний комплекс протеїнів, присутніх у нормальній сироватці крові людини і тварин. Як комплемент використовують

сироватку крові мурчака, що випускають на біофабриках у ліофілізованому вигляді. Комплемент має властивість приєднуватися до будь-якого комплексу антиген – антитіло (класів IgG і IgM). Це призводить до його активації з утворенням біологічно активних речовин, які спричинюють лізис антигену. Зокрема, в присутності гемолітичної сироватки комплемент зумовлює лізис еритроцитів барана (гемоліз).

Принцип постановки РЗК. Змішують вірус, сироватку і комплемент. Якщо вірусний антиген та антитіла гомологічні, утворюються імунні комплекси, які адсорбують комплемент, і при додаванні гемолітичної системи спостерігається *затримка гемолізу*. У разі невідповідності антигену й антитіл комплемент залучається в реакцію з гемолітичною системою, внаслідок чого виникає *гемоліз* (рис. 3.28).

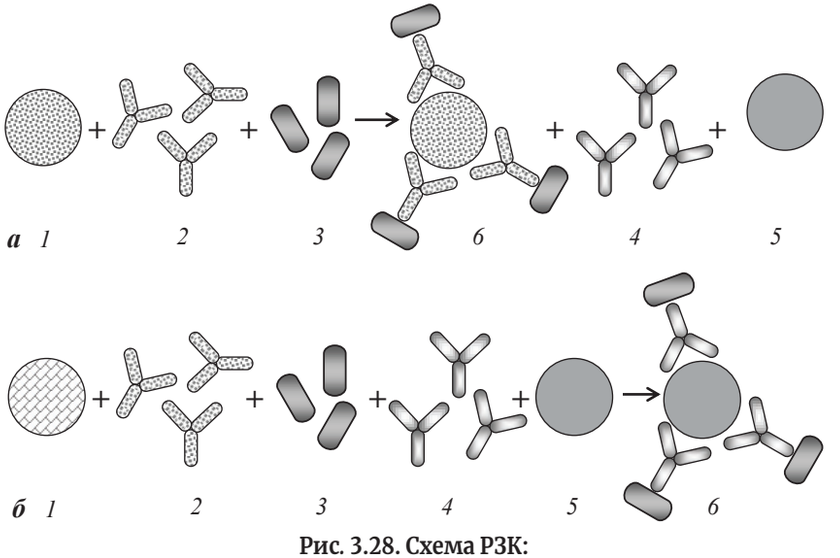


Рис. 3.28. Схема РЗК:
а – позитивна реакція; б – негативна реакція; 1 – вірусний антиген; 2 – антитіла; 3 – комплемент; 4 – гемолізин; 5 – еритроцити барана; 6 – імунні комплекси

Вірусні антигени для РЗК отримують із заражених біологічних об'єктів: органів і тканин тварин, органів та екстраембріональних рідин курячих ембріонів, культуральної рідини. Тому в антигенних вірусних препаратах завжди міститься багато баластних речовин клітин хазяїна, що здатні адсорбувати комплемент за відсутності гомологічних антитіл. Іншими словами, вірусні антигени мають *антикомплементарні властивості,* яких

обов'язково потрібно позбутися. Для усунення антикомплементарності антигени очищують від тканинних домішок шляхом обробки фторовуглецевими сполуками, ацетоном, ефіром, хлороформом, фреоном, β-пропіолактоном, метиловим або етиловим спиртом, а також багаторазовим заморожуванням і відтаванням.

Антикомплементарність властива не лише вірусним антигенам, але й сироваткам, що також слід враховувати при проведенні реакції. Одним із найпоширеніших методів *позбавлення сироваток від антикомплементарності* є обробка їх комплементом (3 об'єми сироватки + 1 об'єм комплементу, інкубація 16–18 год при 4 °С, а потім 30 хв при 37 °С). Після цього сироватки інактивують, як і в інших серологічних реакціях, при 56–60 °С 30 хв для руйнування неспецифічних вірусних інгібіторів і власного комплементу. Для запобігання появі антикомплементарних властивостей сироватки зберігають у замороженому або ліофілізованому вигляді.

РЗК ставиться в кілька *етапів*: 1) титрування гемолізину; 2) титрування комплементу; 3) основний дослід.

Для отримання вірогідних результатів РЗК обов'язково потрібно визначити оптимальну концентрацію всіх відомих її компонентів. Так, за надлишку комплементу відбувається його зв'язування і з комплексом антиген – антитіло (якщо він утворився), і з гемолітичною системою, внаслідок чого може виникнути гемоліз і буде поставлений невірний діагноз. Недостача комплементу зумовить затримку гемолізу при взаємодії його з гемолітичною системою і теж призведе до діагностичної помилки.

Реакцію можна ставити в різних об'ємах, найчастіше – по 0,02 мл кожного компонента. Треба мати на увазі, що загальний об'єм реакції є постійним. Тому за титрування тих чи інших компонентів або при постановці контролю, якщо якийсь інгредієнт не використовується, замість нього дають 0,9 %-й розчин NaCl.

Ідентифікація вірусу в РЗК

*Компоненти реакції:*1) досліджуваний вірус; 2) специфічна і нормальна сироватки; 3) специфічний і нормальний антигени; 4) комплемент; 5) гемолізин; 6) 3 %-ва суспензія еритроцитів барана; 7) 0,9 %-й розчин NaCl.

Алгоритм РЗК

1. Титрування гемолізину

Титрування гемолізину проводять при отриманні нової серії.

а) приготування в об'ємі 0,02 мл розведення гемолізину 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:3000, 1:4000 і 1:5000 на 0,9 %-му розчині NaCl;

б) додавання до всіх розведень гемолізину по 0,02 мл комплементу 1:10 і 3 %-ї суспензії еритроцитів барана, а також 0,04 мл 0,9 %-го розчину NaCl (замість антигену і сироватки). Експозиція при 37 °С 10 хв;

в) облік результатів реакції у плюсах (після осідання еритроцитів):

++++ – 100 %-ва затримка гемолізу (рідина безколірна, виражений осад еритроцитів);

+++ – 75 %-ва затримка гемолізу (рідина злегка забарвлена, виражений осад еритроцитів);

++ – 50 %-ва затримка гемолізу (рідина забарвлена, осад частини еритроцитів);

+ – 25 %-ва затримка гемолізу (рідина інтенсивно забарвлена, незначний осад еритроцитів);

– – повний гемоліз (рідина інтенсивно забарвлена, осаду еритроцитів немає);

г) *титр гемолізину* – найменша його кількість, що спричинює повний лізис 3 %-ї суспензії еритроцитів у присутності комплементу (1:10) за експозиції 10 хв при 37 °С;

д) для основного досліду беруть гемолізин у потрійному титрі. *Приготування гемолітичної системи:* змішування рівних об'ємів гемолізину в робочому титрі та 3 %-ї суспензії еритроцитів барана. Перед використанням експозиція гемолітичної системи 30 хв при 37 °С (для сенсибілізації еритроцитів).

2. Титрування комплементу

Титрування комплементу проводять у день постановки основного досліду:

а) приготування в об'ємі 0,02 мл розведення комплементу 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40, 1:60 і 1:80 на 0,9 %-му розчині NaCl;

б) додавання до всіх розведень комплементу по 0,04 мл гемолітичної системи та 0,9 %-го розчину NaCl (замість антигену і сироватки). Експозиція при 37 °С 30 хв;

в) *титр комплементу* – найменша його кількість, у присутності якої гемолізин у потрійному титрі спричинює повний лізис 3 %-ї суспензії еритроцитів за експозиції 30 хв при 37 °С;

г) для основного досліду беруть комплемент у подвійному титрі й уточнюють його робочу дозу шляхом титрування в присутності антигенів (специфічного, нормального) і сироваток (досліджуваної, специфічної, нормальної), які мають різний ступінь антикомплементарності.

3. Основний дослід РЗК:

а) приготування дворазових розведень досліджуваного вірусу від 1:4 до 1:8 на 0,9 %-му розчині NaCl в об'ємі 0,02 мл;

б) додавання до кожного розведення вірусу по 0,02 мл специфічної сироватки в робочій дозі, яку визначають шляхом титрування в присутності специфічного антигену. Для контролю до дворазових розведень досліджуваного вірусу додавання по 0,02 мл нормальної сироватки;

в) додавання до кожної суміші вірусу з сироваткою по 0,02 мл комплементу в робочій дозі. Експозиція 18–20 год при 4 °С (або 1 год при 37 °С) і 20–30 хв за кімнатної температури;

г) додавання до кожної суміші вірусу, сироватки і комплементу по 0,04 мл гемолітичної системи. Експозиція при 37 °С 45 хв;

д) облік результатів реакції зразу після прогрівання та остаточно – через 2 год експозиції за кімнатної температури;

е) вірус вважається ідентифікованим, якщо відбувається 100 %-ва затримка гемолізу в присутності специфічної сироватки за умови повного гемолізу в присутності нормальної сироватки;

є) *контролі реакції:*

– контроль специфічності (постановка основного досліду РЗК із специфічним та нормальним антигенами, досліджуваним вірусом та нормальною сироваткою);

– контроль вірусних антигенів (досліджуваного, специфічного та нормального) на антикомплементарність (0,02 мл антигену в розведенні 1:4 + 0,02 мл 0,9 %-го розчину NaCl + 0,04 мл комплементу + 0,04 мл гемолітичної системи);

– контроль специфічної та нормальної сироваток на антикомплементарність (0,02 мл сироватки + 0,02 мл 0,9 %-го розчину NaCl + 0,02 мл комплементу + 0,04 мл гемолітичної системи);

– контроль специфічного і нормального антигенів на гемотоксичність (0,02 мл антигену + 0,04 мл 0,9 %-го розчину NaCl + 0,04 мл гемолітичної системи);

– контроль гемолітичної системи (з комплементом і без нього):

1) 0,04 мл гемолітичної системи + 0,02 мл комплементу + 0,04 мл 0,9 %-го розчину NaCl;

2) 0,04 мл гемолітичної системи + 0,06 мл 0,9 %-го розчину NaCl.

Наведену вище методику РЗК можна застосовувати також для ***виявлення антитіл***. Для цього до дворазових розведень досліджуваної сироватки додають специфічний антиген, комплемент і гемолітичну систему. За наявності в досліджуваній сироватці антитіл буде затримка гемолізу

(на 2–4 плюси), а в разі їхньої відсутності – повний гемоліз. *Титр антитіл* – найвище розведення сироватки, яке спричинює затримку гемолізу не менше ніж на 2 плюси.

Незважаючи на трудомісткість, РЗК знайшла широке практичне застосування в лабораторній діагностиці багатьох вірусних інфекцій тварин.

3.5.7. Реакція дифузійної преципітації

Суть РДП: вірусні антигени та антитіла дифундують в агаровому гелі та за взаємодії утворюють лінії преципітації.

РДП використовується для діагностики сказу, хвороби Ауєскі, лейкозу ВРХ, аденовірусної інфекції ВРХ, хвороби Марека, віспи птахів та ін.

Ідентифікація вірусу в РДП

Компоненти РДП: 1) досліджувані вірусовмісні суспензії; 2) специфічна сироватки; 3) специфічний і нормальний антигени; 4) 1–2 %-й агар (консервований фенолом 0,1% або натрію мертіолатом 1:10 тис.); 5) 0,9 %-й розчин NaCl.

Алгоритм РДП

1. Нанесення на знежирені предметні скельця або в чашки Петрі розплавленого 1–2 %-го агару завтовшки 1–1,5 мм. Після застигання вирізання лунок за допомогою металевих матриць.

2. Внесення в одні лунки по 1–2 краплі досліджуваних вірусовмісних суспензій, в інші – специфічної сироватки (рис. 3.29).

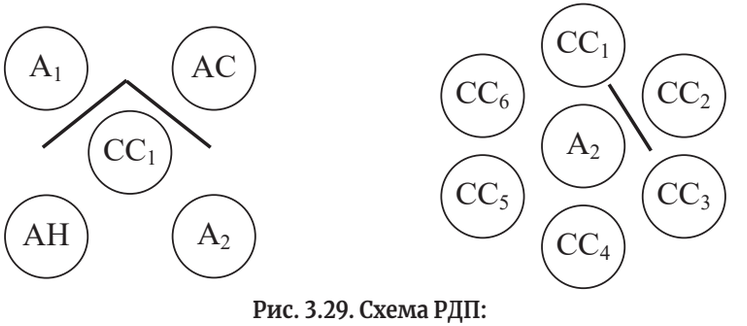


Рис. 3.29. Схема РДП:
A_1 – A_2 – досліджувані антигени; АС – специфічний антиген;
АН – нормальний антиген; CC_1 – CC_6 – специфічні сироватки

3. Експозиція у вологій камері 24–48 год за кімнатної температури або при 37 °С, облік результатів реакції.

4. Реакція позитивна при утворенні в агарі *білих ліній преципітації* між лунками з досліджуваними вірусовмісними суспензіями і специфічною сироваткою.

5. *Контролі реакції:*

– специфічна сироватка + специфічний антиген;

– специфічна сироватка + нормальний антиген.

Наведену методику РДП використовують і для ***виявлення антитіл***. Для цього в одні лунки вносять досліджувані сироватки (цільні або у дворазових розведеннях), в інші – специфічний антиген *Титр антитіл* – найвище розведення сироватки, яке зумовлює утворення ліній преципітації.

Перевагою РДП є проста техніка постановки, швидкість отримання результатів. Недолік – недостатня чутливість: у реакції виявляють вірусні антигени або антитіла за умови їхньої високої концентрації.

3.5.8. Реакція імунофлуоресценції

Суть РІФ: вірусні антигени взаємодіють із міченими флуорохромом антитілами, внаслідок чого виникає світіння за люмінесцентної мікроскопії.

Для мічення антитіл із флуорохромів найчастіше використовують *флуоресцеїну ізотіоціанат* (ФІТЦ), який зумовлює люмінесценцію зеленого кольору. РІФ застосовується для діагностики багатьох вірусних інфекцій (сказу, хвороби Ауєскі, парагрипу-3 ВРХ, вірусної діареї ВРХ та ін.).

РІФ ставиться *двома методами:* прямим і непрямим.

Прямий метод РІФ (рис. 3.30)

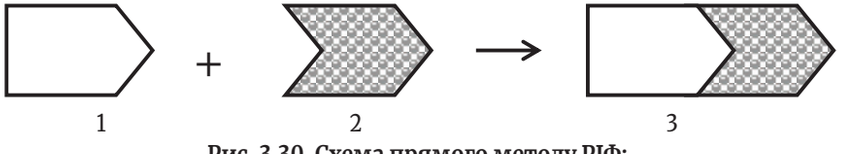


Рис. 3.30. Схема прямого методу РІФ:
1 – антиген; 2 – флуоресціююче антитіло; 3 – флуоресціюючий імунний комплекс

Компоненти реакції: 1) досліджуваний вірус (мазки-відбитки або гістозрізи з патологічного матеріалу хворих тварин, препарати із зараженої культури клітин); 2) флуоресціювальні специфічна і нормальна сироватки; 3) немічені специфічна і нормальна сироватки; 4) препарати з органів здорових тварин або незараженої культури клітин.

Алгоритм РІФ

1. Фіксація препаратів 10–15 хв у охолодженому ацетоні (–10...–15 °С), висушування на повітрі.

2. Нанесення на препарати флуоресціювальної специфічної сироватки, Експозиція 30 хв у вологій камері за кімнатної температури або при 37 °С (залежно від виду вірусу).

3. Відмивання препаратів 0,01 М ФБР (рН 7,2–7,4) тричі по 10 хв, споліскування дистильованою водою, висушування на повітрі й дослідження в люмінесцентному мікроскопі з застосуванням нелюмінуючої імерсійної олії.

4. Облік результатів реакції у плюсах за інтенсивністю і специфічністю *флуоресценції* досліджуваного об'єкта і чіткої морфології клітин:

++++ – яскраве світіння смарагдово-зеленого кольору;

+++ – яскраве світіння зеленого кольору;

++ – слабке світіння жовто-зеленого кольору;

+ – дуже слабке світіння невизначеного кольору;

– – відсутність флуоресценції.

5. Реакція позитивна у разі виявлення в препараті в трьох полях зору не менше як по 3–5 уражених вірусом клітин, що флуоресціюють яскраво-зеленим кольором на 3–4 плюси (внаслідок утворення комплексів антиген – антитіло). Флуоресценція буває *дифузною* та *гранулярною* залежно від виду вірусу і стадії його накопичення в клітині (рис. 3.31, 3.32, 3.33).

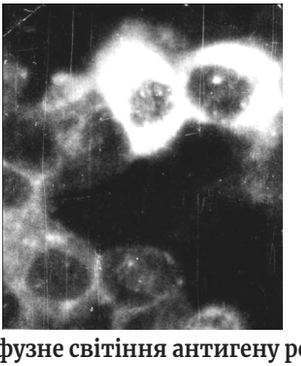


Рис. 3.31. Дифузне світіння антигену ротавірусу В у перещеплюваній культурі клітин MDBK
(Скибіцький В.Г., 1994)

6. *Контролі реакції:*

– незаражені клітини, оброблені флуоресціювальною специфічною сироваткою;

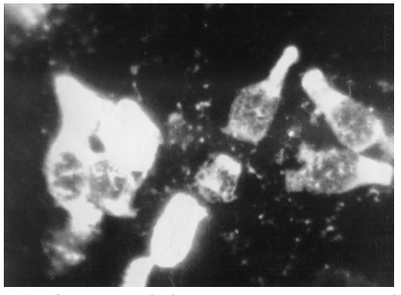


Рис. 3.32. Дифузне світіння антигену пестівірусу А в епітеліальних клітинах слизової оболонки тонкого кишечнику теляти
(Калініна О.С., 1983)

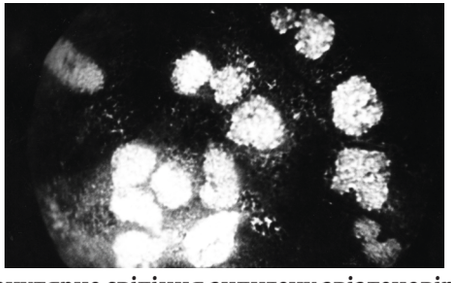


Рис. 3.33. Гранулярне світіння антигену авіаденовірусу птахів А в гепатоцитах курки
(Панікар І.І., 1990)

– заражені клітини, оброблені флуоресціювальною нормальною сироваткою;

– заражені клітини, оброблені спочатку неміченою специфічною сироваткою, а потім – флуоресціювальною специфічною сироваткою;

– заражені клітини, оброблені спочатку неміченою нормальною сироваткою, а потім – флуоресціювальною специфічною сироваткою.

За ***непрямого методу РІФ*** *(РНІФ)* досліджувані препарати обробляють двічі (рис. 3.34): спочатку неміченою специфічною сироваткою (30 хв у вологій камері за температури 18–22 °С або 37 °С), а потім після відмивання – флуоресціювальною антивидовою (антиглобуліновою) сироваткою. Її одержують шляхом імунізації тварини певного виду глобулінами, виділеними із сироватки тварини іншого виду, яка є продуцентом противірусної сироватки (наприклад, антиглобулінові сироватки кроля отримують на вівцях або козах). За наявності вірусного антигену виникає

флуоресценція заражених клітин (унаслідок утворення складних комплексів антиген – антитіло – антивидове антитіло).

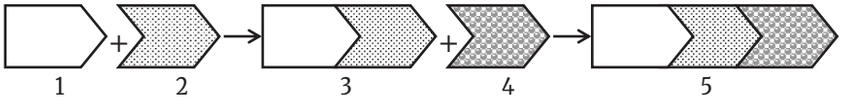


Рис. 3.34. Схема непрямого методу РІФ:
1 – антиген; 2 – антитіло; 3 – імунний комплекс;
4 – флуоресціююче антивидове антитіло; 5 – флуоресціюючий імунний комплекс

Непрямий метод РІФ має *переваги*. Він потребує лише однієї флуоресціювальної сироватки – антивидової, за допомогою якої можна виявити антигени різних вірусів (за умови, що специфічні сироватки до цих вірусів отримані шляхом імунізації тварин одного виду). Крім того, РНІФ використовується не лише для ідентифікації вірусу, але й для ***виявлення антитіл***. Для цього на фіксовані препарати з культури клітин, зараженої відомим вірусом, наносять спочатку дворазові розведення досліджуваної сироватки (від 1:10 до 1:1280), а після контакту – флуоресціювальну антивидову сироватку. Специфічні антитіла в досліджуваних сироватках виявляють за яскраво-зеленим світінням вірусного антигену в заражених клітинах. *Титр антитіл* – найвище розведення сироватки, за якого спостерігається чітка флуоресценція гомологічного антигену.

РІФ характеризується високою чутливістю, специфічністю і швидким отриманням результатів. Особливо цінна ця реакція для ідентифікації тих вірусів, які не мають цитопатогенних, гемаглютинувальних і гемадсорбівних властивостей. РІФ дає можливість вивчити процеси взаємодії вірусів із клітинами, дослідити динаміку накопичення вірусних антигенів у клітинах, антигенні зв'язки вірусів, а також патогенез вірусних інфекцій. Особливо важливе значення цього методу в разі дослідження асоційованих і хронічних інфекцій. Недолік РІФ – випадки неспецифічної флуоресценції, яку може спричинити наявність у специфічних сироватках нормальних антитіл або антитіл до гетерогенних тканинних протеїнів, фіксація мічених антитіл на лейкоцитах тощо.

3.5.9. Імуноензимний аналіз

Суть ІЕА: вірусні антигени взаємодіють із міченими ензимом антитілами, внаслідок чого утворюється кольоровий продукт ензимної реакції при додаванні індикаторного субстрату.

ІЕА характеризується високою специфічністю і чутливістю, яка в сотні разів перевищує чутливість інших серологічних реакцій. ІЕА використовується для діагностики багатьох вірусних інфекцій (інфекційний ринотрахеїт ВРХ, чума ВРХ, ринопневмонія коней, хвороба Марека, ньюкаслська хвороба та ін.).

Розроблено *два варіанти* ІЕА: 1) гістохімічний метод, або імунопероксидазна реакція; 2) методи твердофазного ІЕА (ELISA – від англ. enzyme-linked immunosorbent assay – ензимний імуносорбентний аналіз)

Імунопероксидазна реакція

Цей метод за суттю аналогічний РІФ. Він ґрунтується на використанні антитіл, мічених ензимом пероксидазою хрону *(імунопероксидазний кон'югат).* Утворення комплексу антиген – антитіло виявляють за допомогою *бензидинового субстрату* (диамінобензидину тетрахлориду). Субстрат під дією ензиму розкладається з утворенням *кольорового продукту ензимної реакції*, що видимий у світловому мікроскопі (спочатку блакитного кольору, який швидко переходить у коричневий).

Реакцію ставлять *двома методами:* прямим і непрямим.

За ***прямого імунопероксидазного методу*** (рис. 3.35) на фіксовані в ацетоні препарати наносять імунопероксидазний кон'югат (1–2 год у вологій камері при 37 °С), промивають 0,9 %-м розчином NaCl (15 хв) і дистильованою водою, наносять бензидиновий субстрат (5–10 хв у вологій камері за кімнатної температури), знову промивають і розглядають у світловому мікроскопі під імерсійною олією. Реакція вважається позитивною, якщо в клітинах виявляють дифузне жовто-коричневе забарвлення або гранули коричнево-чорного кольору.

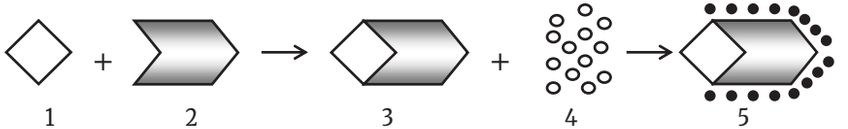


Рис. 3.35. Схема прямого імунопероксидазного методу ІЕА:
1 – антиген; 2 – мічене ензимом антитіло; 3 – імунний комплекс; 4 – бензидиновий субстрат; 5 – імунний комплекс, виявлений за допомогою субстрату

За ***непрямого імунопероксидазного методу*** (рис. 3.36) препарати обробляють спочатку специфічною сироваткою (1–2 год у вологій камері при 37 °С), потім антивидовим імунопероксидазним кон'югатом і нарешті – бензидиновим субстратом. За наявності вірусу в досліджуваному матеріалі утворюються складні комплекси: антиген – антитіло – антивидове

антитіло (мічене ензимом), і в результаті бензидиновий субстрат розкладається з утворенням кольорового продукту ензимної реакції.

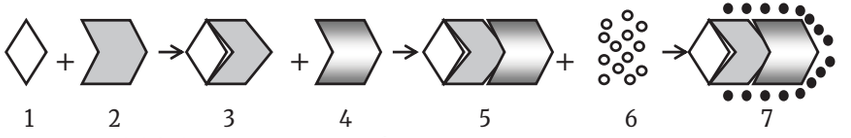


Рис. 3.36. Схема непрямого імунопероксидазного методу ІЕА:
1 – антиген; 2 – антитіло; 3 – імунний комплекс; 4 – мічене ензимом антивидове антитіло; 5 – імунний комплекс; 6 – бензидиновий субстрат; 7 – імунний комплекс, виявлений за допомогою субстрату

Перевага непрямого імунопероксидазного методу полягає в універсальності мічених антивидових глобулінів, за допомогою яких ідентифікують антигени різних вірусів (якщо противірусні сироватки отримані шляхом імунізації тварин одного виду). Крім того, непрямий імунопероксидазний метод можна застосовувати з метою в*иявлення антитіл.* Для цього на фіксовані препарати з культури клітин, зараженої відомим вірусом, наносять спочатку досліджувані сироватки, потім після відмивання – антивидовий імунопероксидазний кон'югат і нарешті – бензидиновий субстрат. Наявність у досліджуваних сироватках специфічних антитіл встановлюють за утворенням кольорового продукту ензимної реакції, про що свідчить відповідне забарвлення заражених клітин культури.

Гістохімічний варіант ІЕА дає змогу не лише ідентифікувати вірусні антигени, але й спостерігати місце їхньої локалізації у клітинах (тканинах).

Методи твердофазного ІЕА

Ці методи ґрунтуються на застосуванні антигенів або антитіл, фіксованих на нерозчинних носіях. Як *твердофазні носії* в ІЕА використовують планшети, пробірки, плівки із синтетичних полімерів, що мають високу сорбційну здатність, – полістиролу, поліакриламіду, поліпропілену тощо, а також гранули із сефарози, целюлози, карбоксиметилцелюлози, нітроцелюлозні мембрани (фільтри). Особливо широко застосовують *полістиролові планшети*. Використання їх та автоматизація процесу постановки й обліку результатів реакції дають змогу за короткий час дослідити велику кількість проб сироваток крові на наявність антитіл або вірусовмісного матеріалу на наявність вірусних антигенів.

У твердофазному ІЕА використовують *пероксидазні* та *лужнофосфатазні кон'югати.*

Існує кілька варіантів постановки твердофазного ІЕА. Для ідентифікації вірусів найчастіше використовують ***метод подвійних антитіл***, або ***«сендвіч»-метод*** (рис. 3.37). Для цього лунки полістиролових планшетів сенсибілізують імуноглобуліном, виділеним зі специфічної до досліджуваного антигену сироватки. У лунки додають спочатку вірусовмісний матеріал, а потім після відмивання – мічені ензимом антитіла (гомологічні антигену) і нарешті – субстрат: ортофенілендиамід або 5-аміносаліцилова кислота (для пероксидази) і р-нітрофеніл-фосфат (для лужної фосфатази). Якщо в досліджуваному матеріалі є відповідний антиген, він зв'язується з адсорбованими в лунках антитілами, до утворених імунних комплексів приєднуються мічені ензимом антитіла. Таким чином, утворюються складні комплекси: антитіло – антиген – мічене антитіло, які виявляють за допомогою субстрату. Під дією ензиму субстрат розкладається з утворенням кольорового продукту ензимної реакції: ортофенілендиамід дає оранжево-коричневе забарвлення, 5-аміносаліцилова кислота – інтенсивно-коричневе, а р-нітрофенілфосфат – жовте. Результати реакції враховують візуально за інтенсивністю забарвлення або за допомогою спеціальних спектрофотометрів (ридерів) за оптичним поглинанням рідини у реакційній системі. Інтенсивність забарвлення пропорційна кількості молекул ензиму, що міститься в імуноензимному кон'югаті, і таким чином характеризує концентрацію досліджуваного вірусного антигену, який зв'язався із зазначеним кон'югатом. За позитивний результат приймають підвищення оптичної густини досліджуваних проб над контрольними в 5–10 разів.

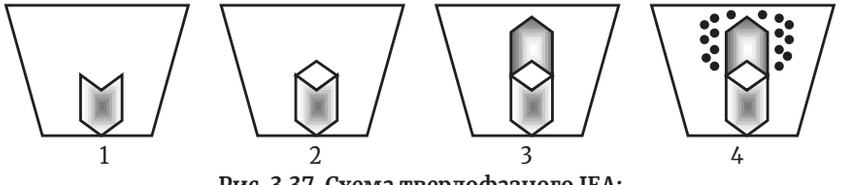


Рис. 3.37. Схема твердофазного ІЕА:
метод подвійних антитіл («сендвіч-метод»):
1 – адсорбція антитіл; 2 – внесення досліджуваного антигену;
3 – внесення мічених ензимом антитіл; 4 – додавання субстрату
та утворення кольорового продукту ензимної реакції

Для виявлення антитіл у сироватках крові найчастіше використовують ***непрямий метод твердофазного ІЕА*** (рис. 3.38). З цією метою лунки полістиролових планшетів сенсибілізують вірусним антигеном, до якого визначають антитіла. У лунки додають спочатку досліджувані сироватки,

а потім після відмивання – антивидовий імуноензимний кон'югат і нарешті – субстрат. Якщо в досліджуваній сироватці є антитіла, утворюються складні комплекси: антиген – антитіло – антивидове антитіло (мічене ензимом), і в результаті субстрат розкладається з утворенням кольорового продукту ензимної реакції.

Рис. 3.38. Схема непрямого методу твердофазного ІЕА:
1 – адсорбція антигену; 2 – внесення досліджуваної сироватки;
3 – внесення мічених ензимом антивидових антитіл; 4 – додавання субстрату
та утворення кольорового продукту ензимної реакції

Для проведення ІЕА на полістиролових планшетах зарубіжні фірми випускають комплекти приладів. Основна частина комплектів – обладнані мікрокомп'ютерами спектрофотометри, за допомогою яких вимірюють оптичну густину продукту ензимної реакції безпосередньо в лунках планшетів. Зчитування результатів дослідження 96 проб триває всього 1 хв. Ці прилади дають змогу проводити дослідження як у лабораторіях, так і в польових умовах.

За відсутності спеціального обладнання ІЕА можна ефективно проводити на спектрофотометрах, флуориметрах або фотоелектроколориметрах. Правда, при цьому дещо знижується вірогідність і продуктивність методу.

3.5.10. Імунохроматографічний аналіз

ІХА ґрунтується на принципі тонкошарової хроматографії та включає реакцію між вірусними антигенами і гомологічними антитілами в біологічних матеріалах (сеча, кал, цільна кров, сироватка або плазма крові).

Для виявлення вірусних антигенів використовують хроматографічні мембрани (імуностріпи) як твердий носій із нанесеними специфічними антитілами до досліджуваного вірусу. Одні антитіла мічені колоїдним золотом і є кон'югатом, інші (вторинні) – призначені для фіксації утворених імунних комплексів.

Після внесення досліджуваної проби в зону «S» імуностріпу іммобілізований кон'югат зв'язується з наявним вірусним антигеном. У результаті утворюється комплекси антиген – антитіло, які мігрують по капілярах

імуностріпу і після взаємодії з вторинними антитілами фіксуються в зоні «Т» імуностріпу з появою горизонтальної зафарбованої смуги. Не зв'язаний з вірусним антигеном кон'югат мігрує далі по мембрані та взаємодіє з позитивним контролем, іммобілізованим у зоні «С» імуностріпу. Поява горизонтальної зафарбованої смуги в цій зоні свідчить про активність і специфічність усіх компонентів системи (рис. 3.39).

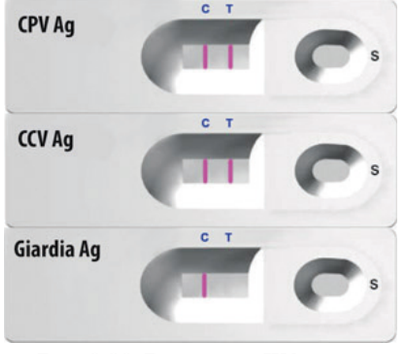


Рис. 3.39. Результат ІХА:
позитивний за парвовірозу (а) і коронавірозу собак (б);
негативний за лямбліозу собак (в); S – зона внесення досліджуваної проби;
С – контрольна зона; Т – тестова зона
(http://www.zooprice.ru/vet/invasion/vetexpert-testy-diagnostika-infektsii-invazii-pitom.html)

ІХА використовується для експрес-діагностики вірусних інфекцій дрібних тварин: чума, аденовіроз і грип собак, парвовірусна і коронавірусна інфекції собак і котів, лейкемія та імунодефіцит котів. Розроблено комплексний експрес-тест для виявлення антитіл до вірусу імунодефіциту та антигенів вірусу лейкемії котів у цільній крові, сироватці або плазмі крові хворої тварини.

Перевагою ІХА є простота проведення, висока чутливість (93–100 %) і специфічність (97,5–100 %), швидкість отримання результату (5–20 хв), можливість застосування в польових і лабораторних умовах, незалежно від устаткування та спеціальної підготовки персоналу.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Охарактеризуйте загальні принципи серологічних реакцій, що використовуються в лабораторній діагностиці вірусних інфекцій тварин. **2.** Розкажіть суть, методику постановки та інтерпретацію результатів

найбільш актуальних для вірусологічної практики серологічних реакцій. **3.** Які набори діагностикумів застосовують для постановки серологічних реакцій?

Висновки

1. Лабораторна діагностика вірусних інфекцій тварин ґрунтується на дослідженні патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин із використанням трьох груп методів: експресні, вірусологічні та серологічні (ретроспективні).

2. Основні вимоги при відборі патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин: 1) стерильність, якнайскоріше після появи клінічних ознак хвороби і не пізніше 2–4 год після загибелі; 2) з урахуванням тропізму вірусу і шляхів виділення його з організму в різні стадії хвороби; 3) консервування охолоджувальними сумішами для збереження інфекційної активності вірусу.

3. Експрес-методи лабораторної діагностики основані на швидкому виявленні вірусу або його компонентів безпосередньо в патологічному матеріалі від хворих і загиблих тварин, а саме: 1) виявлення віріонів вірусів методами ЕМ, ІЕМ, іноді – світлової мікроскопії (віруси віспи); 2) виявлення внутрішньоклітинних тілець-включень вірусів методом світлової мікроскопії; 3) ідентифікація вірусних антигенів у серологічних реакціях; 4) ідентифікація вірусних нуклеїнових кислот молекулярно-генетичними методами (метод ДНК-зондів, ПЛР).

4. Вірусологічні методи лабораторної діагностики ґрунтуються на виділенні вірусів із патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин шляхом зараження чутливих біологічних об'єктів (лабораторних тварин, курячих ембріонів і культур клітин) та наступній ідентифікації ізолятів у серологічних реакціях.

5. За ізоляції вірусів у чутливих біологічних системах необхідно визначити їхній інфекційний або гемаглютинувальний титр, що важливо для наступної серологічної ідентифікації збудників.

6. Методи серологічної (ретроспективної) діагностики основані на встановленні зростання титру антитіл у парних сироватках крові тварин-реконвалесцентів із використанням серологічних реакцій.

7. Серологічні реакції широко застосовують у лабораторній діагностиці вірусних інфекцій тварин, а саме: 1) для експрес-діагностики; 2) для ідентифікації вірусів, виділених у чутливих біологічних системах; 3) для серологічної (ретроспективної) діагностики.

Розділ IV
МЕТОДОЛОГІЯ САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ОБ'ЄКТІВ ДОВКІЛЛЯ І ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

Навчальні цілі розділу: мати чітке уявлення про стійкість вірусів у навколишньому середовищі; засвоїти методи санітарно-вірусологічного дослідження об'єктів довкілля і харчових продуктів; оволодіти навичками відбору проб з об'єктів довкілля (вода, ґрунт, осад стічних вод, повітря, змиви з предметів побуту) і харчових продуктів; оволодіти методиками підготовки взятих проб до дослідження, концентрації вірусів у досліджуваних зразках і деконтамінація вірусного концентрату; вміти складати план санітарно-вірусологічного дослідження об'єктів довкілля і харчових продуктів та реалізувати його на практиці.

ТЕМА 4.1. СТІЙКІСТЬ ВІРУСІВ ТА ЗАГАЛЬНІ ПРИНЦИПИ САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ ОБ'ЄКТІВ ДОВКІЛЛЯ І ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

4.1.1. Стійкість вірусів у навколишньому середовищі

Віруси різних таксономічних груп мають неоднакову резистентність до дії фізико-хімічних факторів довкілля. Якщо говорити в дуже загальних рисах, найменш стійкими є складно організовані віруси (із суперкапсидною оболонкою). Вони чутливі до ефіру, хлороформу, детергентів, кислого pH (наприклад, ортоміксо-, параміксо-, флаві-, корона- і герпесвіруси). Просто організовані віруси з ікосаедральним типом симетрії стійкі до зазначених факторів (наприклад, адено-, парво- і реовіруси).

Згубний вплив на віруси, незалежно від складності їхньої організації, має ***висока температура***. Чим вона вища, тим швидше віруси втрачають інфекційні властивості, і навпаки. Так, *пестівірус С* (збудник класичної

чуми свиней) у сироватці крові хворих тварин при 37 °С інактивується через 18–20 діб, при 56 °С – за 1 год, при кип'ятінні – моментально, а при 2–4 °С не втрачає активності впродовж 4–6 міс. У охолоджених м'ясних продуктах вірус зберігається 2–4 міс, у заморожених – кілька років, у солонині – 10 міс, у копченостях –3 міс. *Вірус африканської чуми свиней* залишається життєздатним у холодильнику при –30...–60 °С – 6–10 років, при 5 °С – 5–7 років, у м'ясі й копченостях – 5–6 міс, за кімнатної температури – 18 міс, при 37 °С – 10–30 діб, при 60 °С – 20–30 хв. *Альфагерпесвірус свиней 1* (збудник хвороби Ауєскі) зберігає інфекційну активність при 1–4 °С від 130 діб до 4 років, при 60 °С інактивується за 45–50 хв, при 80 °С – за 3 хв. *Вірус ящуру* в молоці інактивується при 65 °С за 30 хв, при 70 °С – за 15 хв, при 80–100 °С – за кілька секунд, а при –40...–70 °С зберігається кілька років.

Проте є віруси, дуже стійкі до дії високих температур. Наприклад, *вірус гепатиту В* у сироватці крові хворих зберігає інфекційну активність при 30–32 °С упродовж 6 міс, при 60 °С – 10 год, при 98 °С – 20 хв, при 100 °С – 10 хв, а при –20 °С – 15 років. Обробка сухим жаром при 160 °С інактивує цей вірус упродовж 1 год. Високою терморезистентністю характеризуються *пріони*. Збудники куру і скрейпі зберігають інфекційність після 30-хвилинного кип'ятіння. Збудник скрейпі не інактивується повністю після автоклавування при 134 °С упродовж 1 год, а збудник губчастоподібної енцефалопатії ВРХ – при 134–138 °С упродовж 18 хв.

Стійкість вірусів до *ультрафіолетового опромінення, іонізуючої радіації* та *дезінфікуючих речовин* залежить від багатьох чинників, зокрема щільності упакування нуклеїнової кислоти в капсид, розмірів геному, наявності зовнішньої ліпопротеїнової оболонки. Висока резистентність до *дезінфектантів* властива *вірусу африканської чуми свиней*. Хлоровмісні препарати (5 %-й розчин хлораміну, натрію й кальцію гіпохлорити, хлорне вапно з 1–2 % активного хлору) інактивують збудник за 4 год, а 2 %-й розчин їдкого натру вбиває його за 24 год. За *класичної чуми свиней* найбільш ефективними дезінфікуючими засобами є розчини їдкого натру (2–3 %-й), формальдегіду (2,5 %-й) і водна суспензія хлорного вапна(15–20 %-ва), які вбивають збудник упродовж 1 год. Резистентним до хімічних речовин є *вірус ящуру*. Широко використовувані у ветеринарній практиці розчини хлорного вапна, фенолу, креоліну, крезолу інактивують його за кілька годин. Кращі дезінфікуючі засоби за ящуру – розчини формальдегіду (2 %-й) та їдкого натру (1–2 %-й), які інактивують вірус за 10–30 хв.

У різних ***об'єктах довкілля*** віруси можуть тривалий час залишатися життєздатними. Наприклад, *альфагерпесвірус свиней 1* у сіні, зерні, воді, гною й

підстилці зберігається в осінньо-зимовий період 21–60 діб, навесні – 35 діб, влітку – 20 діб, у гниючих трупах – до 4 тижнів, у висохлих трупах гризунів – до 6 міс. За біотермічного знезараження гною вірус інактивується впродовж 8–15 діб. Прямі сонячні промені вбивають вірус упродовж 6 год, розсіяні – за 12–48 год, ультрафіолетові промені – за 1 хв. Висока стійкість властива *вірусу африканської чуми свиней*. В інфікованих свинарниках він зберігається 3 міс, у ґрунті – 4–6 міс, у трупах – 2,5 міс, у калі при 4–8 °С – 5 міс, у сечі – 2 міс, в озерній воді – 6 міс, у холодильнику при –30...–60 °С – 6–10 років. *Пестівірус С* нестійкий у навколишньому середовищі. У трупах і гною він гине через 3–5 діб, у ґрунті – через 1–2 тижні. *Вірус ящуру* високорезистентний до несприятливих факторів довкілля. На шерсті тварин він зберігається 50 діб, на одягу – 100 діб, у приміщеннях – 70 діб. На гірських пасовищах збудник може зберігатися до наступного сезону, в стічних водах у холодну пору виживає до 103 діб, влітку – 21 добу, восени – 49 діб.

Концентрація населення у великих містах, розвиток промисловості та індустріального тваринництва призводять до зростання біологічного забруднення навколишнього середовища. Тим самим створюються умови для виживання й циркуляції вірусів у об'єктах довкілля, що сприяє поширенню вірусних інфекцій серед людей і тварин. У зв'язку з цим важливим є розробка комплексу заходів, спрямованих на обмеження або попередження циркуляції патогенних для людини вірусів у навколишньому середовищі. Розв'язанням цих питань займається *санітарна вірусологія.*

Основне значення в проблемі забруднення об'єктів довкілля мають патогенні для людини кишкові та респіраторні віруси. Цей розподіл вірусів на кишкові й респіраторні є умовним. Він відображає тропізм вірусів, шляхи проникнення їх в організм і виділення в навколишнє середовище.

Кишкові віруси передаються від людини людині переважно фекально-оральним шляхом, накопичуються у високих концентраціях у шлунково-кишковому тракті та виділяються з фекаліями в довкілля. До цієї групи належать: 1) ентеровіруси A, B, C і D та гепатовірус A з родини *Picornaviridae*; 2) ротавіруси A, B і C із родини *Reoviridae*; 3) мастаденовірус людини F із родини *Adenoviridae*; 4) ентеральні штами коронавірусів людини 229E і NL63 з родини *Coronaviridae*; 5) віруси Саппоро і Норволк з родини *Caliciviridae*; 6) мамастровіруси 1, 6, 8 і 9 із родини *Astroviridae.*

Концентрація вірусів у фекаліях може досягати від 10^6 (ентеровіруси) до 10^{11} (ротавіруси) віріонів у 1 г. Забруднення об'єктів довкілля кишковими вірусами (відкриті водойми, підземні джерела водопостачання, питна вода, ґрунт, овочі, фрукти тощо) відбувається переважно через неочищені,

недостатньо очищені та незнезаражені господарсько-побутові стічні води. Так, вміст ентеровірусів у них може становити 7000 БУО/л, а іноді й 50000 БУО/л.

Ентеровіруси завдяки простій організації, жорсткому упакуванню РНК і протеїну характеризуються високою стійкістю до фізико-хімічних факторів, що зумовлює їхнє тривале виживання в навколишньому середовищі. Строки збереження цих вірусів у об'єктах довкілля значно зростають за зниження температури. Наприклад, *ентеровірус С* (збудник поліомієліту) виживає в річній і водопровідній воді при 4 °С – 90 діб, при 20 °С – 40 діб, при 37 °С – 10 діб, а в замороженому вигляді (при –20 °С і нижче) – впродовж кількох років. У фекаліях і каналізаційних водах при 0 °С ентеровіруси можуть зберігати інфекційну активність кілька місяців, але інактивуються за температури 50 °С упродовж 30 хв, при кип'ятінні й автоклавуванні – за кілька секунд. Проте терморезистентність ентеровірусів підвищується в присутності двовалентних катіонів кальцію й магнію, а також у середовищі з протеїновими і жировими компонентами. Ентеровіруси погано переносять ліофільне висушування, тому цей спосіб консервування непридатний для тривалого зберігання або транспортування вірусовмісних матеріалів. Ентеровірусам характерна стійкість у широкому діапазоні pH – від 2,0 до 11,0. Звичайні дезінфікуючі засоби (фенол, лізол, спирт, поверхнево-активні речовини) малоефективні щодо ентеровірусів. Інактивувальний вплив на них виявляють формальдегід (0,3 %-й розчин), вільний залишковий хлор (0,3–0,5 мг/л), ультрафіолетове випромінювання.

Висока стійкість до несприятливих факторів навколишнього середовища властива *гепатовірусу А* (збуднику гепатиту А). Він здатний упродовж кількох тижнів і навіть місяців виживати у воді. Відомі водні спалахи гепатиту А, наприклад, поширення інфекції через сиру колодязну або водопровідну воду. Гепатовірус А термостабільний. Дія температури 60 °С упродовж 10–12 год не призводить до повної його інактивації. Цілковитої втрати інфекційної активності збудника можна досягти при кип'ятінні впродовж 5 хв, автоклавуванні (120 °С – 45 хв), дії сухого жару (180 °С – 1 год), ультрафіолетового випромінювання (1,1 Вт – 1 хв), хлоровмісних препаратів (2,0–2,5 мг/л – 15 хв), формаліну (1:4000–3 діб). Вірус стійкий до ефіру та інших органічних розчинників, pH 3,0. У замороженому стані при –20...–70 °С він залишається життєздатним роками, при 4 °С – кілька місяців.

Резистентними до фізико-хімічних факторів є *ротавіруси А, В* і *С* – основні збудники гастроентеритів у людей. На різних об'єктах довкілля вони зберігають життєздатність від 10–15 діб до 1 міс, у фекаліях за

кімнатної температури – від кількох тижнів до 7 міс. Ротавіруси втрачають свою інфекційну активність під дією pH 2,0 і 12,0, після ультрафіолетового опромінення впродовж 15 хв, обробки 8 %-м формальдегідом – 5 хв, 70 %-м етанолом – 30 хв, 2 %-м лізолом, 2 %-м фенолом і 1 %-м H_2O_2–1 год.

Стійкими в навколишньому середовищі є *мастаденовіруси людини A, B, C* і *F*. У воді за температури 4 °С вони можуть залишатися життєздатними впродовж 2 років і більше. Мастаденовіруси резистентні в межах pH 5,0–9,0, при 56 °С втрачають інфекційну активність упродовж 10–30 хв.

З усіх об'єктів довкілля найважливіше значення в поширенні патогенних для людини вірусів має ***вода***, з якої виділені понад 100 видів збудників. Основною причиною забруднення води є фекалії людини, в яких містяться у великих концентраціях кишкові віруси. Висока стійкість кишкових вірусів до фізико-хімічних факторів довкілля обумовлює можливість їхньої тривалої циркуляції у воді, що у свою чергу становить потенційну небезпеку для здоров'я людини. Строки виживання кишкових вірусів у воді коливаються від кількох днів до кількох місяців і навіть років. Це залежить від температури і ступеня забруднення води, наявності супутньої мікрофлори, хімічного складу води, індивідуальної стійкості штамів вірусів.

Важливим фактором поширення кишкових вірусів у навколишньому середовищі є ***ґрунт***. При використанні недостатньо знезаражених господарсько-побутових стічних вод для поливання сільськогосподарських угідь виникає реальна небезпека контамінації ґрунту й овочевих культур кишковими вірусами. Залежно від виду вірусу, характеру ґрунту і кліматичних умов віруси можуть сорбуватися на частках ґрунту або мігрувати на значну глибину, потрапляючи в ґрунтові води. Строки виживання вірусів у ґрунті й осаді стічних вод (так само, як і у воді) залежать від багатьох факторів: тип ґрунту і склад осаду, температура, pH, вологість середовища, ступінь органічного, мікробного і хімічного забруднення, а також штамові особливості вірусів. Так, *ентеровіруси* зберігають життєздатність у ґрунті за різних умов від 25 до 170 діб. Виживання їх триваліше в супіщаному ґрунті, слаболужному pH середовища й особливо за зниження температури ґрунту. У суглинистому й чорноземному ґрунтах при 18–23 °С і кислих значеннях pH ентеровіруси гинуть швидше. Оптимальними умовами для збереження ентеровірусів у ґрунті є pH 7,5, температура 3–10 °С, вологість 10–11 %. Санітарно-вірусологічні дослідження показали, що близько 11 % проб ґрунту, який зрошується стічними водами, і понад 70 % проб осаду стічних вод містять ентеровіруси.

Респіраторні віруси передаються повітряно-крапельним шляхом і спричинюють у людей захворювання, відомі під назвою «гострі респіраторні

вірусні інфекції» (ГРВІ). До них належать грип, парагрип, респіраторно-синцитіальна, аденовірусна, риновірусна, коронавірусна та ентеровірусна респіраторна інфекції, Із респіраторних патогенів слід особливо виділити небезпечні представники родини *Coronaviridae.* Гострий респіраторний дистрес-синдром (легеневу недостатність із ризиком смерті) викликають три коронавіруси – збудники респіраторного синдрому Близького Сходу (MERS-CoV), тяжкого гострого респіраторного синдрому (SARS-CoV) і тяжкого гострого респіраторного синдрому 2 (SARS-CoV-2), останній з яких спричинив пандемію COVID-19 2020 р.

Основним джерелом забруднення ***повітря*** респіраторними вірусами є хворі люди або латентні вірусоносії. За кашлю, чхання чи розмови віруси потрапляють у повітря з краплями слини, слизу або мокротинням, де утворюється дисперсна частина – *аерозоль*. Розрізняють три фази аерозолю. Перша фаза аерозолю – *краплинна*. Великі краплі аерозолю (50–2000 мкм) швидко осідають на поверхню предметів довкілля, інфікуючи пил, а легші (менше 50 мкм) – певний час перебувають у суспендованому стані. За умов низької вологості й високої температури вони швидко висихають та утворюють другу фазу аерозолю – *фазу висохлих крапель* (або крапельних ядерець). Ці висохлі краплі здатні тривалий час залишатися в завислому стані й переноситися повітряними потоками на значні віддалі або осідають на підлогу, поверхню предметів у приміщенні, інфікуючи пил. Третя фаза аерозолю – *пилова*. Якщо приміщення не прибирати, частки пилу з вірусами циркулюють у повітрі та при вдиханні можуть спричинити зараження людини.

Отже, всі три фази аерозолю становлять потенційну епідеміологічну небезпеку для сприйнятливого людського організму, незважаючи на невисоку стійкість респіраторних вірусів у довкіллі. Найменшу стійкість у повітрі проявляють ортопневмовірус та респіровіруси людини 1 і 3 (1–2 год). Дещо стійкішими є віруси грипу А і В та найбільш стійкі – ентеровірус В і мастаденовіруси людини А, В і С (4–6 год). У закритих приміщеннях зараження сприйнятливих осіб малостійкими вірусами здійснюється в основному за рахунок крапельної фази аерозолю. Більш стійкі віруси (мастаденовіруси, ентеровірус В) проникають також у вигляді пилової фази аерозолю. Атмосферне повітря може слугувати фактором передавання деяких збудників, наприклад ентеровірусів, у місцях дощування землеробних полів стічними водами або вірусу ящуру в період епізоотії на тваринницьких фермах. Віруси можуть переноситися з потоком повітря на значні віддалі (десятки кілометрів від вогнища інфекції), що залежить від швидкості вітру. Дощова погода, навпаки, обмежує поширення вірусів.

Істотний вплив на виживання вірусів у повітрі мають *температура* і *відносна вологість*. Підвищення температури, як правило, призводить до швидкої інактивації вірусів. Так, при 7 °С віруси грипу А і В, ентеровірус С, віруси вісповакцини і венесуельського енцефаломієліту коней виживають у повітрі понад 23 год, тоді як при 32 °С – 1 год. Вплив відносної вологості на виживання вірусів у повітрі залежить від їхніх біологічних властивостей, зокрема наявності зовнішньої ліпопротеїнової оболонки. Так, віруси грипу А і В, ортопневмовірус людини, респіровіруси людини 1 і 3, віруси вісповакцини і венесуельського енцефаломієліту коней найбільш стійкі за низьких показників відносної вологості (менше 30 %) та швидко інактивуються при вологості 50–70 %. А ентеровіруси В і С та мастаденовіруси людини А, В і С, навпаки, більш стійкі в повітрі за високих показників відносної вологості та скоріше інактивуються в разі їхнього зниження. Середня вологість повітря згубно діє на збудників кору, везикулярного стоматиту, саркоми Рауса, віспи голубів.

Предмети побуту можуть бути фактором передавання збудників респіраторних інфекцій людини внаслідок осідання на різні поверхні всіх трьох фаз аерозолю з повітря, а також кишкових вірусів. Наприклад, на склі та посуді віруси грипу А і В зберігають інфекційність 10 діб, мастаденовіруси людини А, В, С і F та ентеровіруси А, В, С і D – 3–4 тижні. На поверхнях, лінолеумі, тканинах ортопневмовірус та респіровіруси людини 1 і 3 виживають від кількох хвилин до кількох годин, віруси грипу А і В – 1–3 доби, а мастаденовіруси людини А, В, С і F – до тижня.

Значну роль у поширенні вірусних інфекцій відіграють ***харчові продукти***. Контамінація їх вірусами може відбуватися ендогенно (за життя тварини) або екзогенно (у процесі заготовлення, при транспортуванні, переробці та зберіганні). За екзогенної контамінації віруси потрапляють у харчові продукти від хворих людей і тварин, вірусоносіїв або з об'єктів довкілля (вода, ґрунт). Харчові продукти можуть контамінуватися під час приготування їжі (салати, холодні закуски тощо), при вирощуванні овочів.

Описані епідемічні спалахи кліщового енцефаліту (так звана молочна пропасниця) внаслідок споживання молока інфікованих кіз. У країнах Західної Європи, США, Японії зареєстровано епідемічні спалахи гепатиту А за споживання устриць, що як біологічні фільтри здатні концентрувати в собі різні віруси. Виявлення ентеро-, рео-, адено- і герпесвірусів в устрицях, мідіях і креветках обумовлено забрудненням вірусами водойм. У літній період в організмі устриць строк виживання ентеровірусів становить тиждень, а взимку досягає 2 міс. Експериментально доведено, що устриці здатні концентрувати ентеровірус С навіть за незначного

вмісту його у воді й бути фактором передавання цього збудника. Особливу епідемічну небезпеку представляють ті молюски, які використовуються в їжу в сирому або недостатньо термічно обробленому вигляді.

Завдяки високій стійкості до фізико-хімічних факторів довкілля *ентеровіруси* можуть тривалий час зберігатися в молочних і м'ясних продуктах, на хлібі, овочах, у молюсках тощо. Наприклад, ентеровіруси В і С зберігають інфекційну активність у молоці впродовж 10–15 діб, стерилізованому молоці – до 1 року, морозиві – 4–5 міс, бринзі – до 3 міс, м'ясному фарші за температури 2 °С – до 6 міс, на хлібі – від 3–4 до 15 діб. Молоко і молочні продукти відіграють значну роль у поширенні таких вірусних інфекцій, як гепатит А, поліомієліт, кліщовий енцефаліт, ящур. Ентеровірус С витримує тушкування, прожарювання, запікання і пропарювання устриць. Кип'ятіння крабів упродовж 8 хв інактивує ентеровіруси В і С, ротавіруси А, В і С.

Строки виживання ентеровірусів на *овочевих культурах* залежать від виду рослин, умов вегетації та штаму вірусу. У стеблинах рослин віруси зберігають інфекційну активність до 12–13 діб, на поверхні рослин – до 16 діб. Висока вологість і низькі температури сприяють тривалішому збереженню вірусів на овочах. Так, при 6–10 °С на поверхні редису, томатів, салати, огірків ентеровіруси можуть виживати понад 2 міс. Найшвидше інактивуються віруси на листях капусти (3–4 доби), що пояснюється її фітонцидною активністю.

4.1.2. Загальні принципи санітарно-вірусологічного дослідження об'єктів довкілля і харчових продуктів

Враховуючи поширення небезпечних для здоров'я людини вірусів у об'єктах довкілля і харчових продуктах, актуальним завданням санітарної вірусології є вивчення закономірностей циркуляції вірусів у зазначених об'єктах і розробка методів індикації збудників та ефективних заходів санації.

Основні об'єкти санітарно-вірусологічного дослідження:

- стічні води (до очищення на міських очисних спорудах, на етапах очищення і знезаражування);
- вода відкритих і підземних водойм для господарсько-побутових потреб;
- питна вода;
- ґрунт та осад стічних вод;
- повітря дитячих дошкільних, шкільних і лікувально-профілактичних закладів;

· харчові продукти.

Етапи санітарно-вірусологічного дослідження об'єктів довкілля і харчових продуктів:

· відбір проб з об'єктів довкілля і харчових продуктів;
· підготовка проб до дослідження;
· концентрація вірусів;
· деконтамінація вірусного концентрату;
· вірусологічне дослідження.

Вірусологічні методи полягають у наступному:

1) ізоляція вірусу з досліджуваного матеріалу шляхом зараження чутливих біологічних об'єктів – білих мишенят, курячих ембріонів або перещеплювані культури клітин;

2) ідентифікація виділеного вірусу в серологічних реакціях – РН, РІФ, ІЕА, РЗГА, РЗГАд, РЗК.

За ізоляції вірусів із проб з об'єктів довкілля і харчових продуктів обов'язково проводять концентрацію вірусів відповідними методами для того, щоб інфекційна дія вірусу проявилася в першому пасажі.

Для швидкої ідентифікації вірусів безпосередньо в досліджуваних пробах з об'єктів довкілля (вода, ґрунт, осад стічних вод) і харчових продуктів використовують експрес-методи: 1) індикація вірусних нуклеїнових кислот у ПЛР; 2) ідентифікація вірусних антигенів методами ІЕА, ІХА та РНГА. Іноді використовують ЕМ та ІЕМ для виявлення віріонів вірусів.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Яка стійкість вірусів до фізико-хімічних факторів навколишнього середовища? **2.** Назвіть основні об'єкти санітарно-вірусологічного дослідження. **3.** Назвіть етапи і методи санітарно-вірусологічного дослідження об'єктів довкілля і харчових продуктів.

ТЕМА 4.2. САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ВОДИ

Вода має важливе значення в поширенні патогенних для людини вірусів (понад 100 видів). Головна причина вірусного забруднення води – це фекалії людини, з якими виділяються в довкілля ***кишкові віруси***, а саме: 1) ентеровіруси A, B, C і D та гепатовірус A з родини *Picornaviridae*;

2) ротавіруси A, B і C із родини *Reoviridae*; 3) мастаденовірус людини F із родини *Adenoviridae*; 4) ентеральні штами коронавірусів людини 229E і NL63 із родини *Coronaviridae*; 5) віруси Саппоро і Норволк із родини *Caliciviridae*; 6) мамастровіруси 1, 6, 8 і 9 із родини *Astroviridae.*

Висока стійкість кишкових вірусів у навколишньому середовищі забезпечує їхню тривалу циркуляцію у воді (від кількох днів до кількох місяців і навіть років), чим створюється потенційна загроза здоров'ю людини. Виявлення у воді хоча б 1 БУО/л ентеровірусу вже свідчить про епідемічну небезпеку.

Санітарно-вірусологічне дослідження водних об'єктів здійснюється під час проведення запобіжного і поточного санітарного нагляду, а також за епідеміологічними показаннями.

Основні об'єкти санітарно-вірусологічного дослідження води:

· стічні води;
· стічні води на етапах очистки та знезаражування;
· вода відкритих водойм, що використовуються як джерела водопостачання;
· водопровідна вода;
· вода підземних джерел;
· питна вода у розвідній водопровідній мережі;
· питна вода доочищена і бутильована;
· вода морських і прісних водойм, що використовуються для рекреаційних потреб;
· вода плавальних басейнів та аквапарків.

Етапи санітарно-вірусологічного дослідження води (рис. 4.1):

· відбір проб;
· підготовка проб до дослідження;
· концентрація вірусів;
· деконтамінація вірусного концентрату;
· вірусологічне дослідження (виявлення вірусних антигенів і геномів або виділення та ідентифікація вірусів).

Відбір проб води. Відбір проб води здійснюють, дотримуючись загальних вимог відбору матеріалу для вірусологічного дослідження, що забезпечують збереження вірусів у пробі та не допускають контамінації вторинною мікрофлорою. Проби беруть у стерильний посуд за допомогою спеціального обладнання – пробовідбірників води і батометрів. Проби відбирає проінструктований працівник лабораторії, який працює в медичному халаті (спецодязі) та латексних або гумових рукавичках. Після відбору

проб рукавички обробляють 70 %-м етиловим спиртом, по завершенню роботи халати та рукавички підлягають стерилізації.

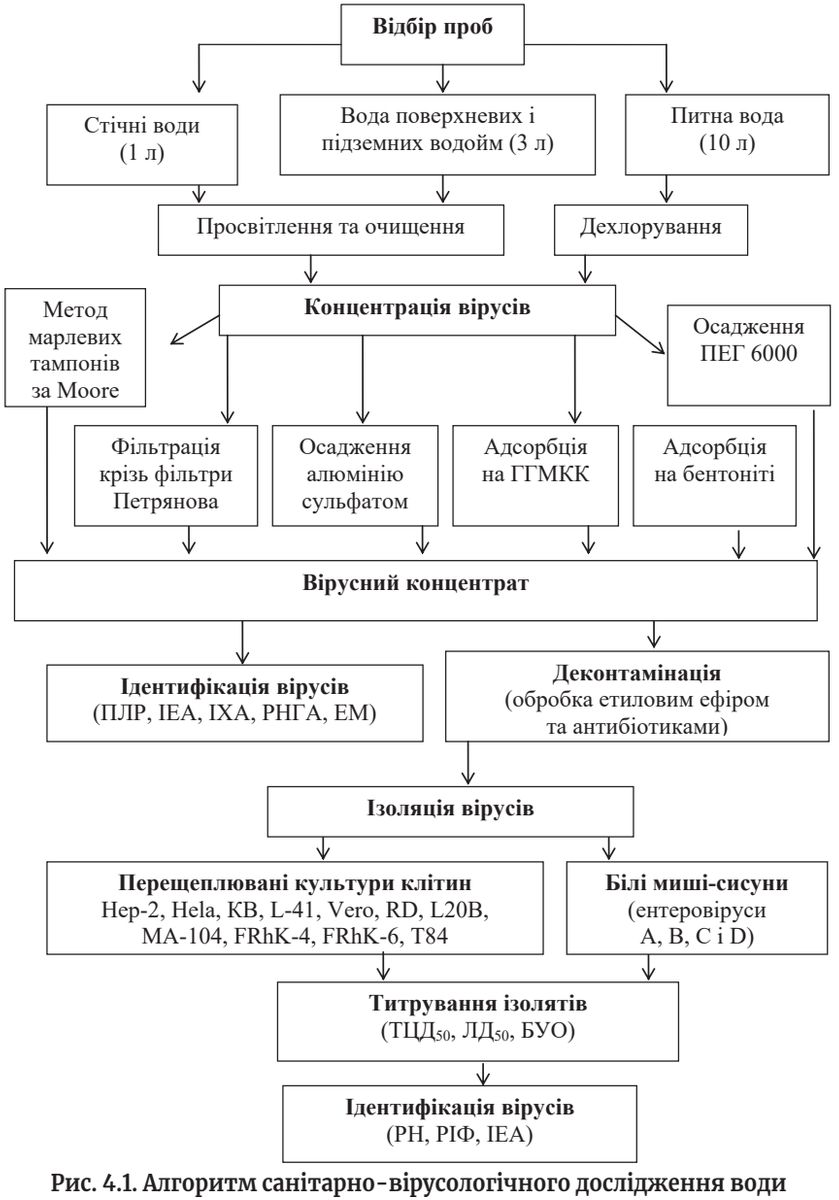


Рис. 4.1. Алгоритм санітарно-вірусологічного дослідження води

Отриманий матеріал маркують, зазначаючи місце (населений пункт), точку відбору, назву проби і дату. Проби води доставляють у лабораторію, дотримуючись правил холодового ланцюга (з холодовими елементами в сумках-холодильниках, пластикових коробках тощо).

Термін доставки матеріалу в лабораторію не повинен перевищувати 6 год із моменту його взяття. У лабораторії матеріал обробляють у перші години з часу надходження. Якщо неможливо провести дослідження того ж дня, доставлені проби зберігають при 4 °С упродовж однієї доби або при –20 °С – 7 діб. Кожну пробу обов'язково реєструють в робочому журналі.

Стічні води. Місця відбору проб – оглядові колодязі, відкриті частини колектора, очисні споруди (до і після очищення). За умови поточного санітарного нагляду (систематичного вірусологічного контролю) за стічними водами проби беруть 1–2 рази на місяць, а в разі зміни епідеміологічної ситуації кратність взяття проб визначає епідеміолог.

Стічні води беруть за допомогою марлевих тампонів за Mooге: нарізають марлю на серветки, розміром 10 × 10 см, кладуть їх одну на одну пошарово в 48 шарів, пронизують через них капроновий шпагат і міцно фіксують усі шари марлі; запаковують тампон у папір, стерилізують, лишаючи кінець шпагату в 1,5 м ззовні.

У місці відбору проб фіксують вільний кінець шпагату на дроті, що закріплений над колектором, знімають обгортку і занурюють тампон на 1–2 доби в потік стічних вод. При цьому відбувається попередня концентрація бактерій і вірусів. Потім тампон витягують, переносять у стерильний поліетиленовий мішечок чи стерильну скляну банку і герметично закривають.

Недоліком відбору проб за допомогою марлевих тампонів є неможливість забезпечити необхідну стандартизацію адсорбенту. Проте метод надзвичайно простий, доступний та економічний.

Також можна збирати рідину об'ємом 1 л із загального потоку стічних вод за допомогою батометра у стерильний посуд – флакони з-під середовищ для культури клітин об'ємом 500 мл або матраци для культури клітин об'ємом 1–1,5 л, які заповнюють на 2/3. Стерильний скляний посуд слід відкривати безпосередньо перед відбором проби води. Сполоскувати посуд або торкатися будь-яких предметів пробкою або краями посуду забороняється.

Сучасні очисні споруди оснащені автоматичними пристроями для відбору проб води у скляний посуд з чітко фіксованим інтервалом часу впродовж доби. З отриманих у такий спосіб проб надалі слід готувати змішану пробу і використовувати її для дослідження.

Вода поверхневих і підземних водойм (моря, водосховища, штучні та природні водойми, озера, річки, артезіанські свердловини, криниці). При виборі поверхневих водойм як джерела централізованого господарсько-питного водопостачання або для оцінки санітарного стану місць відпочинку (наприклад, пляжів) за епідеміологічними показниками. Точки для відбору проб води намічають відповідно до рекомендацій Державного стандарту. Проби беруть 1–2 рази на місяць або за схемами, що розробляє Держсанепідемслужба МОЗ України з урахуванням санітарно-гігієнічної та епідемічної ситуації.

Воду з поверхневих водойм збирають за допомогою батометра з плавучих засобів, мостів або помостів. Відбір проб безпосередньо з берега річки або озера не бажаний. Проби беруть із глибини 10–15 см від поверхні води і на рівні 30–50 см від дна. Об'єм однієї проби – 3 л.

Проби води підземних джерел (у тому числі артезіанських свердловин) відбирають після тривалого відкачування до встановлення постійного динамічного рівня в стерильний посуд об'ємом 10 л. Це, як правило, відносно чиста вода, її використовують для водозбірних колонок і водопроводів, тобто це питна вода. Посуд наповнюють водою та щільно закривають стерильною гумовою пробкою або кришечкою.

Питна вода. Проби води централізованого водопроводу беруть для дослідження в розвідній водопровідній мережі за епідеміологічними показаннями згідно з Державним стандартом.

Питну воду відбирають безпосередньо в стерильний посуд без застосування гумових (латексних) шлангів, водорозподільчих сіток або насадок. Перед відбором проб кран кінцевої ділянки периферійної водопостачальної мережі (або відвідний кран на етапі обробки води на водозабірних спорудах) тричі фламбують запаленим спиртовим тампоном і спускають воду впродовж 10–15 хв при повністю відкритому крані. Якщо через відповідний кран вода тече постійно, то відбір проб води проводиться без фламбування, без змін напору води або в самій конструкції крану. Об'єм однієї проби – 10 л. Для нейтралізації залишків хлору в посуд для відбору проб перед стерилізацією додають натрію гіпосульфіт із розрахунку 20 мг/л.

Підготовка проб води для дослідження. Проби стічної води відстоюють у доставлених скляних ємностях 30 хв при 4 °С для очищення від суспендованих твердих часток. Потім верхній шар стічної рідини в об'ємі 1 л відливають і використовують для концентрації вірусів.

Якщо відібрані проби стічної води дуже сильно забруднені твердими відходами, фекаліями або каламутні і мають майже чорний колір, то для прискорення осідання цих домішок проби попередньо центрифугують при

2000–3000 об/хв 20 хв або фільтрують через простерилізований фільтр, виготовлений із фільтрувального паперу або вати. Надосадову рідину або освітлений фільтрат відбирають в об'ємі 1 л і використовують для концентрації вірусів.

Доцільно половину проби стічної води використати для концентрування в ній вірусу, а другу половину зберігати як резерв при 4 °С до успішного завершення етапів концентрації та індикації вірусу.

Проби стічної води, взяті за допомогою марлевих тампонів за Moore, обробляють за методом Ріордана, який ґрунтується на десорбції віріонів із тканини і біологічної плівки тампонів лужними розчинами. Для цього в поліетиленовий мішечок із тампоном додають 10 мл розчину Хенкса (pH 7,4), перемішують, кілька разів стискаючи мішечок ззовні, через 1–2 хв тампон віджимають і викидають.

У віджатій рідині вимірюють pH і доводять до значень 8,0–8,4, використовуючи 1 М розчин NaOH або 1 М розчин HCl. Про значення pH судять за зміною кольору індикаторної смужки. Отриману з кількох тампонів рідину змішують. Із загальної кількості рідини відбирають 100 мл у стерильну широкогорлу центрифужну склянку і центрифугують при 2000–3000 об/хв 20 хв.

Отриману з кількох тампонів рідину змішують до сумарного об'єму 50–200 мл і центрифугують при 3500 об/хв 20 хв. Надосадову рідину заморожують при –20 °С, через добу розморожують і повторно центрифугують. Центрифугат обробляють етиловим ефіром (1:1) 12–20 год при 4 °С, знову центрифугують. При цьому утворюються два шари рідини з кільцем жирової субстанції між ними.

Піпеткою відбирають рідину з дна і переносять у чашку Петрі для звільнення від залишків ефіру. Через 2–2,5 год проби використовують для виділення вірусів або концентрації.

Проби води поверхневих і підземних водойм відстоюють у доставлених скляних ємностях 30 хв при 4 °С. Потім верхній шар води в об'ємі 2 л відливають і використовують для концентрації вірусів.

Концентрація вірусів у пробах води. *Вимоги* до методів концентрації вірусів у пробах води:

- концентрація малої кількості віріонів у великих об'ємах води;
- придатність вірусного концентрату для зараження культури клітин;
- забезпечення відокремлення вірусів від бактеріальних контамінантів.

Методи концентрації вірусів у пробах води поділяються на *3 групи:*

- *фізичні* (ультрацентрифугування, ультрафільтрація, пінна флотація, електрофорез, електроосмос);

• *фізико-хімічні* (осадження амонію сульфатом або алюмінію сульфатом, концентрація поліетиленгліколем, двофазний метод із застосуванням декстрану Т40 і ПЕГ 6000 та ін.);

• *адсорбційні* (адсорбція на марлевих тампонах, активованому вугіллі, природних мінеральних сорбентах – бентоніті, асканіті тощо, на іонообмінних смолах, гідрогелі метилкремнієвої кислоти аміноетоксиаеросилі, поліметилксилоксані, макропористому склі та ін.).

Вибір методу концентрації вірусів у пробах води залежить від багатьох чинників: ступеня забруднення води, чутливості методики, доступності стандартизованого адсорбенту, наявності відповідного обладнання (наприклад, ультрацентрифуг з охолодженням або спеціального обладнання для ультрафільтрації) і навантаження на лабораторію.

Санітарно-вірусологічний моніторинг за забрудненням води (стічної, поверхневих і підземних водойм, питної), як правило, в практичних лабораторіях проводиться за кількома показниками (ентеровіруси, ротавіруси, мастаденовірус людини F, гепатовірус А, коліфаги). Тому доцільно використовувати такий спосіб концентрації та використовувати з цією метою єдиний реактив, який би дав можливість визначати одномоментно кілька вірусів.

Усі роботи, пов'язані з концентрацією та виділенням вірусів, здійснюються за умови дотримання правил безпеки (при роботі зі збудниками III–IV групи патогенності) у повній відповідності до регламентуючих документів.

Концентрація вірусів у пробах стічних вод. Для цього застосовують такі методи: 1) метод марлевих тампонів за Moore; 2) фільтрація крізь фільтри Петрянова; 3) осадження алюмінію сульфатом; 4) адсорбція на ГГМКК; 5) адсорбція на бентоніті.

Метод марлевих тампонів за Moore використовують як для первинного виділення вірусів із потоку стічних вод, так і для первинної концентрації вірусів із доставленої в лабораторію проби води. Поряд із технічною простотою та доступністю методу слід відзначити його невисоку ефективність.

Фільтрація крізь фільтри Петрянова. Фільтр Петрянова фіксують у тримачі Зейтца, через який під тиском 0,5 атм пропускають досліджувану пробу води. Потім фільтр виймають стерильним пінцетом із тримача і кладуть у чашку Петрі. Елюцію віріонів із поверхні фільтра здійснюють за допомогою 1 М розчином NaCl (з розрахунку 2 мл елюючого розчину на 10 $см^2$ фільтра). Фільтр промивають, піпетуючи рідину впродовж 2–3 хв, вірусовмісну рідину зливають у флакон і отримують елюат I. Процедуру

елюції вірусів з фільтру повторюють, елюати I і II об'єднують і деконтамінують. Недоліками методу є швидке засмічення пор фільтра суспендованими частками і неповна десорбція віріонів із його поверхні.

Осадження алюмінію сульфатом. Пробу води підігрівають до 20 °С на водяній бані або в термостаті. До 1 л води додають 2 мл 10 %-го розчину алюмінію сульфату, ретельно перемішують. pH води доводять до значення 5,4–5,8 за допомогою 1 М розчину HCl або 1 М розчину NaOH, витримують при 18–20 °С 4 год, або при 4 °С 18 год. Прозору надосадову рідину обережно зливають, а білий аморфний осад, що містить віруси, переносять у центрифужну склянку або пробірку і центрифугують при 2000 об/хв 10–15 хв. Надосадову рідину знову видаляють, а осад, що став більш щільним, суспендують у 4 мл розчину Хенкса (pH 7,4) або 0,5 М фосфатний буфер (pH 8,2) для елюції вірусів і знову центрифугують. Для подальшого дослідження відбирають вже надосад (елюат), в якому міститься сконцентровані віруси, а осад алюмінія сульфату, звільнений від вірусу, викидають.

Проби води, оброблені алюмінію сульфатом, зберігають при 4 °С, ні в якому разі не заморожуючи їх.

Адсорбція на гідрогелі метилкремнієвої кислоти (ГГМКК). В основі методу лежить принцип фізичної адсорбції на ГГМКК із проб води ротавірусів, ентеровірусів, мастаденовірусу людини F і гепатовірусу А. ГГМКК у пробу води додають з розрахунку 1 г на 0,5 л.

Досліджувані проби води доводять до температури 20°С і pH 5,0 (за допомогою 1 М розчину HCl). До 0,5 л освітленої та підкисленої проби стічної води додають 1 г ГГМКК, ретельно та енергійно струшують вручну (4–5 хв) або автоматично 10–20 хв. Потім проби води розливають у стерильні центрифужні склянки або скляні флакони (з-під живильних середовищ або розчинів для культури клітин об'ємом 250 мл чи 500 мл) і центрифугують при 1000 об/хв упродовж 10–20 хв або відстоюють 14–16 год. Білий осад, який утворився, є дуже легким, нещільним, тому надосадову рідину обережно зливають через край, залишаючи на дні склянки або флакону не тільки осад, а ще й надосад (загальний об'єм 20 мл). Цей залишок струшують, переносять у 2 центрифужні пробірки і повторно центрифугують. На дні пробірки формується щільний осад, а надосад легко видаляють пастерівською піпеткою або дозатором.

До отриманого осаду, що являє собою осаджений комплекс вірус – ГГМКК, у кожну центрифужну пробірку додають 2 мл 0,05 М трис-буферу з pH 8,4 (або 0,05 М фосфатний буфер із pH 8,4) для елюції вірусу з часточок

ГГМКК, легко струшують вручну і залишають за кімнатної температури на 4–5 хв. Потім центрифугують при 2000–3000 об/хв 20 хв. Відбирають у стерильні пробірки надосад (елюат), що є концентратом вірусів (загальний об'єм 4 мл), і використовують для подальшого дослідження.

Процес концентрації вірусів у пробах води за допомогою ГГМКК триває 1,5–2 год.

Адсорбція на бентоніті складається з трьох етапів: 1) адсорбція ентеровірусів на сорбенті в кислому середовищі (1М розчин HCl або ацетатний буфер, pH 4,5–5,0); 2) відмивання (знесолювання) комплексу вірус – бентоніт дистильованою водою; 3) елюція ентеровірусів із лужним трис-буфером (pH 8,5–9,5).

Процес концентрації вірусів триває 2 год. В отриманому концентраті міститься понад 90 % вихідної кількості віріонів ентеровірусів. Концентрат додатково обробляють для деконтамінації супутньої мікрофлори. Метод відзначається високою ефективністю, придатний для концентрації вірусів із води будь-якого ступеня забрудненості.

Концентрація вірусів у пробах води відкритих і підземних водойм. Для цього використовують такі *методи:* 1) фільтрація крізь фільтри Петрянова; 2) осадження алюмінію сульфатом; 3) адсорбція на ГГМКК (до 1 л або 2 л досліджуваної проби додають відповідно 2 або 4 г ГГМКК). Вірусний концентрат деконтамінують і використовують для вірусологічного дослідження.

Концентрація вірусів у пробах питної води. Завдання полягає у виявленні малих кількостей вірусів у великих об'ємах питної води. Для цього використовують такі *методи:* 1) фільтрація крізь фільтри Петрянова; 2) адсорбція на іонообмінних смолах; 3) осадження ПЕГ 6000; 4) адсорбція на бентоніті; 5) адсорбція на ГГМКК (до 10 або 20 л досліджуваної проби додають відповідно 20 або 40 г ГГМКК; тривалість дослідження – до 24 год). Вірусний концентрат деконтамінують і використовують для вірусологічного дослідження.

Деконтамінація вірусного концентрату проводиться в разі виділення вірусу у чутливих лабораторних об'єктах (культури клітин, білі мишенята). Для видалення з вірусного концентрату супутньої мікрофлори матеріал обробляють етиловим ефіром або антибіотиками.

До вірусного концентрату додають етиловий ефір (1:1), ретельно перемішують, флакони герметично закривають гумовими пробками і залишають при 4 °С на 18–24 год. Потім проби центрифугують при 3000 об/хв 20 хв. Утворюються два шари рідини з кільцем жирової субстанції. Піпеткою відбирають водну фазу з дна флаконів, переносять у чашки Петрі або флакони

з ватно-марлевими корками, залишають у витяжній шафі до повного випаровування ефіру.

До вірусного концентрату додають антибіотики – 200–1000 ОД/мл пеніциліну і 200–500 мкг/мл стрептоміцину (залежно від інтенсивності бактеріальної контамінації), витримують за кімнатної температури 1–2 год.

Для досягнення максимального ефекту обидва способи деконтамінації можна поєднувати. Проте слід зазначити, що складно організовані віруси (із суперкапсидною оболонкою) є чутливими до ефіру.

Вірусологічне дослідження. Для індикації та ідентифікації вірусів у досліджуваних концентратах води використовують *ПЛР, ІЕА, ІХА, РНГА* та *ЕМ*. Найбільш доступними для практичної вірусологічної лабораторії методами виявлення ротавірусів А, В і С та мастаденовірусу F є ІЕА, РНГА та ІХА. Інші методи – ПЛР, ЕМ – значно складніші у виконанні, вимагають значних фінансових ресурсів (для придбання високовартісного обладнання, тест-систем, реактивів, підготовки приміщення тощо) і відповідної підготовки персоналу лабораторій.

Вірусні концентрати після деконтамінації використовують для ізоляції вірусів шляхом зараження чутливих лабораторних об'єктів (культури клітин, білі мишенята) та ідентифікації в серологічних реакціях.

Для виділення *ентеровірусів A, B, C* і *D* використовують перещеплювані культури клітин Hep-2, Hela, Vero, RD, L20B. Індикацію ізолятів ентеровірусів проводять за появою на 3–4-ту добу ЦПД: округлення і рефрактильність клітин.

Проби, в яких передбачається присутність ентеровірусу С (збудника поліомієліту), слід перевіряти на двох лініях клітин – L20B і RD. Деякі віруси (зокрема мастаденовірус людини F) можуть спричинити ЦПД у цих культурах клітин, проте вона значно відрізняється від ЦПД ентеровірусу С.

Ентеровіруси виділяють також в організмі новонароджених білих мишенят 1–3-денного віку, яких заражають п/ш і в/ч. На 2–5-ту добу в тварин з'являються ознаки ураження ЦНС (збудження, пригнічення, атаксія, параліч кінцівок), можлива загибель. За гістологічного дослідженні виявляють дистрофічні зміни в ЦНС, печінці, міокарді, підшлунковій залозі.

Ідентифікацію виділеного вірусу проводять у РН (у культурі клітин і на білих мишенятах), використовуючи специфічні сироватки.

При виділенні *ентеровірусу С* необхідно провести диференціацію вакцинних і вірулентних штамів. Для цього використовують генетичні маркери, що корелюють із вірулентністю ентеровірусу С, а саме:

- нездатність розмножуватися при 40 °С;
- зниження репродукції за низької концентрації в живильному середовищі натрію гідрокарбонату;
- малі розміри бляшок у культурі клітин (до 1,5 мм);
- нижча терморезистентність при 56 °С упродовж 30 хв;
- ступінь адсорбції на бентоніті.

Виділення *мастаденовірусу людини F* проводять у перещеплюваних культурах клітин Нер-2, Hela, КВ, L-41, Vero, диплоїдній культурі клітин нирок ембріона людини. ЦПД проявляється на 2–4-ту добу і характеризується округленням клітин та утворенням скупчень у вигляді виноградного грона.

Важко культивуються *ротавіруси A, B і C* (у перещеплюваній лінії МА-104), *гепатовірус А* (в перещеплюваних лініях FRhK-4, FRhK-6), *коронавіруси* (в органній культурі кишечнику ембріона людини) і *мамастровіруси* (в перещеплюваній лінії Т84). Поки що не знайдені чутливі культури клітин для *каліцівірусів* (віруси Саппоро і Норволк).

Для ідентифікації ізолятів використовують РН (у культурі клітин за пригніченням ЦПД або бляшок, на білих мишенятах), за відсутності інфекційного ефекту – РІФ, ІЕА.

Під час санітарно-вірусологічного дослідження проб води різних видів водокористування перевагу віддають кількісним методам виявлення вірусів. Це дає змогу оцінити ступінь контамінації досліджуваного об'єкта вірусами та ефективність роботи очисних споруд. Окрім того, визначення інфекційного титру вірусу необхідне для його серологічної ідентифікації. Титрування вірусів здійснюють за методом Ріда – Менча і бляшкоутворенням, титр вірусу визначають відповідно у $ТЦД_{50}$/мл, $ЛД_{50}$/мл і БУО/мл.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Назвіть основні об'єкти та етапи санітарно-вірусологічного дослідження води. **2.** Як здійснюють відбір проб води для санітарно-вірусологічного дослідження? **3.** Як проводять підготовку проб води для санітарно-вірусологічного дослідження? **4.** Назвіть методи концентрації вірусів у пробах води і деконтамінації вірусного концентрату. **5.** Як здійснюють ізоляцію вірусів із проб води та їхню наступну ідентифікацію? **6.** Як проводять диференціацію вакцинних і вірулентних штамів ентеровірусу С, виділеного з проб води?

ТЕМА 4.3. САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ҐРУНТУ ТА ОСАДУ СТІЧНИХ ВОД

Ґрунт є важливим фактором поширення патогенних для людини кишкових вірусів, зокрема, *ентеровірусів A, B, C* і *D, гепатовірусу A, ротавірусів A, B* і *C* та *мастаденовірусу людини F*. Унаслідок широкого використання господарсько-побутових стічних вод для поливання сільськогосподарських угідь віруси потрапляють у ґрунт і на вирощувані овочеві культури. У зв'язку з цим важливе значення має систематичний санітарно-вірусологічний контроль за станом ґрунту населених пунктів, неблагополучних щодо ентеровірусних та інших інфекцій.

Етапи санітарно-вірусологічного дослідження ґрунту та осаду стічних вод (рис. 4.2):

- відбір проб;
- підготовка проб до дослідження;
- концентрація вірусів;
- деконтамінація вірусного концентрату;
- вірусологічне дослідження.

Відбір проб ґрунту для санітарно-вірусологічного дослідження проводиться за епідеміологічними показаннями. При цьому епідеміолог складає схематичний план досліджуваної земельної ділянки, обов'язково зазначаючи місцезнаходження джерела забруднення. Якщо площа ділянки не перевищує 100 м^2, вибирають для дослідження дві ділянки: одну – віддалену від джерела забруднення (контрольну), другу – неподалік джерела забруднення. Площа кожної ділянки становить 5 × 5 м^2. У разі відбору проб з ігрових майданчиків або з пісочниць у дитячих закладах площа ділянки становить 2 × 2 м^2. Зразки ґрунту (по 300–500 г) беруть у 5 точках за методом «конверта» на глибині близько 20–25 см. Відбирають проби спеціальними бурами або стерильними совками в стерильний посуд чи поліетиленові мішки.

Проби осаду стічних вод (мулові ставки, ділянки, відстійники) беруть у 4 точках у стерильний посуд (загальний об'єм 500 г).

Після відбору проби ґрунту та осаду стічних вод маркують, надсилають у лабораторію і зберігають до початку дослідження при 4 °С. Досліджувати проби треба впродовж 18–24 год.

Обробка проб ґрунту та осаду стічних вод. Із відібраних проб ґрунту кожної ділянки шляхом усереднення залишають 500 г, з яких для дослідження беруть наважку 10 г.

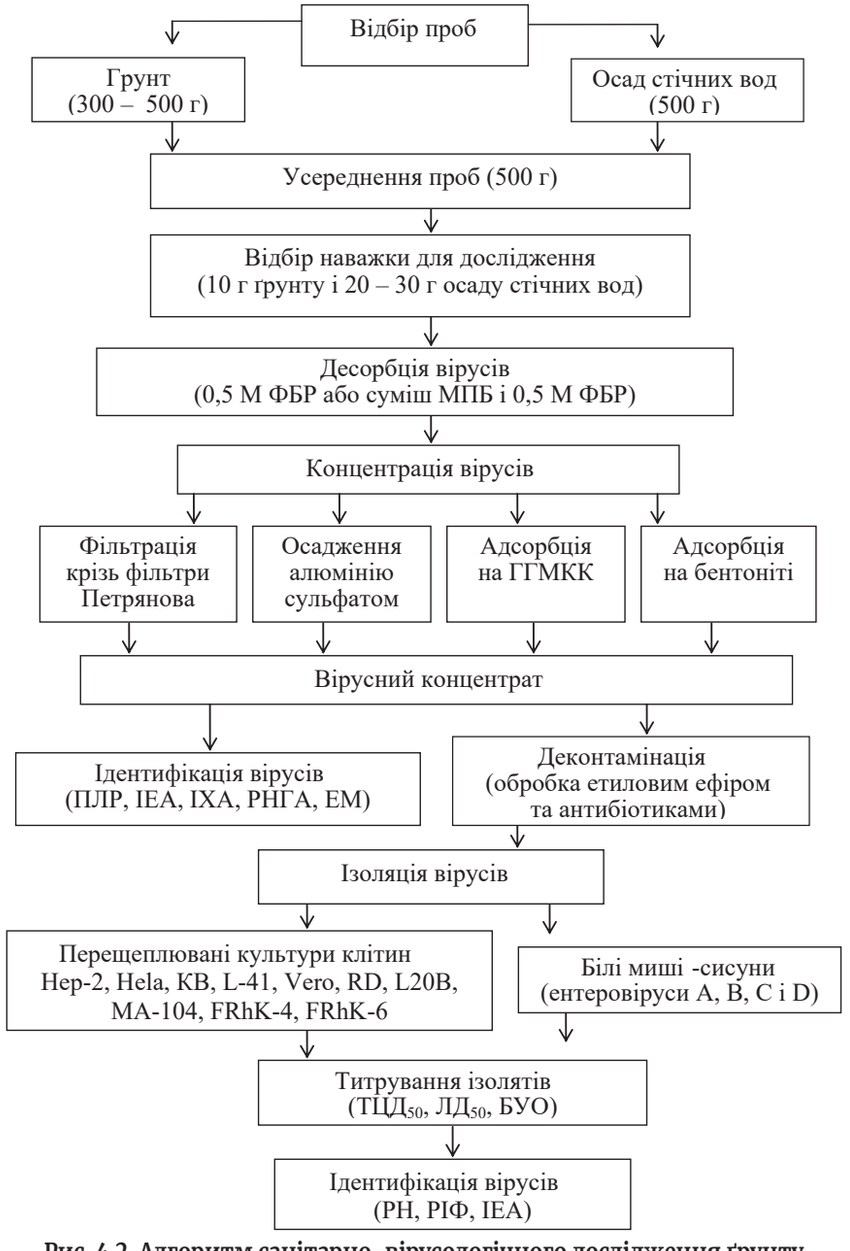


Рис. 4.2. Алгоритм санітарно-вірусологічного дослідження ґрунту та осаду стічних вод

Осад стічних вод (500 г) старанно перемішують і відбирають для дослідження наважку 20–30 г.

Десорбція вірусів. До наважки ґрунту додають 20 мл елюючого розчину (0,5 М ФБР; pH 8,2). Флакони з наважками вміщують у шейкер і струшують 10 хв, а потім центрифугують 20 хв при 3000 об/хв. Надосадову рідину відбирають і використовують для подальшої обробки.

До наважки осаду стічних вод додають елюючий розчин (суміш МПБ і 0,5 М ФБР 9:1, pH 8,6–8,8) із розрахунку 1:10. Проби струшують у шейкері, а потім центрифугують. Надосадову рідину відбирають і використовують для наступної обробки.

Концентрацію вірусів із рідкої фази ґрунту та осаду стічних вод проводять так само, як і під час дослідження води: 1) фільтрування через фільтри Петрянова; 2) осадження алюмінію сульфатом; 3) адсорбція на ГГМКК; 4) адсорбція на бентоніті.

Деконтамінацію вірусного концентрату здійснюють шляхом обробки етиловим ефіром та антибіотиками, так само як і води.

Вірусологічне дослідження. Для індикації та ідентифікації вірусів у досліджуваних концентратах ґрунту й осаду стічних вод використовують ПЛР, ІЕА, ІХА, РНГА та ЕМ. Виділення вірусів із наступною ідентифікацією ізолятів проводять так само, як і за санітарного-вірусологічного дослідження води, використовуючи перещеплювані культури клітин і новонароджених білих мишенят.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Назвіть етапи санітарно-вірусологічного дослідження ґрунту та осаду стічних вод. **2.** Як здійснюють відбір проб ґрунту й осаду стічних вод та підготовку їх для санітарно-вірусологічного дослідження? **3.** Опишіть методи концентрації вірусів із рідкої фази ґрунту й осаду стічних вод стічних вод та деконтамінації вірусного концентрату. **4.** Як здійснюють ізоляцію вірусів із проб ґрунту й осаду стічних вод та їхню наступну ідентифікацію?

ТЕМА 4.4. САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ПОВІТРЯ

Головне джерело забруднення повітря респіраторними вірусами – це хворі люди або латентні вірусоносії, які виділяють збудників інфекцій за

кашлю, чхання або розмови. До респіраторних вірусів належать: 1) віруси грипу A, B і C із родини *Orthomyxoviridae*; 2) респіровіруси людини 1 і 3, орторубулавіруси людини 2 і 4 з родини *Paramyxoviridae*; 3) ортопневмовірус і метапневмовірус людини з родини *Pneumoviridae*; 4) мастаденовіруси людини A, B і C із родини *Adenoviridae*; 5) коронавіруси людини 229E, NL63 і HKU1, бетакоронавірус 1, MERS-CoV, SARS-CoV і SARS-CoV-2 із родини *Coronaviridae*; 6) ентеровіруси B і D, риновіруси A, B і C із родини *Picornaviridae*.

Незважаючи на невисоку стійкість респіраторних вірусів, за постійного надходження їх у повітря закритих приміщень і значного скупчення людей створюється потенційно небезпечна епідеміологічна ситуація.

Санітарно-вірусологічне дослідження повітря проводять за епідеміологічними показаннями, насамперед у дитячих дошкільних, шкільних і лікувально-профілактичних закладах. Місце взяття проб та їхню кратність визначає епідеміолог. Ізолювати віруси з повітря закритих приміщень досить складно через їхню низьку концентрацію.

Етапи санітарно-вірусологічного дослідження повітря (рис. 4.3):

- відбір проб;
- концентрація вірусів;
- деконтамінація вірусного концентрату;
- вірусологічне дослідження.

Відбір проб повітря. Проби повітря закритого приміщення беруть у 3 точках на висоті 1–1,5 м над підлогою (не менш як 1 л) за допомогою спеціальних приладів. ПОВ-1 (прилад для відбору повітря) має низьку пропускну здатність – 20–25 л/хв. Тому доцільніше використовувати ПАБ-1 (пробовідбирач аерозольний бактеріологічний), пропускна здатність якого – 150–250 л/хв, тобто за 1 год можна відібрати близько 6 м^3 повітря. Як уловлювальне середовище в обох приладах застосовують гідролізат лактоальбуміну, МПБ, збиране молоко або середовище 199 з 6 % розчину декстрану (поліглюкіну).

Для відбору проб повітря використовують також БВЕП-1 (бактерійно-вірусний електропреципітатор). Дія приладу базується на аспіраційно-іонізаційному принципі. Він складається з осаджувальної камери, в яку вмонтовані два електроди: 1) негативний у вигляді трубки, через яку надходить повітря, що призводить до набуття частками аерозолю негативного заряду; 2) позитивний, на якому осідають віріони.

Концентрація вірусів. Проби повітря, що взяті в одному приміщенні, об'єднують. Концентрують віруси за допомогою поліетиленгліколю (ПЕГ 4000 або ПЕГ 6000), який вносять у кожну пробірку з уловлювальним

середовищем (до помутніння). Суміш струшують 2 хв і центрифугують при 1500 об/хв 20–30 хв або залишають у холодильнику (4 °С) на добу.

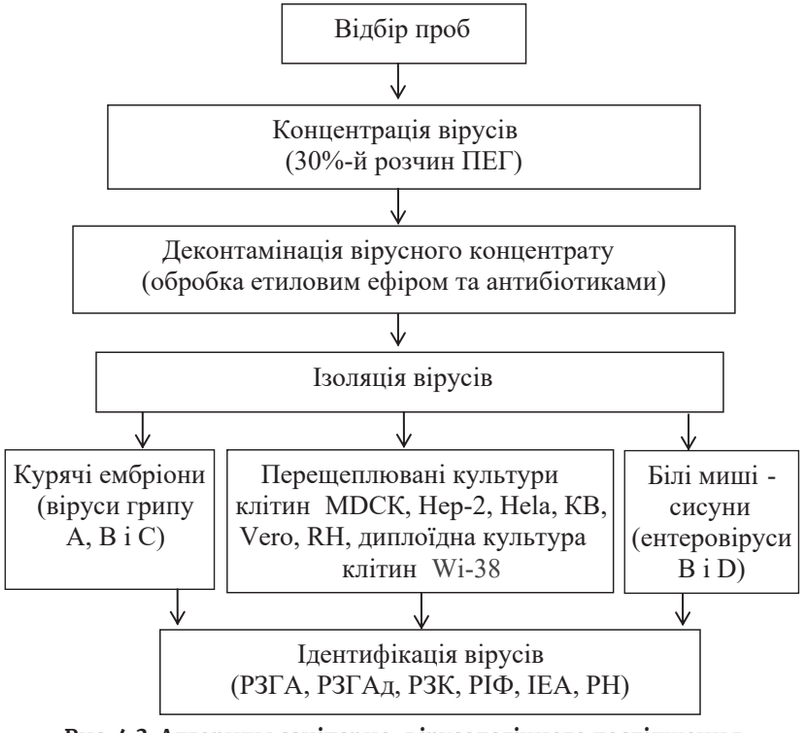


Рис. 4.3. Алгоритм санітарно-вірусологічного дослідження повітря закритих приміщень

У пробірці утворюються два шари рідини, розділені прозорим суміжним кільцем. Верхній шар рідини відсмоктують піпеткою. Віріони знаходяться в нижньому та суміжному шарі. Цю частину проби **деконтамінують** (див. стор. 210) шляхом обробки етиловим ефіром та антибіотиками або тільки антибіотиками (залежно від виду вірусу) і використовують для ізоляції вірусів.

Для концентрації вірусів із повітря, крім уловлювальних середовищ, можна застосовувати мембранні фільтри № 4 або фільтри Петрянова. З поверхні фільтрів віруси змивають рідким середовищем з антибіотиками.

Вірусологічне дослідження. Ізоляцію вірусів проводять у перещеплюваних лініях: 1) *MDCK* (віруси грипу A, B і C); 2) *Vero* (респіровіруси

людини 1 і 3, орторубулавіруси людини 2 і 4, метапневмовірус людини, мастаденовіруси людини A, B і C, риновіруси A, B і C); 3) *Hep-2, HeLa, KB, RH* (респіровіруси людини 1 і 3, орторубулавіруси людини 2 і 4, ортопневмовірус людини, ентеровірус B, мастаденовіруси людини A, B і C, ентеровіруси B і D).

Окрім того, чутливою лабораторною моделлю для виділення вірусів грипу A, B і C є 9–11-денні курячі ембріони (зараження в амніотичну та алантоїсну порожнини), а для ентеровірусів B і D – новонароджені білі мишенята (зараження п/ш, в/ч).

Респіраторні коронавіруси людини виділяють в органній культурі клітин трахеї ембріона людини і диплоїдній культурі клітин Wi-38.

Ідентифікацію ізолятів проводять у різних серологічних реакціях (залежно від виду вірусу): РЗГА, РЗГАд, РЗК, РІФ, ІЕА, РН.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Назвіть етапи санітарно-вірусологічного дослідження повітря. **2.** Як проводять відбір проб повітря для санітарно-вірусологічного дослідження? **3.** Розкажіть про методи концентрації вірусів у пробах повітря. **4.** Як здійснюють деконтамінацію вірусного концентрату? **5.** Як проводять ізоляцію вірусів із проб повітря та їхню наступну ідентифікацію?

ТЕМА 4.5. САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗМИВІВ ІЗ ПРЕДМЕТІВ ПОБУТУ

Предмети побуту можуть бути контаміновані збудниками респіраторних і кишкових вірусних інфекцій людини. Тривалість виживання вірусів на предметах побуту створює можливість інфікування людей, особливо дітей у дошкільних і шкільних закладах. Тому за епідеміологічними показаннями в цих закладах проводять дослідження для виявлення *вірусів грипу A, B* і *C, респіровірусів людини 1* і *3, ортопневмовірусу людини, мастаденовірусів людини A, B, C* і *F* та *ентеровірусів A, B, C* і *D.*

Етапи санітарно-вірусологічного дослідження змивів із предметів побуту (рис. 4.4):

- відбір проб;
- підготовка проб до дослідження;
- концентрація вірусів;

- деконтамінація вірусного концентрату;
- вірусологічне дослідження.

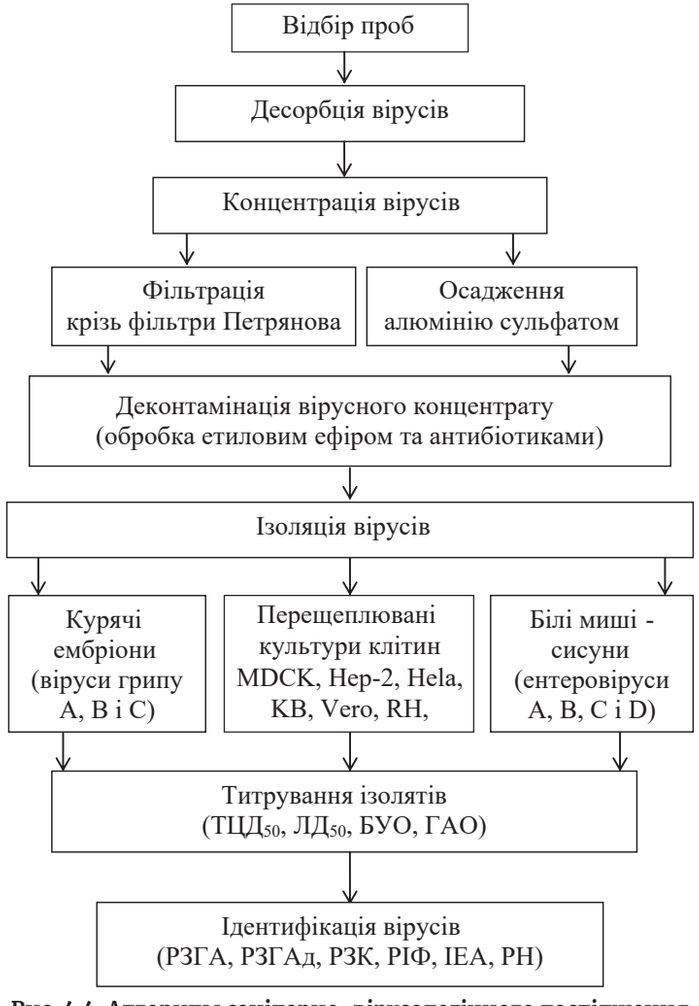


Рис. 4.4. Алгоритм санітарно-вірусологічного дослідження змивів із предметів побуту

Відбір проб змивів. Змиви беруть із стін, підлог, підвіконь, столів, дверних ручок, іграшок за допомогою стерильних марлевих серветок розміром 5 × 10 см, які перед використанням обробляють за наступною *методикою.*

Спочатку їх кип'ятять упродовж 5 хв у 5%-му розчині $NaHCO_3$, потім промивають у 0,3%-му розчині H_2SO_4, знову кип'ятять 5 хв у дистильованій воді й залишають на добу в новій порції дистильованої води. Після цього серветки висушують, складають у 3–4 шари і стерилізують автоклавуванням.

Для взяття змиву з предмета стерильну серветку змочують 5 мл ФБР, протирають нею поверхні предметів площею 100 $см^2$ (столи, підвіконня, підлоги тощо) або іграшки, столові прибори. Потім серветку вміщують у пробірку із залишками ФБР, закривають гумовим корком і доставляють у лабораторію в термосі з льодом.

Десорбція вірусів. У стерильних умовах тампон виймають із пробірки, пінцетом старанно віджимають рідину в чашку Петрі. Звідти її зливають у пробірку із залишками ФБР.

Концентрацію вірусів проводять методом фільтрації крізь фільтри Петрянова або осадженням алюмінію сульфатом (див. стор. 248, 249).

Деконтамінацію вірусного концентрату здійснюють шляхом обробки етиловим ефіром та антибіотиками (див. стор. 250).

Вірусологічне дослідження. Виділення вірусів проводять у перещеплюваних лініях *MDCK* (віруси грипу A, B і C), *Vero* (респіровіруси людини 1 і 3, мастаденовіруси людини A, B, C і F), *Hep-2, HeLa, KB, RH* (ортопневмовірус людини, ентеровіруси A, B, C і D, мастаденовіруси людини A, B, C і F).

Окрім того, чутливою лабораторною моделлю для виділення вірусів грипу A, B і C є 10–11-денні курячі ембріони (зараження в амніотичну та алантоїсну порожнини), а для ентеровірусів B і D – новонароджені білі мишенята (зараження п/ш, в/ч).

Ідентифікацію ізолятів проводять у різних серологічних реакціях (залежно від виду вірусу): РЗГА, РЗГАд, РЗК, РІФ, ІЕА, РН.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Назвіть етапи санітарно-вірусологічного дослідження змивів із предметів побуту. **2.** Як проводять відбір змивів із предметів побуту для санітарно-вірусологічного дослідження? **3.** Розкажіть про методи концентрації вірусів у пробах змивів із предметів побуту та деконтамінації вірусного концентрату. **4.** Як проводять ізоляцію вірусів із проб змивів із предметів побуту та їхню наступну ідентифікацію?

ТЕМА 4.6. САНІТАРНО-ВІРУСОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ХАРЧОВИХ ПРОДУКТІВ

Харчові продукти відіграють істотну роль у поширенні таких вірусних інфекцій, як *гепатит A, рота-, каліци-, астро-* та *ентеровірусні інфекції.*

Залежно від симптомів захворювання віруси, що передаються через харчові продукти, можна поділити на три групи: 1) збудники гастроентеритів – віруси Саппоро і Норволк із родини *Caliciviridae*; ротавіруси A, B і C із родини *Reoviridae*; мамастровіруси 1, 6, 8 і 9 із родини *Astroviridae*; 2) гепатовірус A із родини *Picornaviridae* (з реплікацією в печінці); 3) віруси з реплікацією в кишечнику людини, які після генералізації інфекції уражають ЦНС, – ентеровіруси B і C із родини *Picornaviridae*.

Санітарно-вірусологічне дослідження харчових продуктів проводиться за епідеміологічними показаннями з метою встановлення етіології масових захворювань людей унаслідок аліментарного зараження. Місце відбору проб, вид їх і кратність відбору визначає епідеміолог.

Етапи санітарно-вірусологічного дослідження харчових продуктів (рис. 4.5):

- відбір проб;
- підготовка проб до дослідження;
- концентрація вірусів;
- деконтамінація вірусного концентрату;
- вірусологічне дослідження.

Проби харчових продуктів доставляють в лабораторію в максимально короткий термін (не більше 6 год). Доставлений матеріал бажано негайно обробити. Як виняток допускається його зберігання за температури 4 °C не більше 12 год або при –20 °C не більше тижня.

Дослідження рідких харчових продуктів (*молоко, молочнокислі продукти тощо).* Із тари великої місткості після перемішування відбирають у стерильний посуд 200–300 мл рідкого харчового продукту і надсилають у лабораторію в сумці-холодильнику.

Молоко та молочні продукти обробляють одним із методів для ***видалення білків, ліпідів та екстракції вірусів.***

1. До 10 мл продукту додають 0,3 г натрію цитрату, перемішують на магнітній мішалці 20 хв. Потім додають 10 мл фреону-113 і гомогенізують 2 хв. Гомогенізат центрифугують при 3000 об/хв 30 хв. Надосадову рідину і використовують для концентрації вірусів.

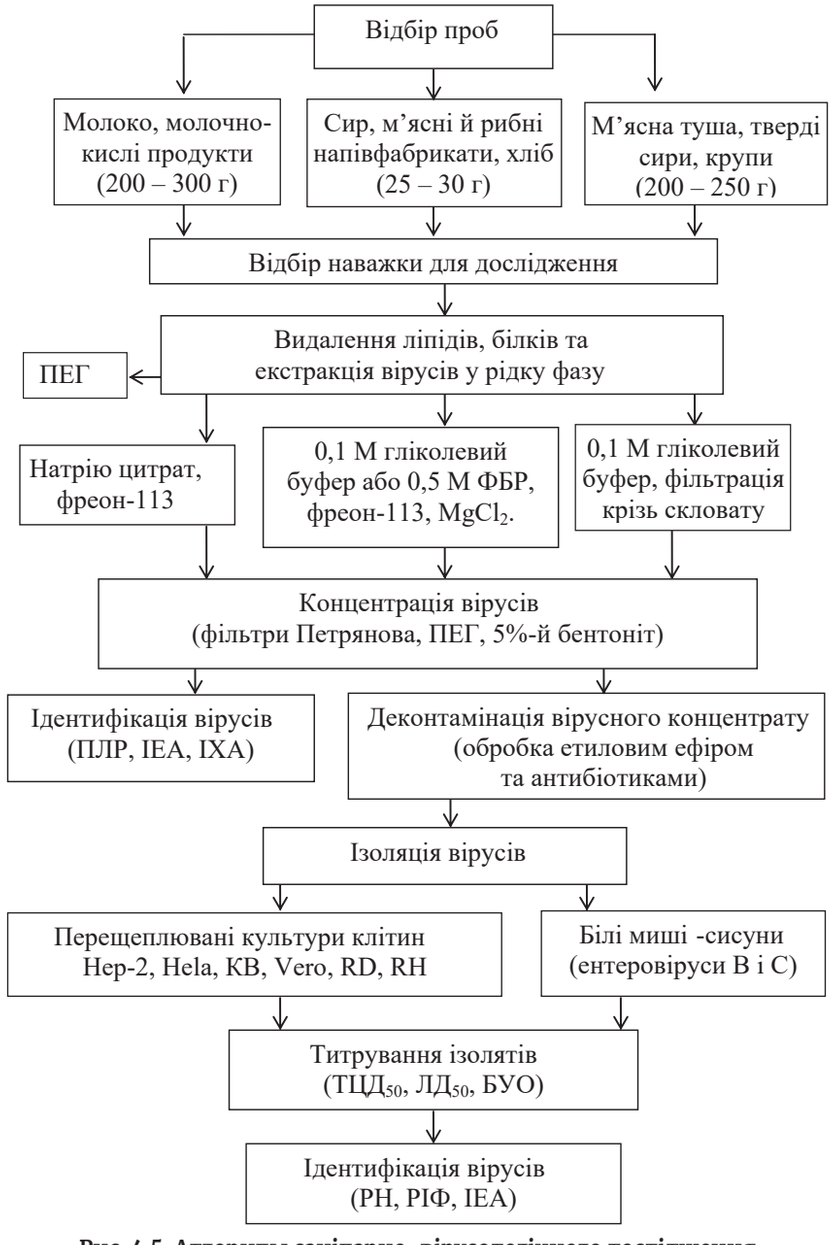


Рис. 4.5. Алгоритм санітарно-вірусологічного дослідження харчових продуктів

2. До 100 мл продукту додають 5 г ПЕГ 4000 або ПЕГ 6000 та 1,82 г NaCl. Флакон струшують до розчинення інгредієнтів і витримують 1 год при 4 °С, потім центрифугують при 3000 об/хв 10 хв. Надосадову рідину зливають, а осад використовують для *екстракції вірусів* у рідку фазу так само, як із густих молочних продуктів, м'ясних і рибних напівфабрикатів та хліба (див. далі).

Дослідження напівтвердих молочних харчових продуктів, м'ясних і рибних напівфабрикатів та хліба. Напівтверді харчові продукти беруть по 25–30 г від кожного зразка, вміщують у стерильний посуд або фольгу і доставляють у лабораторію. Спочатку проводять ***екстракцію вірусів*** одним із зазначених методів.

1. У стерильний флакон гомогенізатора вміщують 25 г продукту, додають по 25 мл 0,5 М ФБР, pH 8,2 (або 0,1 М розчину гліколевого буфера, pH 8,8 при дослідженні сиру, сметани та хліба) і фреону-113 та 0,5 г $MgCl_2$. Для гомогенізації суміш центрифугують при 4000–8000 об/хв 3 хв, потім – при 35000 об/хв 30 хв. Верхній шар надосадової рідини використовують для концентрації вірусів. Якщо надосадова рідина каламутна, її ще раз обробляють фреоном-113.

2. У стерильну колбу вміщують 25 г продукту і 100 мл 0,1 М гліколевого буфера (pH 8,8). Колбу струшують у шейкері 5 хв і витримують при 4 °С 15 хв. Надосадову рідину фільтрують через лійку із скловатою, застосовуючи водоструменевий або вакуумний насос. Фільтрат використовують для концентрації вірусів.

Санітарно-вірусологічне дослідження твердих харчових продуктів. Проби твердих харчових продуктів *(м'ясні туші, сири, крупи тощо)* беруть із розрахунку 200–250 г на кожний зразок. У лабораторії з кожного зразка відбирають для дослідження наважку масою 30 г.

Для *екстракції вірусів* до наважки додають 100 мл 0,5 М ФБР (pH 8,2) або 0,1 М гліколевого буфера (pH 8,8). Колбу із сумішшю струшують у шейкері 20 хв, а потім відстоюють при 4 °С 15 хв. Надосадову рідину фільтрують через лійку із скловатою. Фільтрат використовують для концентрації вірусів, яку проводять так само, як і концентрацію з екстрактів напівтвердих харчових продуктів.

Санітарно-вірусологічне дослідження овочів, фруктів і зелені (рис. 4.6). Овочі, фрукти і зелень відбирають для дослідження стерильним пінцетом із площі 1 м^2 у 5 точках за методом «конверта» (по 1–2 зразки з кожної точки). Проби з однієї ділянки об'єднують. Вага об'єднаного зразка становить для овочів – 2 кг, фруктів – 1 кг і зелені – 0,5 кг. Проби упаковують у поліетиленовий пакет або стерильну фольгу і доставляють у лабораторію.

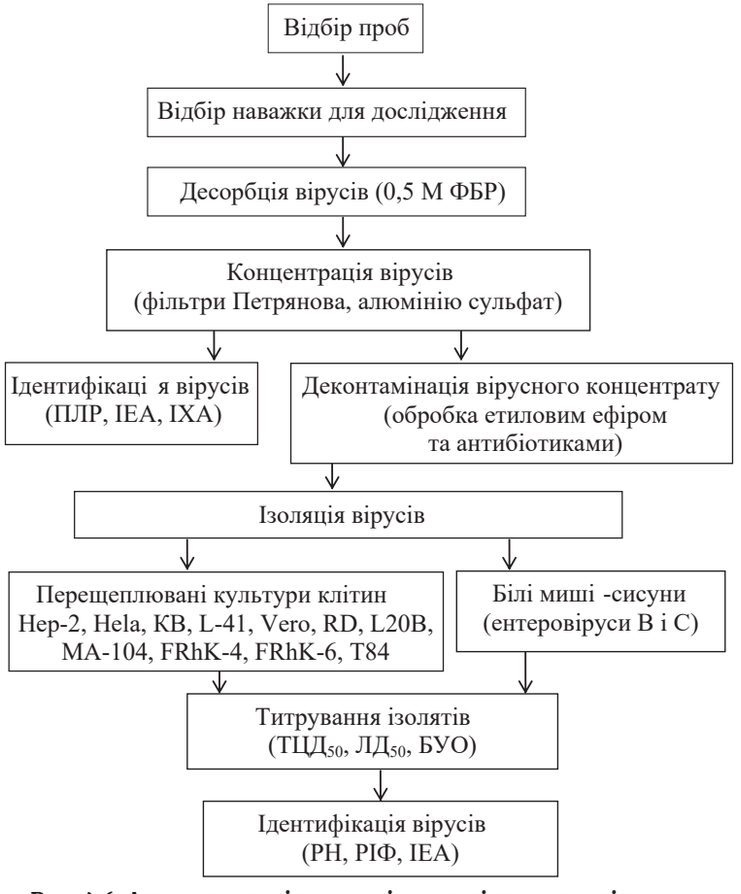


Рис. 4.6. Алгоритм санітарно-вірусологічного дослідження овочів, фруктів і зелені

Для *десорбції віріонів вірусів* 2–3 зразки продукту з однієї об'єднаної проби вміщують у стерильну широкогорлу колбу, додають 100 мл 0,5 М ФБР (pH 8,2) або 0,1 М розчину гліцинового буфера (pH 8,8), закривають отвір стерильною фольгою і струшують у шуттель-апараті 5 хв. Потім рідину зливають у флакон і центрифугують при 3000 об/хв 20 хв. Надосадову рідину використовують для концентрації вірусів.

Концентрацію вірусів із харчових екстрактів проводять шляхом фільтрації крізь фільтри Петрянова, обробкою бентонітом, поліетиленгліколем або осадженням алюмінію сульфатом (див. стор. 248).

Концентрація поліетиленгліколем. До екстракту харчового продукту додають ПЕГ 4000 або ПЕГ 6000 до його кінцевої концентрації 10 %, а потім – сухий NaCl до отримання 0,5 М розчину.

Флакон із вмістом струшують 2 хв до повного розчинення інгредієнтів і витримують при 4 С 1 год. Потім досліджуваний матеріал центрифугують при 3000 об/хв 15 хв. Надосадову рідину видаляють, а осад ресуспендують у 2 мл розчину Хенкса або Ерла.

Деконтамінацію вірусного концентрату проводять шляхом обробки етиловим ефіром та антибіотиками.

Вірусологічне дослідження. Для індикації та ідентифікації вірусів у досліджуваних концентратах харчових продуктів використовують ПЛР, ІЕА та ІХА. Виділення вірусів із наступною ідентифікацією ізолятів проводять так само, як і за санітарного-вірусологічного дослідження води, використовуючи перещеплювані культури клітин і новонароджених білих мишенят.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Назвіть етапи санітарно-вірусологічного дослідження харчових продуктів. **2.** Як проводять відбір проб харчових продуктів тваринного і рослинного походження для санітарно-вірусологічного дослідження? **3.** Розкажіть про методи концентрації вірусів у пробах харчових продуктів та деконтамінації вірусного концентрату. **4.** Як проводять ізоляцію вірусів із проб харчових продуктів та їхню наступну ідентифікацію?

Висновки

1. Основними контамінантами об'єктів довкілля і харчових продуктів є патогенні для людини віруси: 1) ентеровіруси А, В, С і D та гепатовірус А з родини *Picornaviridae*; 2) ротавіруси А, В і С із родини *Reoviridae*; 3) мастаденовіруси людини А, В, С, D, Е, F і G із родини *Adenoviridae*; 4) бетакоронавірус 1, коронавіруси людини 229Е, NL63, HKU1 із родини *Coronaviridae*; 5) риновіруси А, В і С із родини *Picornaviridae*; 6) віруси Саппоро і Норволк із родини *Caliciviridae*; 7) мамастровіруси 1, 6, 8 і 9 із родини *Astroviridae.*

2. Основні об'єкти санітарно-вірусологічного дослідження: 1) стічні води; 2) вода відкритих і підземних водойм для господарсько-побутових потреб; 3) питна вода; 4) ґрунт та осад стічних вод; 5) повітря дитячих дошкільних, шкільних і лікувально-профілактичних закладів; 6) харчові продукти.

3. Санітарно-вірусологічне дослідження об'єктів довкілля і харчових продуктів включає такі етапи: 1) відбір проб з об'єктів довкілля і харчових продуктів; 2) підготовка проб до дослідження; 3) концентрація вірусів; 4) деконтамінація вірусного концентрату; 5) вірусологічне дослідження.

4. Для швидкої ідентифікації вірусів безпосередньо в досліджуваних пробах з об'єктів довкілля (вода, ґрунт, осад стічних вод) і харчових продуктів використовують експрес-методи: 1) індикація вірусних нуклеїнових кислот у ПЛР; 2) ідентифікація вірусних антигенів методами ІЕА, ІХА та РНГА; 3) виявлення віріонів вірусів методом ЕМ.

5. Ізоляцію вірусів із досліджуваних проб проводять шляхом зараження чутливих біологічних об'єктів – білих мишенят (ентеровіруси), курячих ембріонів (віруси грипу) або перещеплювані культури клітин (найчастіше Hep-2, Hela, KB, L-41, Vero, RD, L20B, MDCK, RH). Ідентифікацію виділених вірусів здійснюють у серологічних реакціях – РН, РІФ, ІЕА, РЗГА, РЗГАд, РЗК.

Розділ V
СПЕЦІАЛЬНА ВІРУСОЛОГІЯ

Навчальні цілі розділу: знати основні властивості вірусів – збудників актуальних вірусних інфекцій тварин; мати чітке уявлення про епізоотологічні особливості, патогенез, клінічні симптоми і патологоанатомічні зміни за вірозів тварин; засвоїти методи лабораторної діагностики та засоби імунопрофілактики вірозів тварин.

ТЕМА 5.1. ДНК-ГЕНОМНІ ВІРУСИ

5.1.1. Родина *Poxviridae* (поксвіруси)

Згідно з інформацією МКТВ (2020), родина *Poxviridae* (від англ. pox – віспа, пустула) об'єднує 52 види вірусів хребетних, які входять в 1 підродину і 18 родів.

Підродина *Chordopoxvirinae* (18 родів): **1.** Рід *Avipoxvirus* (10 видів): віруси віспи курей*, індиків, голубів, перепілок, канарок, горобців, шпаків, папуг, юнко, майн. **2.** Рід *Capripoxvirus* (3 види): віруси віспи овець*, кіз, нодулярного дерматиту. **3.** Рід *Centapoxvirus* (1 вид): вірус віспи Йока*. **4.** Рід *Cervidpoxvirus* (1 вид): вірус віспи мулів та оленів*. **5.** Рід *Crocodylidpoxvirus* (1 вид): вірус віспи нільських крокодилів*. **6.** Рід *Leporipoxvirus* (4 види): віруси міксоми*, фіброми кролів, зайців, вивірок. **7.** Рід *Macropopoxvirus* (2 види): віруси віспи гігантських кенгуру*, західних сірих кенгуру. **8.** Рід *Molluscipoxvirus* (1 вид): вірус контагіозного молюска*. **9.** Рід *Mustelpoxvirus* (1 вид): вірус віспи каланів*. **10.** Рід *Orthopoxvirus* (10 видів): віруси вісповакцини*, натуральної віспи, віспи корів, верблюдів, мавп, єнотів, скунсів, африканських піщанок, полівок, ектромелії. **11.** Рід *Oryzopoxvirus* (1 вид): вірус Котія*. **12.** Рід *Parapoxvirus* (4 види): віруси орф*, псевдовіспи корів, папульозного стоматиту великої рогатої худоби, парапоксвірус новозеландських благородних оленів. **13.** Рід *Pteropopoxvirus* (1 вид): вірус віспи криланів*. **14.** Рід *Salmonpoxvirus* (1 вид): вірус віспи зябр лососів*. **15.** Рід *Sciuripoxvirus* (1 вид): вірус віспи вивірок*. **16.** Рід *Suipoxvirus* (1 вид): вірус віспи свиней*. **17.** Рід *Vespertilionpoxvirus* (1 вид): вірус віспи кажанів*. **18.** Рід *Yatapoxvirus* (2 види): віруси пухлин мавп Яба*, віспи Тана.

* Типовий вид.

Основні ознаки. Віріони більшості поксвірусів хребетних мають форму цеглини із заокругленими кутами, розміром (300...450) × (170...260) нм. Виняток становлять представники роду *Parapoxvirus*, віріони яких овоїдної форми, розміром (220...300) × (140...170) нм.

Структура віріона. На відміну від інших ДНК-вмісних вірусів, поксвірусам не властива ікосаедральна симетрія, будова їх складна (рис. 5.1). Віріон складається із зовнішньої оболонки з трубчастими ворсинками, яка має ліпопротеїнову природу і синтезується в цитоплазмі заражених клітин. Зовнішня оболонка оточує серцевину (нуклеоїд) у вигляді двовгнутого диска (фігура вісімки). По боках серцевини в місцях угинань розташовані овальні структури – латеральні тільця. Серцевина містить дволанцюгову ДНК із мол. масою 85–250 МДа, асоційовану з трьома протеїнами. Оболонка серцевини складається з внутрішньої гладкої мембрани і зовнішнього шару з циліндричних субодиниць.

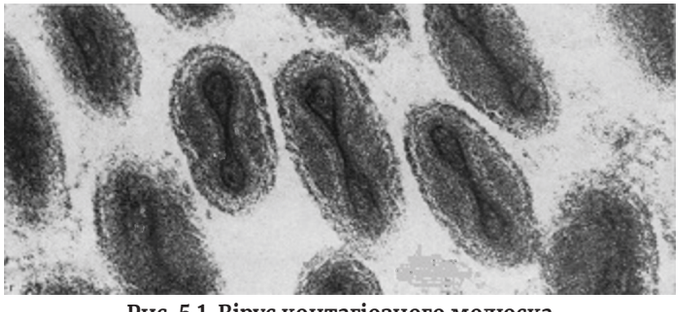


Рис. 5.1. Вірус контагіозного молюска
(Биковський А.Ф. та ін., 1983)

Поксвіруси містять близько 100 структурних протеїнів, у тому числі 15 ензимів, включаючи ДНК-залежну РНК-полімеразу (транскриптазу). *Хімічний склад* (вірусу вісповакцини): ДНК – 3 %, протеїни – 90 %, ліпіди – 4 %, вуглеводи – 3 %.

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом злиття зовнішньої оболонки з плазмолемою або рецепторного ендоцитозу. У цитоплазмі відбувається транскрипція вірусного геному (за участю вірусної транскриптази), реплікація (за участю синтезованої ДНК-полімерази) і формування віріонів. Зрілі віріони транспортуються до плазмолеми через комплекс Гольджі та виходять із клітини шляхом екзоцитозу або після її лізису. Цикл репродукції триває 6–7 год.

Вірус нодулярного дерматиту
(Infectious nodular dermatitis virus)

Нодулярний дерматит *(шкірна бугорчатка, заразний вузликовий дерматит, вузликова екзантема ВРХ)* – висококонтагіозна інфекційна хвороба великої рогатої худоби, яка проявляється гарячкою, ураженням лімфатичної системи, набряками підшкірної клітковини і внутрішніх органів, утворенням на шкірі характерних вузлів, ураженням очей, слизових оболонок дихальних шляхів і травного тракту.

Уперше хворобу зареєстрували в Замбії у 1929 р., а з 1963 р. вона з'явилася в Європі. Нодулярний дерматит належить до переліку інфекцій, обов'язкових для декларування у ВООЗт. Хвороба призводить до значних економічних втрат через загибель тварин, зниження молочної продуктивності, тимчасову або постійну неплідність, стерильність биків-плідників, ураження шкіри (що стає непридатною для використання у промисловості), виникнення секундарних інфекцій на тлі набутого імунодефіциту.

Характеристика вірусу. Вірус нодулярного дерматиту (вірус Neethling) належить до роду *Capripoxvirus* підродини *Chordopoxvirinae*. Вірус епітеліотропний і має антигенну спорідненість із вірусами віспи овець і кіз.

Культивування. Вірус культивують у первинних культурах клітин нирок або сім'яників телят чи ягнят. Чіткі цитопатичні зміни в моношарі клітин, заражених нативним матеріалом, спостерігаються зазвичай на 10–14-ту добу. Адаптовані до клітинних культур штами збудника обумовлюють ЦПД значно швидше – упродовж 24–48 год після зараження. ЦПД характеризується утворенням веретеноподібних клітин, які з часом округлюються, з цитоплазматичними тільцями-включеннями.

Для культивування вірусу використовують також 5–7-добові курячі ембріони. Їх заражають на ХАО, де утворюються некротичні вузлики – віспини.

У кролів за в/ш зараження через 6–9 діб розвивається короткочасна місцева реакція, а в мурчаків – внутрішньошкірні некротичні ураження, подібні з ураженнями у ВРХ. Мишенята-сисуни після і/ц зараження гинуть на 5–6-ту добу.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Вірус нодулярного дерматиту відносно стійкий у навколишньому середовищі. В уражених ділянках шкіри виживає не менше 33 діб, у спермі – 22 доби, у слині – 11 діб, у крові та внутрішніх органах – 4 доби. Збудник інактивується при 55 °С упродовж 2 год, при 60 °С – за 30 хв. При 4 °С вірус залишається вірулентним до 6 міс.

Стійкий до триразового заморожування – відтавання. Прогрівання вірусу при 37 °С упродовж 5 діб не знижує його вірулентності. Чутливий до 20 %-го розчину ефіру, хлороформу. Збудник інактивується дезінфікуючими розчинами формаліну (1%-й), фенолу (2%-й), Віркон С (2%-й), гіпохлориту натрію (2–3%-ві).

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. У природних умовах хворіє ВРХ і зрідка азійські водяні буйволи *(Bubalus bubalis).* Хворобу було зареєстровано також у аравійських ориксів *(Orix Leucoryx)* і спрингбоків *(Antidorcas marsupialis)*, проте остаточно сприйнятливість диких жуйних до захворювання не з'ясована. Є повідомлення про здатність деяких штамів вірусу розмножуватися в організмі овець і кіз, проте в природних умовах випадків захворювання в цих тварин не встановлено. В експериментальних умовах вдавалося заражати імпал *(Aepiceros mslampus)* та жираф *(Girafa camelopardalis).*

Джерело збудника інфекції – хворі тварини, тварини-реконвалесценти і латентні вірусоносії. З організму інфікованих тварин вірус виділяється з відторгнутими елементами ураженої шкіри, слиною, спермою, молоком. Вірус передається переважно трансмісивним шляхом – комарами, москітами і мухами-жигалками. Також буває безпосередня передача збудника під час контакту хворих і здорових тварин, зрідка – статевий шлях. Телята можуть заражатися через молоко інфікованих корів.

Поширення інфекції пов'язане насамперед із комахами – переносниками вірусу. Переміщення інфікованих тварин, корми, предмети догляду, транспортні засоби тощо також сприяють поширенню хвороби.

У свіжих вогнищах хвороба виникає раптово і набуває характеру епізоотії із захворюваністю 50–100 % і летальністю 40–50 %. У регіонах, тривалий час неблагополучних щодо нодулярного дерматиту, ці показники значно нижчі.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Патогенез має деяку подібність до віспи, однак у розвитку шкірної вузликової екзантеми не спостерігається чіткої стадійності. Спочатку вірус репродукується у місці проникнення в організм, потім з кров'ю заноситься в чутливі епітеліальні клітини шкіри, слизової оболонки травного каналу й дихальних шляхів, де спричинює типовий вузликовий процес. Масова поява вузликів на шкірі спостерігається на 7–20-ту добу після зараження.

Клінічні ознаки. Інкубаційний період триває 10–15 діб, інколи – близько 5 тижнів. На початку клінічного прояву спостерігаються в'ялість, підвищення температури тіла 40,5 °С і вище, водянисті виділення з очей, збільшення пахових і передлопаткових лімфатичних вузлів. Пізніше з'являються ознаки ураження шкіри. Хворі втрачають апетит, худнуть.

Перебіг хвороби буває гострим і тяжким або легким, інколи латентним. За *гострого перебігу* вражається ротова порожнина, органи дихання і травлення, статеві органи. З рота витікає тягуча слина, з носа – гнійний слиз неприємного запаху. На повіках виникають виразки й ознаки запалення. По всьому тілу, інколи лише на кінцівках і череві утворюються вузлики діаметром 0,5–7 см, заввишки до 0,5 см. Кількість їх може сягати сотень. З часом епідерміс по краях вузлів відділяється, в центрі тканина некротизується та утворюються впадини. По периферії впадин за рахунок грануляційної тканини формуються валики завтовшки 1–3 мм. Впадини швидко заповнюються грануляційною тканиною і вкриваються волоссям. За бактеріальних ускладнень у шкірі й підшкірній клітковині з'являються набряки. Несеквестровані вузлики твердішають і виявляються впродовж кількох місяців.

У лактуючих корів часто вражається молочна залоза. Вим'я збільшується в об'ємі, на шкірі з'являються вузлики. Молоко стає густим та набуває рожевого відтінку, виділяється краплями, за нагрівання перетворюється на гель. Тільні корови можуть абортувати. У бичків розвивається статева стерильність. У телят до місячного віку інфекція буває безсмптомною.

Хвороба зазвичай триває близько місяця, проте в разі ускладнень – значно довше. Причиною ускладнень є різноманітна секундарна мікрофлора, яка обумовлює трахеїти, пневмонії, ураження статевих органів, суглобів тощо. Прогноз за неускладненого перебігу сприятливий. У тяжких випадках може настати загибель.

Патологоанатомічні зміни. На шкірі виявляють характерні вузлики. Соматичні лімфатичні вузли набряклі, соковиті на розрізі. Під вісцеральною плеврою, на селезінці, печінці, слизовій оболонці рубця – крововиливи діаметром до 1 см, зрідка вузлики розміром до 3 мм. Легені зазвичай набряклі, нерідко виявляються вузлики. Слизові оболонки сичуга, кишок з ознаками запалення, інколи спостерігають виразки.

Лабораторна діагностика. Діагноз на нодулярний дерматит ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

Для вірусологічного дослідження від хворих і загиблих тварин відбирають уражені частинки шкіри (вузлики), слизових оболонок або підшкірної клітковини, виділення з носової та ротової порожнин, з очей, слину, сперму, поверхневі лімфатичні вузли, а в період підвищеної температури тіла – кров. Для серологічного дослідження – сироватки крові тварин.

Лабораторна діагностика включає експресні, вірусоологічні та ретроспективні методи. *Експрес-методи* ґрунтуються на виявленні вірусного

геному в патологічному матеріалі у ПЛР, що дає змогу не лише ідентифікувати вірус нодулярного дерматиту, але й диференціювати його від споріднених вірусів віспи овець і кіз. У деяких випадках для експрес-діагностики використовують електронну мікроскопію. *Вірусологічні методи.* Для ізоляції вірусу з патматеріалу заражають первинні культури клітин нирок або сім'яників телят чи ягнят, де з'являється характерна ЦПД. Ідентифікацію виділеного вірусу проводять у РН і РІФ. *Ретроспективну діагностику* здійснюють за допомогою РН та ІЕА. *Диференціальна діагностика:* нодулярний дерматит слід диференціювати від герпесвірусних шкірних уражень, дерматофільозу, шкірної форми туберкульозу, віспи корів реакцій на укуси комах.

Імунітет та імунопрофілактика. Тварини, що перехворіли на нодулярний дерматит, впродовж року залишаються нечутливими до повторного зараження. Для імунопрофілактики використовують живі вакцини з антигенно спорідненого вірусу віспи овець, який культивують у культурі клітин сім'яників ягнят або курячих ембріонах. Також розроблена жива культуральна вакцина з вірусу нодулярного дерматиту. Вакцинація забезпечує стійкість тварин до вірусу упродовж року.

Вірус міксоми *(Myxoma virus)*

Вірус міксоми є збудником ***міксоматозу кролів.*** Це висококонтагіозна хвороба з гострим перебігом, яке характеризується блефарокон'юнктивітом, ринітом, утворенням пухлинних вузликів або драглистих набряків у ділянці голови, лап, хребта, статевих органів та анального отвору.

Хвороба вперше описана в Уругваї в 1898 р. як спустошлива епізоотія серед свійських кролів. Вірус уперше виділив у США Р. Шоуп у 1932 р. У 1950 р. збудник міксоматозу спеціально використовувався в Австралії для знищення диких кролів, які загрожували посівам та окультуреним пасовищам. В Європі міксоматоз реєструють із 1952 р., коли у Франції під Парижем випустили в природу двох заражених кролів для боротьби з дикими кролями. Це спричинило у Франції спустошливу епізоотію не лише серед диких, але й свійських кролів. У наступні роки міксоматоз поширився в багатьох країнах Європи. В Україні цю хворобу вперше діагностовано у 1981 р. Економічні збитки значні: захворюваність сягає 95–100 %, летальність – 90–100 %.

Характеристика вірусу. Вірус міксоми належить до роду *Leporipoxvirus* підродини *Chordopoxvirinae.* Він є епітеліотропний та має антигенну й імуногенну спорідненість зі збудниками фіброми кролів, зайців і вивірок.

Культивування. Вірус міксоми культивують у 10–12-добових курячих ембріонах шляхом зараження на ХАО, де утворюються некротичні вузлики – віспини. При зараженні первинних культур клітин нирок кролів, пацюків, мурчаків, хом'яків і вивірок вірус спричинює ЦПД: округлення клітин, утворення цитоплазматичних тілець-включень.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Вірус стійкий у зовнішньому середовищі і зберігає вірулентність у висушеному патологічному матеріалі кролів упродовж 20 діб, у вологому стані при 10 °С – близько 3 міс, при 30 °С – до 10 діб, у замороженому стані – понад 2 роки. Прогрівання при 56 °С убиває його через 25 хв. Вірус чутливий до дії ефіру, лугів, формальдегіду, фенолу та перманганату калію. Залишається життєздатним у трупах кролів 7 діб, у ґрунті – до 10 тижнів, у висушених шкурах кролів – до 10 міс. Надійними дезінфікуючими засобами є 3 %-й розчин формальдегіду і 3 %-й розчин гідроксиду натрію або калію.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. До міксоматозу сприйнятливі дикі та свійські кролі незалежно від віку і статі. Зайці хворіють рідко. Резервуаром вірусу міксоми в природі є дикі кролі та зайці, серед яких інфекція проходить латентно і підтримується механічним перенесенням вірусу членистоногими. Значну роль у збереженні й передаванні збудника відіграють кровосисні комахи (комарі, москіти) та ектопаразити (воші, блохи, кліщі). У слинних залозах москітів вірус зберігається до 7 міс, кролячі блохи можуть бути носіями вірусу впродовж 3 міс голодування, а комарі здатні зберігати вірус до 1 міс після інфікування.

Джерелом збудника інфекції є хворі й перехворілі кролі, які виділяють вірус із витіканнями з очей і носа. Зараження відбувається за безпосереднього контакту здорових кролів із хворими, а також через корми, воду, предмети догляду, вигульні дворики, забруднені виділеннями інфікованих тварин. Механічними переносниками збудника інфекції на великі відстані можуть бути люди, транспортні засоби і птахи.

Спалахи міксоматозу мають сезонний характер, виникають частіше пізно навесні або на початку літа, корелюють з появою великої кількості комах – переносників вірусу. У разі виникнення хвороби в раніше благополучному господарстві на початку захворюють і гинуть майже всі тварини. Наприкінці спалаху переважає хронічний перебіг хвороби, гинуть до 70 % кролів. Тварини-реконвалесценти тривалий час залишаються вірусоносіями.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Первинна репродукція вірусу відбувається зазвичай у слизових оболонках ротової й носової порожнин. Через 2 доби вірус лімфогенним шляхом проникає

в регіонарні лімфатичні вузли, де швидко розмножується. Потім розвивається вірусемія, порушується проникливість капілярів, з'являються набряки. Вірус у найвищій концентрації міститься в міксомах, лімфатичних вузлах, легенях, селезінці та крові. З організму вірус виділяється з носовими й очними виділеннями,

Клінічні ознаки. Інкубаційний період триває від 2 до 20 діб, що залежить від вірулентності вірусу, шляху зараження та імунорезистентності організму. Перебіг захворювання буває гострим, хронічним і латентним. Розрізняють дві форми хвороби: *класична* і *нодулярна (вузликова).*

Першими ознаками за обох форм міксоматозу є почервоніння у вигляді плям або ж поява дрібних горбиків на шкірі кролів, зазвичай в ділянці повік і на вушних раковинах. За *класичної форми* основними ознаками прояву хвороби є набряки в ділянці голови, підгрудка і статевих органів. Хворі тварини мають спотворений вигляд – голова набрякла, вушні раковини розпухлі й опущені («левиний вигляд»). Поряд із набряками спостерігається запалення кон'юнктиви і рогівки. З очей і носової порожнини виділяється гнійно-фібринозний ексудат, який, підсихаючи, закриває очні щілини, накопичується навколо носових отворів у вигляді скоринок. Дихання стає тяжким, за авскультації тестуються хрипи. Хворі тварини намагаються дихати через рот, деякі жалібно попискують, худнуть і гинуть.

За *нодулярної (вузликової) форми* перебіг помітно легший. У ділянках спини, вушних раковин, носа, повік, кінцівок з'являються папули, вузлики, пухлини розміром від просяного зерна до голубиного яйця. Приблизно через два тижні на місцях вузликових розростань і пухлин виникають вогнища некрозу. Хвороба триває близько 30–40 діб.

За гострого перебігу, який спостерігається частіше за класичної форми, смертність інколи сягає 100 %. За нодулярної форми смертність, зазвичай, нижча, проте деколи може сягати 90 %.

У разі атипового перебігу хвороби яскраві клінічні ознаки хвороби не реєструються. Іноді хвороба маніфестується порушенням відтворення і загибеллю кроленят.

Патологоанатомічні зміни. У ділянках голови, шиї, ануса і статевих органів виявляють драглисті набряки підшкірної клітковини. Легені набряклі, іноді спостерігаються вогнища пневмонії, гостре запалення слизової оболонки дихальних шляхів. Лімфатичні вузли і селезінка збільшені, гіперемійовані.

Лабораторна діагностика. Діагноз на міксоматоз кролів ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

У лабораторію для вірусологічного дослідження надсилають трьох клінічно хворих кролів чи їхні трупи не пізніше ніж через 2 год із моменту загибелі або уражені ділянки шкіри разом із інфільтрованою підшкірною клітковиною. Для гістологічного дослідження відбирають шматочки шкіри з підшкірною клітковиною з різних ділянок (повіки, анус, губи, вуха), які фіксують у 10–15 %-му розчині формаліну.

Лабораторна діагностика включає гістологічні, експресні та вірусологічні методи. За *гістологічного дослідження* у позитивних випадках виявляють вакуолізацію цитоплазми, каріолізис та каріорексис у клітинах епідерми шкіри і кореневої піхви волосин, цитоплазматичні ацидофільні включення. Для *експрес-діагностики* з метою виявлення вірусного антигену в патматеріалі загиблих тварин використовують ІЕА. *Вірусологічні методи.* У разі негативного чи сумнівного результату гістологічного дослідження чи ІЕА ставлять біопробу на двох кролях масою 1,5–2 кг, яких заражають в/ш і в кон'юнктивальні мішки обох очей. Через 3–6 діб з'являються клінічні ознаки хвороби, характерні для класичної чи нодулярної форми, через 7–16 діб із типовими патоморфологічними змінами. Ізоляцію вірусу можна проводити на 10–12-добових курячих ембріонах, заражаючи їх на ХАО, де утворюються віспини. Для ідентифікації виділеного вірусу використовують ІЕА. *Диференціальна діагностика* передбачає необхідність виключення інфекційного фіброматозу і стафілококозу.

Імунітет та імунопрофілактика. Кролі, що перехворіли на міксоматоз, набувають нестерильний імунітет. Кроленята від імунних матерів мають колостральний імунітет до 5-тижневого віку.

Для імунопрофілактики хвороби розроблені живі вакцини двох типів: 1) культуральна вакцина з гетерологічного вірусу фіброми Шоупа (імунітет триває до 4 міс); 2) культурально-ембріональна вакцина з аттенуйованого вірусу міксоми (імунітет – до 12 міс).

Також розроблена комбінована вакцина Песторін Мормікс (Чехія) проти ВГХК і міксоматозу, яка містить інактивований ВГХК та атенуйований вірус міксоми. Імунітет триває до року.

5.1.2. Родина *Asfarviridae* (асфарвіруси)

Згідно з інформацією МКТВ (2020), родина *Asfarviridae* представлена лише родом *Asfivirus* з єдиним представником – вірусом африканської чуми свиней*.

* Типовий вид.

Назва родини *Asfarviridae* походить від англ. African swine fever and related viruses – африканська чума свиней і споріднені віруси.

Основні ознаки. Віріони сферичної форми, діаметром 175–215 нм (рис. 5.2). *Структура віріона:* 1) зовнішня ліпопротеїнова оболонка; 2) ікосаедральний нуклеокапсид; 3) дволанцюгова ДНК із мол. масою 100 МДа; 4) понад 50 структурних протеїнів, у тому числі ДНК-залежна РНК-полімераза (транскриптаза).

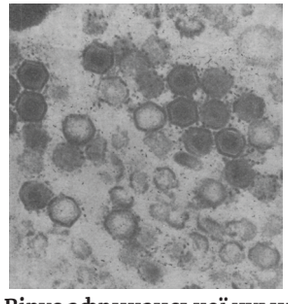


Рис. 5.2. Вірус африканської чуми свиней
(Феннер Ф. та ін., 1977)

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом рецепторного ендоцитозу. У цитоплазмі відбувається транскрипція вірусного геному (за участю вірусної транскриптази) і реплікація (за участю синтезованої ДНК-полімерази). Складання і вихід віріонів із клітини здійснюється брунькуванням через плазмолему. Цикл репродукції триває 10–12 год.

Вірус африканської чуми свиней *(African swine fever virus)*

***Африканська чума свиней** (АЧС)* – висококонтагіозна вірусна хвороба, яка характеризується гарячкою, геморагічним діатезом, дистрофічно-некротичними змінами у внутрішніх органах (особливо лімфоїдних) і високою летальністю (98–100 %).

Уперше хвороба описана в 1903 р. у Південній Африці серед імпортованих з Європи свиней. За клінічними і патологоанатомічними ознаками вона була схожою з європейською чумою свиней, але протікала значно тяжче і супроводжувалася 100 %-ю летальністю. У 1921 р. англійський дослідник Р. Монтгомері вперше детально описав хворобу під назвою «східноафриканська гарячка» і довів її вірусну етіологію шляхом введення фільтратів сироватки крові й суспензії різних тканин від хворих свиней здоровим.

До 1957 р. АЧС була поширена лише на території Африки. В Європі хворобу вперше діагностували в Португалії в 1957 р. у районі Лісабонського аеропорту, коли захворіли свині, яких годували харчовими відходами з літаків, що прибували з Анголи. У 1960-х рр. АЧС було виявлено в Іспанії, Франції, Італії, Бельгії, Нідерландах, у 1970-х рр. – на американському континенті (Куба, Бразилія, Домініканська Республіка, Гаїті). У Росії в період 2012–2013 рр. зафіксовано понад 500 спалахів АЧС, знищено близько 1 млн. свиней. З 2012 р. хвороба діагностується і в Україні. АЧС належить до особливо небезпечних (карантинних) вірусних хвороб тварин.

Характеристика вірусу. Вірус АЧС належить до роду *Asfivirus*, є пантропний. Він має має складну антигенну структуру. Комплементозв'язувальний і преципітувальний антигени – групові, спільні для всіх штамів збудника, а гемадсорбівний антиген – типоспецифічний, знаходиться в суперкапсидній оболонці віріона. За результатами РЗГАд відомі штами вірусу були розділені на дві антигенні групи (А і В) та одну підгрупу (С), які, у свою чергу, мають численні серотипи. Антитіла, що затримують гемадсорбцію, є строго типоспецифічними і використовуються для типізації збудника. Вірусу АЧС властива висока антигенна мінливість.

Вірус АЧС не індукує утворення вірусонейтралізувальних антитіл, що, ймовірно, зумовлено особливостями його антигенної структури. Можливо, причиною відсутності вірусонейтралізувальних антитіл є антигенна мімікрія або гетерогенність, тобто блокування протективного вірусного антигену вуглеводами чи ліпідами суперкапсиду або маскування його видовими антигенами вірусу чи хазяїна.

Культивування. Вірус АЧС репродукується в первинних культурах лейкоцитів крові або макрофагів кісткового мозку свині. Через 18–48 год з'являється гемадсорбція еритроцитів свині, а через 48–72 год – ЦПД.

Вірус не має гемаглютинувальних властивостей. Гемадсорбція відбувається, очевидно, за рахунок гемадсорбівного антигену, що локалізується в плазмолемі заражених клітин. Еритроцити прикріплюються до поверхні інфікованих лейкоцитів, формуючи характерний вінчик, унаслідок чого уражені лейкоцити мають вигляд ягід шовковиці або малини.

ЦПД характеризується лізисом клітин, появою синцитіїв, утворенням ацидофільних цитоплазматичних тілець-включень. Адаптовані штами збудника АЧС здатні розмножуватися в перещеплюваних лініях клітин нирок поросят (РК), мавп (MS, SV, Vero), хом'ячка (ВНК-21).

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Вірус винятково стійкий у широкому діапазоні температур і pH середовища (як кислого, так і лужного),

до висушування, заморожування. В інфікованих свинарниках зберігається 3 міс, у ґрунті – 4 міс улітку і 6 міс узимку, в трупах – 2,5 міс, в калі при 4–8 °С – 5 міс, у сечі – 2 міс, в озерній воді – 6 міс. У дефібринованій крові в темному місці за кімнатної температури вірус не втрачає інфекційності впродовж 4,5 міс, у м'ясі й копчених окостах – 5–6 міс. У холодильнику за температури –30...–60 °С вірус залишається життєздатним до 6–10 років, при 5 °С – 5–7 років, за кімнатної температури – 18 міс, при 37 °С – 10–30 діб. Вірус термолабільний, за температури 60 °С інактивується впродовж 20–30 хв. Сонячні промені інактивують вірус за 12 год.

Вірус надзвичайно резистентний і до дезінфектантів, які широко використовують у ветеринарній медицині (креолін, лізол, 1,5 %-й розчин гідроксиду натрію та ін.). Хлоровмісні препарати (5 %-й розчин хлораміну, натрію й кальцію гіпохлорити, хлорне вапно з 1–2 % активного хлору) інактивують вірус упродовж 4 год, 2 %-й розчин гідроксиду натрію – за 24 год.

При дезінфекції особливу увагу звертають на ретельне механічне очищення і промивання гарячою водою, оскільки органічні речовини гною можуть захищати вірус.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. У природних умовах хворіють свійські й дикі свині, незалежно від віку. У диких африканських свиней (бородавочники, чагарникові, лісові) інфекція закономірно латентна.

Джерелом збудника інфекції є хворі й перехворілі свині-вірусоносії. Хворі тварини виділяють вірус із різними секретами та екскретами вже на 2–4-ту добу від початку прояву захворювання. Збудник виділяється з носовими й очними витіканнями, калом, сечею, слиною, а також із видихуваним повітрям і кров'ю. Тварини-реконвалесценти тривалий час є вірусоносіями (до 2 років і довше). Різноманітні стресові чинники сприяють активізації інфекційного процесу і виділенню вірусу в довкілля.

Зараження відбувається різними шляхами: в основному аліментарно, а також через ушкоджену шкіру і слизові оболонки, аерогенно, трансмісивно (через укуси кліщів).

Факторами передачі збудника інфекції можуть бути контаміновані корми, вода, гній, підстилка, предмети догляду, одяг обслуговуючого персоналу, транспорт та ін. Особливу небезпеку становлять продукти забою інфікованих свиней, кухонні та боєнські відходи, що використовуються для годівлі тварин. Механічними переносниками збудника можуть бути птахи, гризуни, комахи.

Основним резервуаром вірусу АЧС на території Африки є дикі свині, а в країнах Європи й Америки – свійські свині-вірусоносії й дикі

європейські кабани. Суттєву роль у поширенні інфекції відіграють аргасові кліщі роду *Ornithodoros*. Існує замкнуте коло циркуляції вірусу між дикими свинями та аргасовими кліщами. В організмі кліщів вірус репродукується в кишечнику, поширюється в слинні залози і репродуктивні органи, зберігається роками та може передаватися потомству трансоваріально і трансфазово. Кліщі живуть у середньому 10–12 років, здатні мігрувати на великі відстані – до 8 км. Тому вогнпище інфекції у разі його виникнення існує тривалий час без повторного занесення вірусу і відсутності регулярних контактів кліщів з інфікованими свинями. У таких місцевостях неможливо ліквідувати АЧС.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Після первинної репродукції у місці проникнення (в мигдаликах і регіонарних лімфатичних вузлах) вірус АЧС гематогенним і лімфогенним шляхами поширюється по всьому організму, уражаючи переважно лімфоїдні органи, кістковий мозок та ендотелій судин.

Характерною ознакою АЧС є постійна віремія. З'явившись у крові ще на початку прояву хвороби, збудник виявляється там постійно, уражає більшість макрофагів та близько 4 % поліморфноядерних лейкоцитів. При цьому тестується провідна ознака імуносупресії – лімфоцитопенія.

Ураження вірусом ендотелію кровоносних і лімфатичних судин призводить до підвищення проникливості їхніх стінок, що проявляється розвитком периваскулярних серозно-фібринозних набряків, крововиливів, закупорок, інфарктів і некрозів. Розлад гемодинаміки спричинює гіпоксію тканин та органів, порушується білковий, жировий і вуглеводний обмін, накопичуються токсичні продукти, внаслідок чого виникають глибокі морфологічні й функціональні зміни в усих органах і тканинах.

За хронічного перебігу АЧС розвиваються імунопатологічні процеси: гіпергаммаглобулінемія, імунокомплексна патологія, алергічні реакції у вигляді гіперчутливості сповільненого типу та автоімунні реакції.

Клінічні ознаки. Інкубаційний період триває 5–7 діб, іноді – до 2–3 тижнів. Перебіг хвороби може бути надгострим, гострим, підгострим і хронічним, а також латентним.

Надгострий перебіг характеризується раптовим підвищенням температури тіла до 40,5–42 °С, прискоренням пульсу і дихання. Упродовж 24–48 год температура знижується, пульс стає слабким, дихання поверхневим, спостерігаються сонливість, порушення координації рухів, і тварина гине. Інколи тварини гинуть раптово, без будь-яких симптомів, за винятком гарячки.

За *гострого перебігу* підвищується температура тіла до 40,5–42 °С, прискорюються пульс і дихання, знижується апетит, спостерігаються спрага, хитка хода, тремтіння м'язів, серозний або серозно-геморагічний кон'юнктивіт, серозно-фібринозний риніт. У деяких тварин бувають носові кровотечі. Закономірно з'являються ознаки пневмонії: часте, переривчасте дихання, іноді – кашель. Під час авскультації в легенях прослуховуються вологі хрипи. Шкіра і слизові оболонки набувають синюшного відтінку. На шкірі вушних раковин, п'ятачка, міжщелепового простору, підгрудка, черева, промежини і кінцівок з'являються ціанозні червоно-фіолетові плями, множинні крововиливи. Супоросні свиноматки абортують. Пізніше спостерігають ураження органів травлення, зокрема часте блювання. Блювотні маси містять домішки крові. Дефекація болюча, кал твердий із домішками слизу і крові. Нерідко запор змінюється діареєю. За 24–48 год до загибелі в деяких тварин з'являються ознаки менінгоенцефаліту: клонічні судоми, конвульсії, парези і паралічі тазових кінцівок. Упродовж 4–10 діб переважна більшість тварин гине.

За *підгострого перебігу* ознаки подібні, проте слабше виражені й розвиваються повільніше. Хвороба ускладнюється секундарною мікрофлорою. Тварини помітно худнуть. Інфекційний процес триває 15–20 діб і завершується переважно загибеллю тварини або набуває *хронічного перебігу*, який характеризується переміжною гарячкою, відставанням у рості, прогресуючим схудненням. Розвивається пневмонія, артрити, кератити, некрози шкіри в ділянці вух, голови, спини, нижніх частин кінцівок. У підшкірній клітковині морди і нижньої щелепи спостерігаються неболючі припухлості. Хвороба триває 2–15 міс, більшість тварин гине. Тварини-реконвалесценти залишаються латентними вірусоносіями.

Латентний перебіг характерний для диких африканських свиней і зрідка спостерігається у свійських свиней наприкінці епізоотії, ймовірно, у зв'язку зі зниженням вірулентності збудника.

Патологоанатомічні зміни. Трупне заклякання настає швидко. З носа й анального отвору інколи виділяється кров або кров'яниста рідина. Шкіра і слизові оболонки синюшні. На шкірі – темно-червоні плями і множинні крововиливи. У підшкірній клітковині – серозно-геморагічні набряки. Кровоносні судини підшкірної клітковини, органів черевної порожнини і брижі переповнені кров'ю, яка не зсідається. У грудній, черевній і перикардіальній порожнинах – кров'янистий ексудат зі згустками фібрину. Лімфатичні вузли темно-вишневого кольору, збільшені, соковиті, в'ялої консистенції. Селезінка темно-червоного кольору, збільшена в 3–6 разів, капсула напружена, пульпа розм'якшена, переповнена кров'ю, по краях іноді виявляють геморагічні інфаркти. Легені переповнені кров'ю, сіро-червоного забарвлення, з драглистим набряком міжчасточкової сполучної тканини і паренхіми. Нирки повнокровні, з численними крововиливами, збільшені. Печінка нерівномірно забарвлена, збільшена, набрякла, повнокровна, в'ялої консистенції, Жовчний міхур набряклий, переповнений густою жовчю з домішками крові. Серцевий м'яз в'ялої консистенції, на епікарді, ендокарді й у міокарді – крапчасті й смугасті крововиливи. На гіперемійованій слизовій оболонці травного тракту – крововиливи та ерозії.

За підгострого перебігу хвороби часто спостерігають ознаки серозно-фібринозного перикардиту, геморагії в органах і тканинах. За хронічного перебігу виявляють екзематозні й некротичні ураження шкіри, ознаки запалення суглобів, бронхопневмонії, гепатиту, нефриту, серозно-фібринозного перикардиту.

Лабораторна діагностика. Діагноз на АЧС ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

Для вірусологічного дослідження в лабораторію направляють патологічний матеріал, відібраний від тварин, убитих в агональному стані або загиблих: дефібринована кров, паренхіматозні органи, мигдалини, лімфатичні вузли, серце. Для серологічного дослідження – сироватки крові тварин із латентним і хронічним перебігом хвороби.

Лабораторну діагностику починають з *експрес-методів:* ідентифікують вірусний антиген у РІФ, РЗК і РДП, а вірусний геном – методом ДНК-зондів і в ПЛР.

Вірусологічні методи використовують в разі спалаху АЧС у раніше благополучному регіоні. Вірус виділяють у первинних культурах клітин лейкоцитів крові або макрофагів кісткового мозку свині. Індикацію вірусу проводять за появою через 3–7 діб характерної ЦПД, у РГАд (з еритроцитами свині). Ідентифікують виділений вірус у РЗГАд, РІФ, ІЕА, РІА і ПЛР.

У сумнівних випадках ставлять *імунологічну пробу* на 8 поросятах 2–4-місячного віку, імунних до КЧС. Заражають в/м 4 тварин збудником КЧС, а 4 – досліджуваним патматеріалом. За наявності вірусу АЧС тварини, заражені патматеріалом, захворюють із характерними ознаками і гинуть. Тварини, інфіковані збудником КЧС, залишаються здоровими. За наявності в патматеріалі збудника КЧС усі тварини не реагують на зараження.

Відома інша модифікація описаної імунологічної проби. Постановку її здійснюють також на поросятах 2–4-місячного віку, 4 з яких імунні до КЧС, а 4 – неімунні. Всіх тварин заражають в/м досліджуваним патматеріалом. За наявності вірусу АЧС усі тварини захворюють з характерними клінічними ознаками і гинуть. Якщо в досліджуваному патматеріалі є збудник КЧС, імунні тварини залишаються здоровими, а неімунні – гинуть.

Ретроспективну діагностику АЧС здійснюють, використовуючи різні серологічних реакції, зокрема РНІФ, РНГАд, РЗК, РДП, РРІД, ЗІЕФ, РІА та ІЕА. За *диференціальної діагностики* треба виключити класичну чуму, хворобу Ауєскі, бешиху, пастерельоз, сальмонельоз, сибірку.

Імунітет та імунопрофілактика. У сироватках тварин-реконвалесцентів виявляють комплементозв'язувальні, преципітувальні та затримуючі гемадсорбцію антитіла, проте вони не нейтралізують інфекційну активність вірусу. Вірусонейтралізувальні антитіла не утворюються. Це зумовлено властивостями самого збудника, а не станом імунної системи організму. Проте в слабкій напруженості імунітету певну роль відіграє зміна функції лімфоїдних клітин: порушення взаємодії вірусу з макрофагами і кооперації їх із Т- і В-лімфоцитами.

У поросят після прийому молозива від серопозитивних свиноматок з'являються антитіла, проте пасивний імунітет слабо виражений.

У блокуванні інфекції важливе значення мають реакції клітинного імунітету. У сироватках крові свиней на 7-му добу після зараження з'являються цитотоксичні Т-лімфоцити, які лізують заражені клітини. Також у захисті організму діє опосередкований антитілами механізм: на 12–15-ту добу з'являються комплементозв'язувальні антитіла, які беруть участь у комплементозалежному цитолізі й антитілозалежній цитотоксичності.

У зв'язку з відсутністю вірусонейтралізувальних антитіл за АЧС численні спроби отримати інактивовані або живі вакцини не дали позитивних результатів. Поки що не вдалося розробити інактивовані вакцини класичними методами з використанням сучасних методик. Більшість імунізованих тварин за контрольного зараження гинула, і лише незначна частина їх виживала після тривалого захворювання.

Живі вакцини на основі атенуйованого вірусу АЧС виявилися ефективніші порівняно з інактивованими. Вони захищали від експериментального зараження гомологічним штамом вірусу 50–90 % імунізованих тварин. Проте широке застосування живих вакцин у свинарських господарствах Португалії та Іспанії супроводжувалося розвитком ускладнень (ураження

легень) і загибеллю 10–50 % тварин через 5–6 міс. після вакцинації. Отже, живі вакцини, незважаючи на їхню ефективність у лабораторних умовах, не запобігають приживанню вірулентного вірусу і розвитку довічної персистентної інфекції. Ці серйозні недоліки ставлять під сумнів питання про доцільність застосування їх.

Наукові дослідження щодо створення ефективних і нешкідливих вакцин проти АЧС – субодиничих, синтетичних і генноінженерних – спрямовані на вивчення антигенної структури збудника, пошук протективних антигенів із використанням сучасних методів молекулярної біології.

5.1.3. Родина *Herpesviridae* (герпесвіруси)

Назва родини *Herpesviridae* походить від др.-грец. ἑρπης – повзучий, що відображає здатність вірусів викликати латентну інфекцію з періодичною активацією і проявом клінічних симптомів.

Згідно з інформацією МКТВ (2020), родина *Herpesviridae* поділяється на 3 підродини, 13 родів і включає 107 видів.

I. Підродина *Alphaherpesvirinae* (5 родів): **1.** Рід *Itovirus* (2 види): альфагерпесвіруси курячих 1*, папуг 1. **2.** Рід *Mardivirus* (6 видів): альфагерпесвіруси курячих 2*, 3, качиних 1, індичкових 1, голубиних 1, пінгвінових 1. **3.** Рід *Scutavirus* (2 види): альфагерпесвіруси морських черепах 5*, сухопутних черепах 3. **4.** Рід *Simplexvirus* (13 видів): альфагерпесвіруси людини 1*, 2, великої рогатої худоби 2, кролів 4, павукоподібних мавп 1, макак 1, церкопітекових мавп 2, білячих мавп 1, павіанів 2, кенгуру 1, 2, шимпанзе 3, криланів 1. **5.** Рід *Varicellovirus* (18 видів): альфагерпесвіруси людини 3*, великої рогатої худоби 1, 5, кіз 1, коней 1, 3, 4, 8, 9, свиней 1, буйволів 1, оленів 1, 2, собак 1, котів 1, церкопітекових мавп 9, тюленів 1, нарвалів 1. *Некласифікований вірус* (1 вид): альфагерпесвірус морських черепах 6.

II. Підродина *Bethaherpesvirinae* (4 роди): **1.** Рід *Cytomegalovirus* (11 видів): бетагерпесвіруси людини 5*, нічних мавп 1, капуцинових мавп 1, церкопітекових мавп 5, макак 3, 8, шимпанзе 2, 3, 4, саймірі 4, мандрилів 1. **2.** Рід *Muromegalovirus* (3 види): бетагерпесвіруси мишей 1*, 2, 8. **3.** Рід *Proboscivirus* (3 види): бетагерпесвіруси слонів 1*, 4, 5. **4.** Рід *Roseolovirus* (6 видів): бетагерпесвіруси людини 6А*, 6В, 7, макак 9, свиней 2, мишей 3. *Некласифіковані віруси* (2 види): бетагерпесвіруси мурчаків 2, тупай 1.

III. Підродина *Gammaherpesvirinae* (4 роди): **1.** Рід *Limphocryptovirus* (9 видів): гаммагерпесвіруси людини 4*, шимпанзе 1, павіанів 1, макак 4, 10,

* Типовий вид.

орангутангів 2, церкопітекових мавп 14, горил 1, мармозетів 3. **2.** Рід *Macavirus* (9 видів): гаммагерпесвіруси коров'ячих антилоп 1*, 2, конячих антилоп 1, великої рогатої худоби 6, овець 2, кіз 2, свиней 3, 4, 5. **3.** Рід *Percavirus* (6 видів): гаммагерпесвіруси коней 2*, 5, куницевих 1, котів 1, тюленів 3, гладконосих кажанів 1. **4.** Рід *Rhadinovirus* (12 видів): гаммагерпесвіруси білячих мавп 2*, людини 8, павукоподібних мавп 2, 3, макак 5, 8, 11, 12, великої рогатої худоби 4, мишей 4, 7, хом'яків 1. *Некласифіковані віруси* (3 види): гаммагерпесвіруси коней 7, тюленів 2, сагуїнів 1.

Некласифікований вірус у родині (1 вид): герпесвірус ігуан 2.

Основні ознаки. Віріони сферичної форми, діаметром 85–300 нм (рис. 5.3). *Структура віріона:* 1) зовнішня ліпопротеїнова оболонка з пепломерами; 2) тегумент (білкова волокниста оболонка); 3) ікосаедральний капсид (162 капсомери); 4) серцевина, що містить дволанцюгову ДНК із мол. масою 80–150 МДа у комплексі з внутрішніми протеїнами; 5) 20–32 структурні протеїни. *Хімічний склад* (альфагерпесвірусів людини 1, 2): ДНК – 6 %, протеїни – 70 %, ліпіди – 22 %, вуглеводи – 1,5–2 %.

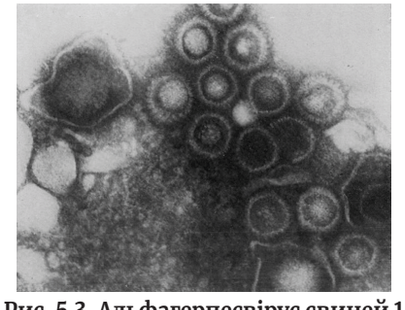


Рис. 5.3. Альфагерпесвірус свиней 1
(Сюрін В.М. та ін., 1991)

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом злиття суперкапсидної оболонки з плазмолемою або рецепторного ендоцитозу. В ядрі відбувається транскрипція вірусного геному (за участю клітинної транскриптази) і реплікація (за участю синтезованої ДНК-полімерази). Складання віріонів здійснюється брунькуванням через ядерну мембрану. Віріони виходять із клітини шляхом екзоцитозу, транспортуючись у цитоплазматичних вакуолях, які зливаються з плазмолемою. Можливе проникнення віріонів із клітини в клітину по цистернах ендоплазматичної сітки, які з'єднують ядерну мембрану з плазмолемою. Цикл репродукції триває 12–70 год.

Альфагерпесвірус свиней 1 *(Suid alphaherpesvirus 1)*

Альфагерпесвірус свиней 1 є збудником ***хвороби Ауєскі*** *(псевдосказу).* Це інфекційне захворювання з гострим перебігом усіх видів свійських тварин, диких і синантропних м'ясоїдних, хутрових звірів і гризунів, що характеризується ураженням ЦНС, а також сильним свербежем і розчосами у всіх тварин, окрім свиней, норок і соболів.

Уперше про хворобу як самостійну нозологічну одиницю повідомив у 1902 р. угорський дослідник А. Ауєскі, на честь якого вона була названа. Починаючи з 1930-х рр., хворобу Ауєскі стали діагностувати в багатьох країнах Європи, Америки, Азії та Африки. Нині вона має важливе епізоотичне й економічне значення для країн із розвинутим свинарством. Захворюваність серед поросят досягає 70–100 %, а летальність – 80–100 %.

Характеристика вірусу. Альфагерпесвірус свиней 1 належить до роду *Varicellovirus* підродини *Alphaherpesvirinae.* Він має один серотип та антигенну спорідненість з альфагерпесвірусами людини 1 і 2. Вірус пантропний для свиней, для всіх інших видів тварин – нейротропний.

Культивування. Альфагерпесвірус свиней 1 культивують у первинних культурах клітин фібробластів курячого ембріона, нирок телят, ягнят, свиней і мавп, у перещеплюваних клітинних лініях L, HeLa, Нер-2 та ін. ЦПД вірусу з'являється через 4–5 діб і характеризується округленням клітин, утворенням симпластів і внутрішньоядерних тілець-включень.

Окрім культур клітин, вірус вдається адаптувати до ХАО курячих ембріонів, які гинуть через 24–96 год після зараження (залежно від ступеня адаптації). На ХАО загиблих ембріонів виявляють некротичні вузлики – віспини.

Вірус також пасажують на кролях, білих мишах (попередньо оброблених гідрокортизоном),

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Вірус стійкий у зовнішньому середовищі. У сіні, зернових кормах, ґрунті й тирсі не втрачає інфекційності в осінньо-зимовий період до 3 міс, навесні – 35 діб, улітку – до 20 діб. У трупах, що розкладаються, вірус зберігає активність 10–28 діб. За біотермічного знезараження гною інактивується впродовж 8–15 діб. Вірус термолабільний, при 56–60 °С інактивується за 30–45 хв, при 70 °С – за 15 хв. Прямі сонячні промені знешкоджують його впродовж 6 год.

Вірус нестійкий до лугів і кислот. Кращі дезінфікуючі речовини – 3 %-й розчин гідроксиду натрію, 20 %-ва суспензія свіжегашеного вапна,

освітлений розчин хлорного вапна, який містить 3% активного хлору; вони вбивають вірус за 15–20 хв.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. У природних умовах хворіють свині, ВРХ, олені, вівці, коні, коти, собаки, лисиці, норки, вовки, ведмеді, їжаки, гризуни, птахи та ін., проте чутливість до вірусу тварин різних видів неоднакова. Зі свійських тварин найбільш сприйнятливі свині (поросята і поросні свиноматки), велика і дрібна рогата худоба, собаки і коти (частіше цуценята і кошенята). Хвороба протікає у них у тяжкій формі і майже завжди завершується загибеллю. Коні, осли, мули менш чутливі. З хутрових звірів частіше хворіють норки (у разі поїдання інфікованого м'ясного корму). Повідомлялося також про захворювання людей із симптомами свербіння й гарячки.

Джерелом збудника інфекції є хворі тварини і вірусоносії. Останні відіграють дуже важливу роль у поширенні інфекції: вірусоносійство у свиней триває 4–6 міс, у пацюків – до 130 діб.

З організму вірус виділяється з секретами носової та ротової порожнин. У підсисних свиноматок вірус виділяється також і з молоком. Факторами передачі збудника є контаміновані корми, вода, підстилка, транспорт, обслуговуючий персонал, гризуни та ін. Зараження відбувається здебільшого аліментарно. Також можливі інші шляхи зараження: повітряно-крапельний, контактний (через ушкоджену шкіру, слизові оболонки носової порожнини, очей, статевих органів) і внутрішньоутробний.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. У разі проникнення в організм через слизові оболонки верхніх дихальних шляхів або шкіру вірус розмножується біля вхідних воріт інфекції, потім поступає в кров, лімфу і розноситься по всьому організму. Вірусемія зумовлює гарячку і геморагічний діатез, а проникнення збудника по периферійних нервових стовбурах у ЦНС – ознаки енцефаліту. Причому в дорослих свиней вірус рідко уражає ЦНС, а в поросят майже завжди в патологічний процес залучається головний і спинний мозок. В організмі свиней вірус проявляє сильну пантропність, накопичується у всіх внутрішніх органах і спричинює одночасно з нервовими явищами симптоми тяжкої септицемії (набряки і крововиливи у внутрішніх органах). У багатьох видів тварин спостерігається свербіння, яке зумовлене різким подразненням шкіри із-за порушення ацетилхолінового і гістамінного обміну в ЦНС і шкірі.

Клінічні ознаки. Інкубаційний період хвороби триває від 2 діб до 2–3 тижнів та залежить від методу зараження, вірулентності вірусу і резистентності організму тварини.

У *свиней* хвороба Ауєскі протікає без ознак свербіння. Клінічні ознаки визначаються насамперед віком тварин. У дорослих свиней хвороба протікає зазвичай доброякісно, триває 3–4 доби і супроводжується гарячкою, пригніченням, зниженням апетиту, кашлем, ринітом, кон'юнктивітом, іноді блюванням. Ознаки ураження ЦНС з'являються рідко. У свиноматок порушується лактація, з'являються аборти, мертвонародження і мумифікація плодів.

У підсвинків можуть спостерігатися ознаки катаральної й крупозної пневмонії, якщо нашаровується секундарна інфекція вірусу грипу, сальмонел, пастерел та інших мікроорганізмів.

Особливо важко хворіють поросята-сисуни і після відлучення. У поросят, заражених внутрішньоутробно або в перші 10 діб життя, захворювання частіше проявляється ознаками менінгоенцефаліту. Хворі поросята не можуть рухатися, смоктати, з'являються судоми, слинотеча і спазм глотки. Загибель – через 4–12 год, іноді через добу.

У поросят віком від 10 днів до 4 міс відмічаються ознаки септицемії й менінгоенцефаліту. Спочатку у тварин підвищується температура тіла до 41°С і вище, заявляється пригнічення, слабкість, сонливість, блювання і спрага. Потім розвиваються симптоми ураження ЦНС. Поросята в стані збудження нестримно рвуться вперед, здійснюють манежні рухи; з'являються судоми шийних і жувальних м'язів, мускулатури хребта, характерне прогинання спини. Тварина падає на бік, здійснює судомні рухи кінцівками. Розвиваються паралічі кінцівок, м'язів, гортані та глотки, внаслідок чого втрачається голос (афонія), розвивається сильна слинотеча і слизові витікання з носа. Дихання прискорене, настає набряк легень, повна прострація і загибель через 1–2 доби.

У тварин усіх інших видів унаслідок сильно вираженого нейротропізму вірусу основною клінічною ознакою є ураження ЦНС, що проявляється сильним збудженням, судомами, паралічами.

У *ВРХ* хвороба протікає дуже важко і майже завжди закінчується летально. Відмічають підвищення температури тіла до 42°С, втрату апетиту, припинення жуйки, сильне свербіння, частіше в ділянці голови. Тварина розчісує до крові сверблячі місця. Збудження зростає, тварина реве, стогне, рветься з прив'язі, але агресивності немає. Нерідко спостерігаються судомні скорочення жувальних і шийних м'язів, часті позиви до сечовиділення, слинотеча, пітливість, нервове тремтіння. Тварини ослаблюються, лягають, впадають у прострацію і гинуть через 1–2 доби. Іноді у ВРХ свербіння і розчухів не буває, а спостерігається посилене потовиділення,

слинотеча, атонія рубця, спрага, приступи неспокою, які чергуються з періодом оціпеніння і сонливості. Загибель настає за явищ слабкості.

У *овець* і *кіз* хвороба Ауєскі проявляється такими ж клінічними ознаками, що й у ВРХ. Особливо яскраво виражено свербіння, загальне збудження буває не завжди. Дуже тяжко хворіють ягнята і часто гинуть упродовж першої доби.

У *коней* хвороба протікає доброякісно, триває 3–4 доби і супроводжується незначним підвищенням температури, пригніченням, зниженням апетиту. За злоякісного перебігу спостерігається сильне свербіння в ділянці голови, збудження, утруднене ковтання, слинотеча, потовиділення, судоми і загибель через 1–2 доби.

М'ясоїдні тварини (хутрові звірі, коти, собаки) відмовляються від корму, стають лякливими, неспокійними. Характерною ознакою є сильне свербіння, лише у норок і соболів ніколи не буває свербіння, а переважає коматозний стан. У хворих собак інколи з'являється збудження, яке нагадує сказ: тварини гризуть палки і різні предмети, нападають на інших собак, але агресивності до людей не виявляють. Тварини здебільшого гинуть упродовж 2–3 діб.

У *лисиць* і *песців* хвороба характеризується масовістю і поголовною загибеллю. Захворювання проявляється пригніченням, що змінюється збудженням. Звірятка пищать, хода у них хитка, повільна, голова сіпається, розвиваються паралічі, загибель настає через 1–2 доби. Одужання спостерігається нечасто. У песців відмічають блювання, занепокоєння, розчісування з утворенням глибоких ран (аж до кісток), діарею та апатію. Загибель тварин настає через 2–8 год.

Патологоанатомічні зміни. У всіх тварин, окрім свиней, норок і соболів, виявляють розчухи шкіри з набряком підшкірної клітковини, запалення мозку і мозкових оболонок, крововиливи. У свиней спостерігається набряк легень, катаральне запалення шлунку і кишечнику, серозно-геморагічний риніт і гайморит, набряк гортані. У поросят у мигдаликах, легенях, печінці, селезінці знаходять некротичні фокуси. У поросят до 2-місячного віку оболонки головного і спинного мозку запальні, головний мозок набряклий. У м'ясоїдних у шлунку часто виявляють сторонні предмети; слизові оболонки шлунку і кишечнику гіперемійовані та з крововиливами.

Лабораторна діагностика. Діагноз на хворобу Ауєскі ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

У лабораторію направляють такий патологічний матеріал: від хворих тварин – носовий слиз, абортований плід, плацента; від загиблих тварин – головний мозок, легені, печінка, селезінка, мигдалини, лімфатичні вузли. Для серологічного дослідження – парні сироватки крові.

Для лабораторної діагностики використовують експресні, вірусологічні та ретроспективні методи. *Експрес-методи:* вірусний антиген ідентифікують у РІФ, РНГА, ІЕА, вірусний геному – у ПЛР. *Вірусологічні методи.* Для ізоляції вірусу використовують первинні культури клітин нирок або щитоподібної залози поросят, сім'яників телят, фібробластів курячого ембріона, перещеплювані лінії РК-15 і ВНК-21. Через 4–5 діб з'являється ЦПД: округлення клітин, утворення симпластів і внутрішньоядерних тілець-включень. Ідентифікацію виділеного вірусу проводять у РН, РІФ, РНГА, РДП, ІЕА. Ілюстративним методом лабораторної діагностики хвороби Ауєскі є біопроба на кролях, яких заражають п/ш або в/м. За наявності вірусу через 3–5 діб з'являють типові клінічні клінічні ознаки: збудження, свербіння, розчухи, паралічі, а через 4–8 год тварини гинуть. *Ретроспективна діагностика:* антитіла у парних сироватках крові виявляють у РН, РНГА, РЗК, РДП, РАЛ, ІЕА.

Розроблено також *шкірний алергійний метод* діагностики хвороби Ауєскі, який базується на феномені тестування гіперчутливості уповільненого типу. Цей метод дає змогу в короткий термін поставити діагноз безпосередньо в господарствах.

Диференціаціальна діагностика. Хворобу Ауєскі у всіх видів тварин треба диференціювати насамперед від сказу. Крім того, у свиней слід виключити такі хвороби, як класична чума, грип, тешенська хвороба, сальмонельоз, ешерихіоз (набрякова хвороба), лістеріоз, стрептококоз, сольові отруєння, гіпоглікемія, аскаридоз, авітамінози А і Д; у великої та дрібної рогатої худоби – лістеріоз, ценуроз, кормові отруєння; у коней – східний, західний і венесуельский енцефаломієліти, кормові отруєння; у хутрових звірів – чума м'ясоїдних (нервова форма), ензоотичний енцефаломієліт лисиць; у собак – чума м'ясоїдних (нервова форма).

Імунітет та імунопрофілактика. У результаті захворювання на хворобу Ауєскі формується напружений імунітет. У сироватках крові перехворілих свиней виявляють вірусонейтралізувальні антитіла в титрах 1:32–1:256, які іноді зберігаються до 5 років. У поросят, що народилися від імунних свиноматок, упродовж 24 год після ссання молозива формується колостральний імунітет, який забезпечує їхній захист до 5–7-тижневого віку. Імунізація свиноматок за 2 тижні до опоросу сприяє захисту підсисних поросят від зараження вірусом.

Для імунопрофілактики хвороби Ауєскі розроблені як інактивовані, так і живі вакцини. В Україні застосовують інактивовану культуральну концентровану вакцину проти хвороби Ауєскі хутрових звірів, свиней, овець. Вакцина індукує формування імунітету з 8-го дня після щеплення тривалістю у хутрових звірів до 6 міс, а у свиней та овець – 10 міс. Вакцина АДІВАК – інактивована маркована gE-негативна – використовується в процесі реалізації державної програми з ліквідації хвороби Ауєскі серед свиней. Ефективними є і живі вакцини, зокрема вірусвакцина ВДНКІ на основі штаму, модифікованого в курячих ембріонах і культурі клітин, та вірусвакцина зі штаму БУК-628.

Альфагерпесвірус ВРХ 1 *(Bovine alphaherpesvirus 1)*

Альфагерпесвірус ВРХ 1 є збудником ***інфекційного ринотрахеїту ВРХ*** *(інфекційного пустульозного вульвовагініту ВРХ, ІРТ, ІПВВ).* Це контагіозне захворювання з гострим перебігом, яке характеризується гарячкою, катарально-некротичним запаленням слизових оболонок верхніх дихальних шляхів, кератокон'юнктивітом, ураженням репродуктивних органів і ЦНС, абортами. У телят раннього віку, крім дихальних шляхів, уражається травний тракт.

ІРТ ВРХ уперше описано у США в 1954–1956 рр. як респіраторну хворобу. Інфекцію спостерігали і раніше, особливо її генітальну форму, яку називали ІПВВ. Збудник ІРТ уперше був виділений у культурі клітин у США в 1956 р. У 1958 р. у США виділено аналогічний вірус за ІПВВ і встановлено, що обидві хвороби спричинює один і той самий герпесвірус. На початку 1960-х рр. стало відомо, що вірус має етіологічне значення у виникненні кон'юнктивітів, абортів і менінгоенцефалітів у телят.

Захворювання поширене в США, Канаді, Австралії, Європі та завдає значних економічних збитків. У спеціалізованих господарствах з виробництва яловичини збитки від ІРТ обумовлені загибеллю, вимушеним забоєм, втратою вгодованості і зниженням приростів у перехворілих телят. У племінних господарствах збитки пов'язані із зниженням об'єму еякуляту й активності сперми. Відчутні збитки несуть молочнотоварні ферми і молочні комплекси через тривале безпліддя внаслідок хронічних вульвовагінітів і зниження молочної продуктивності (до 50–60 %) у період хвороби.

ІРТ/ІПВВ – одна з головних проблем молочного і м'ясного скотарства, тому методи діагностики і профілактики цього захворювання визначені стандартами ВООЗт (OIE, 2010, Ch. 2.4.13).

Характеристика вірусу. Альфагерпесвірус ВРХ 1 належить до роду *Varicellovirus* підродини *Alphaherpesvirinae.* Вірус має один серотип, який поділяється на 2 підтипи, та антигену спорідненість зі збудниками ринопневмонії коней і хвороби Марека. Вірус політропний, особливо виражений тропізм проявляє до респіраторних і репродуктивних органів. Вірус аглютинує еритроцити миші, хом'яка, мурчака, пацюка і людини (після попередньої концентрації ПЕГ 6000 або ультрацентрифугуванням).

Культивування. Вірус культивується в первинних культурах клітин нирок і сім'яників телят, нирок ембріона корови, у перещеплюваній клітинній лінії MDBK. ЦПД проявляється через 48–96 год та характеризується округленням клітин, утворенням симпластів і внутрішньоядерних тілець-включень.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Вірус відносно стійкий у зовнішньому середовищі. У замороженій спермі биків-плідників він зберігається 4–12 міс. Сонячні промені інактивують вірус за 2 доби, температура 56 °С – за 20 хв, 37 °С – упродовж 4–10 діб, 22 °С – через 50 діб. Вірус чутливий до ефіру, хлороформу, pH 3,0. Дезінфікуючі розчини гідроксиду натрію (2 %-й), формаліну (1–2 %-й), фенолу (3 %-й) інактивують вірус за 5–10 хв.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. У природних умовах хворіє тільки ВРХ, незалежно від породи і віку. Найтяжче хвороба протікає у відгодівельного молодняка віком до 2 років, особливо у тварин м'ясних порід. У великих відгодівельних господарствах за високої концентрації телят захворюваність становить 80–90 %, загибель – 10–20 %, а в разі ускладнення бактеріальною мікрофлорою (пастерели, мікоплазми тощо) – 30–35 %.

У захворілих телят вірус виявляють у носових витіканнях уже через добу після появи перших клінічних ознак, і він виділяється з носовим слизом упродовж 14 діб. Найбільша концентрація збудника за респіраторної форми хвороби виявляється в носовому слизу на 5–6-ту добу, а за генітальної форми – у вагінальному слизу на 3–6-ту добу. Вірус виділяють також із вмісту кон'юнктивального мішка, трахеального слизу, слини, крові, сечі хворої тварини, а також зі сперми биків-плідників. Вірусовиділення у биків-плідників може тривати до 6 міс, і такі бики заражають корів при спаровуванні. Вірус виділяють також із плаценти через 8 діб після зараження тільної корови, з абортованих плодів. Вірусоносійство у тварин-реконвалесцентів може бути тривалим – до 6–12 і навіть до 19 міс.

Джерелом збудника інфекції є хворі та перехворілі тварини, які виділяють вірус упродовж 6–19 міс після зараження. Особливо небезпечні бики-плідники, які перехворіли на генітальну форму хвороби. Зараження

відбувається в основному аерогенно і шляхом прямого контакту за спаровування. Можлива внутрішньоутробна інфекція. Дуже небезпечна латентна форма інфекції, оскільки вона важко виявляється і може бути причиною епізоотії. Факторами передачі збудника можуть бути контаміновані повітря, корми, предмети догляду, транспортні засоби, сперма, а також птахи, комахи, які мали контакт із хворими тваринами.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Потрапивши на слизові оболонки дихальних або статевих шляхів, вірус проникає в клітини епітелію, де розмножується, зумовлюючи їхню загибель і десквамацію. Далі розвивається запальна реакція, на поверхні слизової оболонки утворюються спочатку дрібні, а потім – обширні ділянки некрозу. Адсорбуючись на лейкоцитах, вірус проникає в кров та спричинює вірусемію, яка проявляється загальним пригніченням і гарячкою. За проникнення вірусу через плацентарний бар'єр у тільних корів розвивається ураження плаценти, матки і плоду. У разі проникнення вірусу через гематоенцефалічний бар'єр у телят у віці 2–6 міс розвивається енцефаліт. У телят раннього віку, крім дихальних шляхів, уражається шлунково-кишковий тракт.

Клінічні ознаки. Залежно від локалізації інфекційного процесу розрізняють такі клінічні форми хвороби: респіраторна, геніальна, кератокон'юнктивальна, нервова (енцефаломіелітна), шкірна, ерозійний стоматит, інфекція тільних корів. Найчастіше ІРТ протікає в двох основних формах: респіраторній і генітальній.

За *респіраторної форми* хвороби відмічають підвищення температури тіла до 40–42 °С, пригнічення, гіперемію слизової оболонки верхніх дихальних шляхів, серозні витікання з носа, сухий, болючий кашель, пінисте слиновиділення. Слизова оболонка носа набуває інтенсивного темно-червоного забарвлення, і за цією ознакою ІРТ отримав назву хвороби «червоний ніс». На носовому дзеркалі й слизовій оболонці носа з'являються виразки, вкриті некротичними кірками. В окремих тварин відмічають кон'юнктивіт, запалення суглобів, кульгавість. У телят хвороба може супроводжуватися діареєю. За доброякісного перебігу тварина одужує на 7–10-ту добу. У разі ускладнення супутньою мікрофлорою розвиваються пневмонії, і прогноз несприятливий.

За *генітальної форми* у самок розвивається пустульозний вульвовагініт, у самців – баланопостит. На слизовій оболонці вульви, вагіни і препуція розвивається гіперемія, набряк, з'являються міхурці, заповнені прозорою рідиною, які зливаються, тріскаються та на їхньому місці утворюються виразки, вкриті слизом і плівками фібрину. Із статевих органів

виділяються слизово-гнійні витікання. За неускладненого перебігу через 10–14 діб настає одужання.

У биків хвороба часто протікає субклінічно, безсимптомно. При цьому здорові на вигляд тварини виділяють вірус зі спермою і заражають маточне поголів'я. Серед корів у зоні використання сперми від латентно інфікованих биків спостерігається висока яловість (60 %), масові перегули (70 %), низький вихід телят (45–60 %). У 50–60 % корів виявляють пустульозний вульвовагініт, гнійні ендометрити й інші ураження репродуктивних органів.

Кератокон'юнктивальна форма може траплятися самостійно або одночасно з респіраторною формою. Вона буває у телят 2–6-місячного віку і проявляється запаленням кон'юнктиви, рогівки і слизової оболонки третього віка. Зазвичай кон'юнктивіти супроводжуються сльозотечею, світлобоязливістю й утворенням своєрідної зернистості (шорсткості) на поверхні слизової оболонки ока внаслідок утворення некротичної плівки сірого кольору. Загалом кератокон'юнктивальна форма хвороби протікає доброякісно і закінчується одужанням.

Нервова (енцефаломієлітна) форма трапляється іноді в телят. Вона характеризується порушенням координації руху, збудженням, яке чередується з пригніченням, і завжди закінчується летально.

Шкірна форма. Деякі дослідники виділяють ураження шкіри як самостійну форму клінічного прояву ІРТ. Проте частіше герпетичні дерматити реєструються одночасно з ураженням статевих органів у биків-плідників. При цьому на шкірі в ділянці ануса, основи хвоста, проміжності, ягідниць і мошонки з'являється облисіння, екземоподібне висипання, крустозний і пустульозний дерматит.

Ерозійний стоматит проявляється в основному в телят до 3-тижневого віку і супроводжується підвищенням температури тіла до 41 °С, сильним пригніченням, інтенсивною слинотечею, запаленням і множинними ерозіями на носовому дзеркалі. Пізніше розвиваються симптоми ураження респіраторного тракту: кашель, задишка, слизово-гнійні витікання з носа.

Аборти як прояв ІРТ реєструються у нетелів частіше, ніж у корів. Такі тварини за кілька тижнів до аборту зазвичай хворіють на респіраторну форму хвороби. Інтервал між зараженням та абортом частіше буває 15–30 діб, але може коливатися від 9 до 105 діб. Аборти часто супроводжуються затримкою посліду і некрозом плаценти. Після аборту можуть розвиватися ендометрити і тривале зниження молочної продуктивності.

Патологоанатомічні зміни. Характер уражень залежить від форми прояву хвороби. За *респіраторної форми* у верхніх дихальних шляхах виявляють

скопичення слизово-гнійного ексудату з домішками фібрину, набряк слизової оболонки з вогнищами некрозу, виразками і крововиливами, гіперемію регіонарних лімфатичних вузлів. Також може бути незначний набряк і гіперемія слизової оболонки шлунку й кишечнику. У разі ускладнених форм хвороби трапляється катаральна і гнійно-катаральна бронхопневмонія.

За *генітальної форми* виявляють набряк, везикули і виразки на слизових оболонках статевих органів, за ускладнень – ендометрити. Абортовані плоди набряклі, на шкірі й у печінці виявляють вогнища некрозу, навколониркова тканина просочена геморагічним ексудатом, на серозних оболонках крововиливи. За гістологічного дослідження в клітинах епітелію уражених слизових оболонок виявляють внутрішньоядерні тільця-включення.

За *нервової форми* спостерігають набряк мозкових оболонок і крововиливи.

Лабораторна діагностика. Діагноз на інфекційний ринотрахеїт (інфекційний пустульозний вульвовагініт) ВРХ ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

Матеріалом для лабораторного дослідження слугують: за респіраторної форми – змиви з носової порожнини, очей, слизова оболонка носа, трахеї, легені, парні сироватки крові; за генітальної форми – абортований плід, зіскріби із слизової оболонки піхви, препуція, сперма биків-плідників; за нервової форми – головний мозок.

Лабораторна діагностика включає експресні, вірусологічні та ретроспективні методи. *Експрес-методи:* вірусні антигени ідентифікують у РІФ та ІЕА, вірусний геном – у ПЛР; певне діагностичне значення має виявлення внутрішньоядерних тілець-включень методом світлової мікроскопії. *Вірусологічні методи.* Для ізоляції вірусу з патматеріалу заражають первинні культури клітин нирок ембріона корови, нирок або сім'яників телят, перещеплювану клітинну лінію MDBK. Через 2–4 з'являється доби ЦПД: округлення клітин, утворення симпластів і внутрішньоядерних тілець-включень. Для індикації вірусу ставлять РГА (з еритроцитами миші). Ідентифікацію виділеного вірусу проводять у РН, РІФ, РЗГА та ІЕА. *Ретроспективна діагностика:* антитіла в парних сироватках крові виявляють у РН, РНГА та ІЕА. *Диференціальна діагностика:* ІРТ ВРХ треба диференціювати від парагрипу-3, вірусної діареї, аденовірусної інфекції, респіраторно-синцитіальної інфекції, злоякісної катаральної гарячки, ящуру та хламідіозу.

Імунітет та імунопрофілактика. Тривалість постінфекційного імунітету за ІРТ ВРХ не менше 1,5–2 років. Гуморальні антитіла в титрах 1 : 4–1 : 8 захищають організм від зараження. Однак у тварин-реконвалесцентів, які

мають антитіла, стан абсолютної імунності буває нечасто, імунітет нестерильний, і вони тривалий час залишаються вірусоносіями. Збудник здатний персистувати в організмі реконвалесцентів і виділятися в зовнішнє середовище в періоди рецидивів. Отже, реконвалесценти є постійним джерелом інфікування інших тварин. У тварин, які перехворіли на респіраторну форму ІРТ, імунітет більш напружений, ніж за ІПВВ.

У регіонах, де трапляється ІРТ ВРХ, у тварин у перші 2–6 міс життя виявляють колостральні антитіла. Титр їх залежить від рівня антитіл у матері й кількості молозива, спожитого новонародженими в перші дні життя. Постінфекційні й молозивні антитіла інгібують утворення противірусних антитіл у відповідь на введения вакцини.

Для імунопрофілактиии ІРТ ВРХ розроблені живі й інактивовані вакцини, моно- та асоційовані, які включають в різних поєднаннях збудники ПГ-3, ІРТ, ВД, адено- і реовіруси ВРХ.

В Україні для імунопрофілактики ІРТ ВРХ застосовують три вакцини: суху вірусвакцина ТК-А (ВІЕВ), інактивовану вакцину і живу ліофілізовану вакцину «Бівак» проти ІРТ і ПГ-3 ВРХ. Тривалість поствакцинального імунітету – 6–12 міс. Для пасивної імунізації телят використовують полівалентну сироватку ІРТ, ПГ-3, ВД, ротавірусної та коронавірусної інфекцій ВРХ.

У РФ розроблені асоційовані інактивовані вакцини: 1) Комбовак – проти ІРТ, ПГ-3, аденовірусної інфекції та ВД ВРХ; 2) Комбовак-А – проти ІРТ, ПГ-3, ВД, РС, рота-, корона- та аденовірусної инфекцій ВРХ; 3) Тривак (ВИЭВ) – проти ІРТ, ПГ-3 і ВД ВРХ.

За кордоном розроблені марковані вакцини, які в поєднанні з відповідними діагностичними підходами дають змогу диференціювати інфікованих тварин від вакцинованих (стратегія DIVA – differentiation of infected from vaccinated animals). Завдяки стратегії DIVA ІРТ/ІПВВ вважається повністю ліквідованим в Австрії, Данії, Фінляндії, Швеції, Швейцарії й Норвегії. Нині такі програми успішно реалізуються в Німеччині та Італії.

Альфагерпесвіруси коней 1 і 4 *(Equid alphaherpesviruses 1, 4)*

Альфагерпесвіруси коней 1 і 4 є збудниками ***ринопневмонії коней (вірусного аборту кобил)***. Це контагіозне захворювання з гострим перебігом, яке характеризується гарячкою, кон'юнктивітом, катаральним запаленням слизових оболонок верхніх дихальних шляхів і раптовими абортами в другій половині жеребності. Захворювання може охопити 40–90 % жеребних кобил, в яких іноді виникають ускладнення у вигляді паралічів.

Хвороба вперше описана у США: упродовж 1922–1932 рр. зареєстровано кілька епізоотій інфекційного аборту одночасно з ураженням дихальних шляхів, що не було пов'язано з якою-небудь бактеріальною інфекцією. У 1936 р. у США доведено вірусну етіологію масових абортів у кобил.

Ринопневмонія коней набула значного поширення в багатьох країнах Європи, Азії, Африки й Америки, про що свідчить серологічний моніторинг поголів'я. Захворювання проявляється у вигляді ензоотичних спалахів, які в умовах незадовільного утримання тварин іноді набувають масового характеру. Виникненню хвороби сприяють близькородинне розведення і слабка конституція коней. Захворіти можуть 40–60 % і навіть до 90 % жеребних кобил. Зареєстровані випадки загибелі 0,5–5 % жеребних кобил. Економічні збитки значні, оскільки масові аборти порушують цикл відтворення стада і гальмують проведення племінної роботи.

Характеристика вірусів. Альфагерпесвірус коней 1 (збудник вірусного аборту кобил) та альфагерпесвірус коней 4 (збудник ринопневмонії коней) належать до роду *Varicellovirus* підродини *Alphaherpesvirinae.* Віруси аглютинують еритроцити коня й мурчака і проявляють тропізм до епітеліальної й ендотеліальної тканин.

Культивування. Віруси культивують у первинних культурах клітин нирок коня, ембріона корови, ембріона свині або кроля, а також у перещеплюваних клітинних лініях Hela, КВ, Детройт-6, РК-15. ЦПД з'являється через 3–5 діб після зараження та характеризуються округленням клітин, утворенням симпластів і внутрішньоядерних тілець-включень.

Віруси культивують також у 8–12-добових курячих ембріонах за різних методів зараження (у жовтковий мішок, алантоїсну або амніотичну порожнини), внаслідок чого на ХАО утворюються некротичні вузлики (віспини) й ембріони гинуть.

До вірусів чутливі також білі мишенята-сисунці й 3–4-добові хом'ячки, які гинуть за будь-якого методу зараження (і/ц, і/н, п/ш, в/ч). У деяких випадках ставлять біопробу на вагітних мурчаках, заражаючи їх в/ч, що спричинює аборт або загибель.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Віруси досить стійкі в зовнішньому середовищі. У патологічному матеріалі при –18...–20 °С зберігаються 2 роки, в абортованому плоді при 4 °С – тиждень, на шерсті коня – 6 тижнів, у темному приміщенні при 20–27 °С – 2 тижні. Віруси інактивуються за температури 56 °С у культуральній рідині за 10 хв, при 37 °С – за 1–7 діб, при 18–20 °С – за 7–8 діб, при 4 °С – за 7–8 міс, при –18...–20 °С – за 12–14 міс.

Чутливі до ефіру, хлороформу, дезоксихлорату натрію, 3 %-го формальдегіду, 4 %-го гідроксиду натрію, pH 3,0.

Патогенність і шляхи передачі збудників інфекції. У природних умовах хворіють коні, осли, мули й поні всіх вікових груп і порід, незалежно від статі. Найбільш сприйнятливі чистопородні коні та молодняк віком до року.

Джерелом збудника інфекції є хворі й перехворілі тварини, які виділяють вірус із видихуваним повітрям, виділеннями із носа і статевих органів упродовж 2 міс, а також з абортованим плодом. Небезпечне джерело збудника інфекції – латентні вірусоносії, що можуть виділяти вірус у навколишнє середовище впродовж багатьох місяців і навіть років.

Основний шлях зараження – повітряно-крапельний. Окрім того, зараження відбувається аліментарно, статево і внутрішньоутробно. Факторами передачі збудника є інфіковані корми, вода, підстилка, предмети догляду, забруднені виділеннями хворих тварин.

У благополучні господарства вірус заноситься з хворими кіньми і вірусоносіями. Якщо не знищувати плідні оболонки й абортовані плоди, збудник може розноситися зі шматочками тканин м'ясоїдними тваринами (собаками, лисицями) і дикими птахами. За первинного спалаху хвороба протікає у вигляді ензоотії, під час якої абортує 40–60 % жеребних кобил, а в стаціонарно неблагополучних вогнищах – до 90 %. У районах інтенсивного ведення конярства захворювання може набути епізоотичного поширення. Респіраторна форма хвороби частіше виникає в холодну пору року за зниження природної резистентності

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Віруси потрапляють в організм найчастіше аерогенним шляхом, розмножуються в клітинах слизової оболонки верхніх дихальних шляхів і кон'юнктиви, зумовлюючи катаральне запалення (риніт або ринопневмонію). Потім через лімфатичні судини і капіляри віруси проникають в кров і поширюються по всьому організму. Віруси обумовлюють значну імуносупресію, що супроводжується лейкопенією та зниженням кількості Т- і В-лімфоцитів. У жеребних кобил вірус долає плацентарний бар'єр, потрапляє в матку, плід і навколоплідні оболонки, де репродукується, обумовлюючи некрози в печінці, селезінці, легенях. Патологічний процес у тканинах плоду призводить до його загибелі та аборту. У кобил вірус може пройти гематоенцефалічний бар'єр і спричинити розсіяний менінгоенцефаліт.

Клінічні ознаки. Інкубаційний період триває 3–4 тижні. Розрізняють три клінічні форми хвороби.

Респіраторна форма виникає на початку епізоотії найчастіше в лошат віком 6–9 міс. Вона характеризується підвищенням температури тіла до 40 °С, пригніченням, катаральним запаленням верхніх дихальних шляхів, кон'юнктивітом. Риніт супроводжується витіканнями з носа, збільшенням підщелепових лімфатичних вузлів. Легені уражаються нечасто. Хвороба протікає легко, і на 10–15-ту добу настає видужування. За поганих умов утримання розвивається пневмонія, нашаровується секундарна інфекція, що призводить до летального наслідку.

Абортивна форма спостерігається в жеребних кобил після захворювання на респіраторну форму або без респіраторного синдрому. Тварини абортують через 10–150 діб після зараження, зазвичай на 8–11-му місяці жеребності, раптово без передвісників. Родові шляхи швидко приходять до норми, післяродових ускладнень не спостерігається. Кобили, заражені після 9-го місяця жеребності, можуть народити мертве або нежиттєздатне лоша.

Нервова форма трапляється у кобил після аборту як ускладнення у вигляді парезів та паралічів і завжди закінчується летально.

Патологоанатомічні зміни характеризуються ураженнями, типовими для септицемії, а саме: 1) гіперемія та набряк слизових оболонок верхніх дихальних шляхів і легень; 2) крововиливи на слизових і серозних оболонках; 3) набряк селезінки і лімфовузлів; 4) у кобил за нервової форми – менінгоенцефаломієліт; 5) в абортованих плодів – жовтяничність підшкірної клітковини, накопичення серозно-геморагічного ексудату в грудній і черевній порожнинах, набряк легень.

Лабораторна діагностика. Діагноз на ринопневмонію коней (вірусний аборт кобил) ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

Для лабораторної діагностики направляють такий патологічний матеріал: за життя – кров, змиви з носової порожнини і вагіни; після загибелі – слизова оболонка носа, легені, печінка, селезінка і тимус абортованих плодів або новонароджених лошат, плацента, від дорослих тварин – головний і спинний мозок (за наявності паралічів). Для серологічного дослідження – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика ґрунтується на експресних, вірусологічних і ретроспективних методах. *Експрес-методи:* ідентифікація вірусного антигену у РІФ, РЗК та ІЕА, вірусного геному – у ПЛР; виявлення внутрішньоядерних тілець-включень методом світлової мікроскопії. *Вірусологічні методи.* Ізоляцію вірусу проводять у культурах клітин, курячих ембріонах або в організмі лабораторних тварин. 1) Заражають первинні культури

клітин нирок коня, ембріона корови, ембріона свині або кроля. Через 3–5 діб з'являється ЦПД: округлення клітин, утворення симпластів і внутрішньоядерних тілець-включень. Для індикації вірусу ставлять РГАд і РГА (з еритроцитами коня). 2) Заражають курячі ембріони віком 8–12 діб у жовтковий мішок, алантоїсну порожнину або амніон. Через 4 доби ембріони гинуть. За розтину на ХАО виявляють віспини, а в клітинах ХАО – внутрішньоядерні тільця-включення. 3) Біопроба на вагітних мурчаках, заражають їх в/ч. Через – 20 діб виникає аборт або загибель із характерними патологоанатомічними змінами: некрози в печінці, крововиливи в легенях, гастроентерит. Із печінки й абортованих плодів за необхідності виділяють вірус. 4) Біопроба на 3–4-денних хом'ячках або білих мишенятах, заражають їх і/ц, і/н, п/ш або в/ч. У разі наявності вірусу тварини гинуть за і/ц зараження через 12–24 год з ознаками ураження ЦНС. За інших методів зараження загибель настає через 5–8 діб. За розтину встановлюють патоморфологічні зміни: енцефаломієліт або гепатит (залежно від методу зараження), внутрішньоядерні тільця-включення. З головного мозку і печінки загиблих тварин за необхідності виділяють вірус. Ідентифікацію виділеного вірусу проводять у РІФ, РДП, РН, РЗГА, РЗГАд, ІЕА. *Ретроспективна діагностика:* антитіла в парних сироватках крові виявляють у РН, РЗК, РЗГА, ІЕА. *Диференціальна діагностика* передбачає виключення грипу коней, риновірусної та аденовірусної інфекцій, вірусного артеріїту, сальмонельозу.

Імунітет та імунопрофілактика. Постінфекційний імунітет за респіраторної форми хвороби триває 3–6 міс. За абортивної форми формується більш напружений імунітет – не менше 2 років. Молозивний імунітет у лошат триває 3 тижні, а до 2–3-місячного віку титр пасивних антитіл поступово знижується.

Для імунопрофілактики ринопневмонії коней застосовують живі й інактивовані вакцини. Жива культуральна вакцина із штаму СВ/69 використовується для імунізації кобил на 3–4-му місяці жеребності, молодняку і жеребців. Поствакцинальний імунітет триває до 6 міс.

Отримані атенуйовані вакцинні штами RAC-H (шляхом пасажування на хом'ячках і в первинній культурі клітин нирок телят), ВС та альфагерпесвірусу коней 4 (у первинній культурі клітин сім'яників поросят). Розроблена жива асоційована вакцина, яка містить штами альфагерпесвірусів коней 1 і 4.

У Франції сконструйована інактивована гідроокисалюмінієва асоційована вакцина проти грипу, ринопневмонії та реовірусної інфекції коней. У Польщі використовують три інактивовані вакцини: Equivac RP,

Prevaccinol і RPK. Схема імунізації кобил включає триразове введення препаратів: до парування, на 3–4-му і 7–9-му місяцях жеребності.

Альфагерпесвіруси курячих 2 і 3 *(Gallid alphaherpesviruses 2, 3)*

Альфагерпесвіруси курячих 2 і 3 є збудниками ***хвороби Марека*** *(нейролімфоматозу птахів)*. Це висококонтагіозна хвороба птахів ряду курячих, яка характеризується за гострої форми проліферацією клітин лімфоретикулярної тканини з утворенням пухлин у внутрішніх органах, шкірі й м'язах, а за класичної форми – ураженням центральної та периферійної нервової системи й очей.

Уперше хворобу описав в 1907 р. угорський професор Й. Марек під назвою «поліневрит». У наступні роки в різних країнах вона реєструвалася як параліч, нейролімфоматоз, інфекційний нейрогранульоматоз та ензоотичний нейроенцефаломієліт птахів. І лише починаючи з 1960 р., на честь першовідкривача це захворювання називають хворобою Марека. Вперше вірус був ізольований у культурі клітин в Англії в 1967 р.

Хвороба Марека поширена в країнах із розвинутим птахівництвом (зокрема і в Україні) і завдає значних економічних збитків Вони пов'язані з високою захворюваністю (40–85 %), летальністю (3–80 %), зниженням продуктивності дорослих курей і витратами на проведення заходів щодо ліквідації спалахів захворювання.

Характеристика вірусів. Альфагерпесвіруси курячих 2 і 3, належать до роду *Mardivirus* підродини *Gammaherpesvirinae.* Віруси можуть бути клітинно-зв'язаними і вільними від клітин. Вони мають складну антигенну структуру. Виявлено 6 антигенів, серед яких найважливішими є антигени А, В і С. Антиген А міститься в культуральній рідині інфікованої культури клітин і в екстракті заражених клітин. Антигени В і С виявляються лише в екстракті інфікованих клітин. Антиген В є спільним для альфагерпесвірусів курячих 2 і 3 та альфагерпесвірусу індиків 1, тоді як інші антигени цих вірусів споріднені, але не ідентичні.

Альфагерпесвіруси курячих 2 і 3 характеризується чітко вираженим тропізмом до Т-лімфоцитів. Альфагерпесвірус курячих 2 має онкогенні властивості, альфагерпесвірус курячих 3 – неонкогенний.

Культивування. Альфагерпесвіруси курячих 2 і 3 культивують у курячих ембріонах, заражаючи їх на ХАО (10–12-добового віку) або в жовтковий мішок (4–5-добового віку). Загибель ембріонів вважається специфічною в разі зараження на ХАО через 3 доби, а в жовтковий мішок – на 8–9-ту

добу. За розтину на всій поверхні ХАО виявляють вогнища клітинної проліферації – пустули, або бляшки, діаметром 1–3 мм, збільшення селезінки і печінки. Печінка – зеленого або темно-коричневого кольору з білими вогнищами проліферації клітин.

Віруси культивують також у первинних культурах клітин нирок курячих ембріонів або курчат, фібробластів курячих або качиних ембріонів. Строки появи ЦПД залежать від дози вірусу і кількості пасажів. За первинного виділення вірусу ЦПД зазвичай проявляється в 2–3-му пасажі і характеризується утворенням скупчень округлих рефрактильних клітин і симпластів. У заражених клітинах з'являються внутрішньоядерні тільця-включення. Нездатність вірусів у культурі клітин виділятися в позаклітинне середовище зв'язана з їхньою внутрішньоцитоплазматичною деструкцією.

За серійних пасажів у культурі клітин курячих ембріонів віруси втрачають патогенність (онкогенність) для курчат. Тривале пасажування вірусу в культурі клітин призводить до зникнення А-антигену, тому за вивчення антигенної структури вірус можна пасажувати не більше 10 разів.

За бляшкоутворенням у культурі клітин альфагерпесвіруси курячих 2 і 3 поділяють на три групи: 1) високоонкогенні ізоляти, які спричинюють утворення бляшок середніх розмірів; 2) неонкогенні ізоляти, які обумовлюють утворення дрібних бляшок; 3) атенуйовані віруси, який спричинюють утворення великих бляшок. Існує зв'язок між бляшкоутворенням і патогенністю виділених польових штамів збудників хвороби Марека.

Віруси можна культивувати в органних культурах нирок, селезінки, гонад і легень курчат 3–4-тижневого віку.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Віруси досить стійкі за умови збереження структурної цілісності клітин. Кров і пухлинний матеріал від хворих птахів можуть тривало зберігатися в рідкому азоті при –196 °С. Однак при –25...–70 °С такий матеріал швидко втрачає інфекційність. Саме ця обставина тривалий час була причиною невдалих спроб виділення вірусів від птахів.

Віруси, які містяться в пилу курника, зберігають інфекційність упродовж року. У висохлих епітеліальних клітинах пір'яних фолікул, які потрапляють у послід, підстилку і повітря пташника, віруси інфекційні до 8 міс, у лусочках шкіри (лупи) хворих птахів і в подрібненому сухому пір'ї при 28–41 °С – упродовж 55 діб. Шкіру й епітелій пір'яних фолікул, які містять клітинно-вільний вірус, зберігають за температури –20...–60 °С або ліофілізують.

За дії 3%-го розчину гідроксиду натрію, креоліну, лізолу, 1% -го розчину формальдегіду, освітленого хлорного вапна, що містить 3% активного хлору, та інших дезінфікуючих засобів віруси інактивуються впродовж 15–20 хв.

Патогенність і шляхи передачі збудників інфекції. Альфагерпесвіруси курячих 2 і 3 взаємодіють із чутливими клітинами в трьох варіантах. У пухлинних клітинах хворих птахів молекулярно-генетичними методами виявляють вірусний геном, інтегрований із клітинним геномом. Усі пухлинні клітини містять від 3 до 12 вірусних ДНК. У клітинах фабрицієвої сумки та інших лімфоїдних органів віруси знаходяться у вигляді специфічних антигенів, які постійно виявляються за допомогою РІФ. У клітинах епітелію пір'яних фолікулів віруси присутні у вигляді повноцінних віріонів, патогенних і стійких до чинників зовнішнього середовища.

В організмі інфікованих птахів віруси репродукуються і дозрівають лише в епітеліальних клітинах пір'яних фолікулів, де інфекційні віріони зв'язані з великою кількістю цитоплазматичних включень. У разі відторгнення пір'яних фолікулів віруси разом із лупою потрапляють у корми, повітря, підстилку, де можуть зберігатися тривалий час і спричиняти зараження сприйнятливих птахів. На відміну аттенуйовані та природно послаблені вакцинні штами вірусів не дозрівають у пір'яних фолікулах, і тому щеплені птахи не передають вірус у разі контакту.

У природних умовах хворіють кури, а також індики, перепілки, фазани, качки, лебеді й куріпки. Найбільш чутливі курчата в перші 2 тижні життя, захворюваність серед яких досягає 85%.

Захворюваність і вираженість патологічного процесу багато в чому залежить від віку, статі, спадкової стійкості певних ліній і родин птахів, стану пасивного імунітету, вірулентності, інфікувальної дози вірусу і способу зараження. За хвороби Марека виявлена генетична схильність організму до резистентності або сприйнятливості.

Основне джерело збудника інфекції – хворі птахи, які виділяють віруси в навколишнє середовище через 1–3 тижні після зараження, а також латентні вірусоносії. Вірусовиділення здійснюється через дихальний і травний тракти та з десквамованим епітелієм пір'яних фолікулів. Зараження курчат за контакту не відбувається доти, поки віруси не розмножаться в епітеліальних клітинах пір'яних фолікулів. Існує прямий зв'язок між дозріванням вірусів у клітинах пір'яних фолікул і контагіозністю хвороби. У перехворілих птахів встановлено тривале вірусоносійство – 16–24 міс і навіть довічне в присутності специфічних антитіл.

Основні вхідні ворота інфекції – дихальні шляхи. У природних умовах вірус передається двома шляхами: вертикальним – через ембріони від хворих курок-несучок (вірусоносіїв) і горизонтальним – прямим і непрямим контактом птахів із джерелом збудника інфекції. Зараження відбувається переважно через дихальні шляхи, а також аліментарно і трансоваріально.

Резервуаром збудника інфекції можуть бути комахи, кліщі, жуки і дикі птахи. З органів (печінка, селезінка, нирки) ворон і шпаків виділено збудники хвороби Марека. Факторами передачі вірусу можуть бути продукти забою хворих птахів, контаміновані виділеннями інфікованих птахів корми, вода, предмети догляду, обслуговуючий персонал. Поширенню інфекції сприяють гельмінти, кокцидії та кліщі.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Після проникнення вірус адсорбується лейкоцитами крові, розноситься по організму і локалізується в лімфоїдних органах (селезінці, фабрицієвій сумці, тимусі, мигдаликах, сліпій кишці). Репродукція вірусу здійснюється в лімфоїдних органах, епітеліальних клітинах ниркових канальців і особливо – в пір'яних фолікулах. Відбувається проліферація лімфоїдних клітин із наступною інфільтрацією периферійних нервів, мозку, очей, м'язів, внутрішніх органів. Інфекція лімфоїдних клітин призводить до трансформації й утворенню пухлин. За тяжкого розвитку проліферативних пропесів настає загибель.

Клінічні ознаки. Інкубаційний період триває від 12 до 150 діб і більше. Чим вищий генетичний потенціал породи птахів, тим сприйнятливіша вона до вірусу і тим коротший інкубаційний період. Смертність коливається у значних межах – 3–80%.

Хвороба Марека клінічно проявляється у двох формах: класичній і гострій, що, вочевидь, пов'язано з різною вірулентністю штамів збудника, інфікувальною його дозою та імунологічною реактивністю організму.

Класична форма характеризується ураженням периферійної й центральної нервової системи та проявляється кульгавістю, атаксією, парезами, паралічами крил, шиї й хвоста. У хворих птахів уражаються очі: змінюється колір райдужної оболонки (сіроокість), зіниця стає вузькою, зірчастою, грушоподібною, може зовсім зникнути, внаслідок чого настає часткова або повна сліпота. Хворі птахи гинуть у 3–5-місячному віці від дегідратації й виснаження. Летальність коливається від 1 до 30%.

Для *гострої форми* хвороби Марека властиві клінічні ознаки, які нагадують лімфоїдний лейкоз птахів. Уражаються птахи віком від 4 до 22 тижнів.

Хвороба починається раптово і впродовж 1–2 тижнів охоплює все поголів'я. Основні клінічні ознаки: депресія, відмова від корму, розлад травлення, атаксія, дегідратація, виснаження. Також може уражатися райдужна оболонка і виникати парези і паралічі. Летальність досягає 30 %, зумовлена утворенням пухлин у внутрішніх орнанах.

Патоморфологічні зміни. За класичної форми хвороби в трупах птахів виявляють дифузні або вогнищеві потовщення нервових стовбурів, зміну їхнього кольору (жовте забарвлення). У 2–10 % випадків виявляють пухлини, в основному в яєчниках і сім'яниках. За гострої форми встановлюють пухлини у внутрішніх органах, шкірі, м'язах, знаходять характерні зміни в центральній і периферійній нервовій системі.

Патоморфологічні зміни у внутрішніх органах розвиваються ще до клінічного прояву хвороби та характеризуються лімфоїдно-клітинною інфільтрацією уражених органів і тканин. У периферійних нервах знаходять набряклість, дифузно-вогнищеву лімфоїдно-клітинну інфільтрацію нервового стовбура та його сполучної оболонки. Уражені нерви потовщені в 3–5 разів, набряклі, мають жовтуватий колір. За ураження вісцеральних органів патологічні зміни характеризуються проліферацією сполучної тканини. Райдужна оболонки інфільтрована лімфоідними і псевдоеозинофільними клітинами, рідше – плазмоцитами.

Лабораторна діагностика. Діагноз на хворобу Марека ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патоморфологічних змін і результатів лабораторних досліджень.

У лабораторію надсилають 5–10 клінічно хворих курчат, від яких беруть кров і пір'я; від загиблих птахів – паренхіматозні органи, яєчники, сім'яники, серце, фабрицієву сумку, тимус, шкіру, м'язи, головний мозок, периферійні нерви (плечового і крижово-сідничного сплетінь). Для серологічного дослідження – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика базується на експресних, вірусологічних і ретроспективних методах. *Експрес-методи:* ідентифікація вірусного антигену в РІФ, РДП, ІЕА; вірусного геному – у ПЛР; виявлення внутрішньоядерних тілець-включень методом світлової мікроскопії. *Вірусологічні методи.* Для ізоляції вірусу використовують курячі ембріони, культури клітин, іноді ставлять біопробу на курчатах. 1) Курячі ембріони заражають на ХАО (10–12-добові) або в жовтковий мішок (4–5-добові). Загибель відповідно через 3 або 8–9 діб із характерними патологоанатомічними змінами: на ХАО – сіро-білі вогнища клітинної проліферації (пустули, або бляшки), збільшення печінки і селезінки. 2) Заражають первинні культури клітин

нирок курячого ембріона або курчат, фібробластів курячого чи качиного ембріона. ЦПД зазвичай виявляється лише у 2–3-му пасажі через 4–5 діб після зараження і характеризується округлення клітин, утворенням симпластів і внутрішньоядерних тілець-включень. 3) З метою визначення вірулентності вірусу ставлять біопробу на одноденних курчатах, які не мають материнських антитіл. Курчат заражають в/ч або п/ш. За наявності вірусу через 1–3 міс розвиваються характерні клінічні ознаки хвороби, курчата гинуть, при розтині встановлюють патоморфологічні зміни. Ідентифікацію виділеного вірусу проводять у РДП, РІФ та ІЕА. *Ретроспективна діагностика:* антитіла в парних сироватках крові виявляють у РДП та ІЕА. *Диференціальна діагностика:* хворобу Марека необхідно диференціювати від лімфоїдного лейкозу, інфекційного енцефаломієліту, ньюкаслської хвороби, лістеріозу, авітамінозів В, Е і Д, кормових отруєнь.

Імунітет та імунопрофілактика. Основну роль у резистентності до хвороби Марека відіграє клітинний імунітет. Він спрямований проти пухлин і зумовлений накопиченням у крові інфікованих птахів цитотоксичних Т-лімфоцитів, які лізують лімфобластоїдні клітини.

В імунітеті до хвороби Марека відіграють певну роль і гуморальні антитіла. Вірусонейтралізувальні й препипітувальні антитіла з'являються через 1–3 тижні після зараження або вакпинації і зберігаються 18 міс. Проте специфічні антитіла не перешкоджають розвитку вірусемії та не забезпечують стійкості до зараження. У перехворілих птахів у 80–90 % випадків виявляють тривале вірусоносійство за наявності специфічних антитіл, яке може бути навіть довічним. Перехворювання та імунізація практично не впливають на циркуляцію епізоотичного штаму вірусу.

Інфіковані кури-несучки передають потомству через жовток антитіла, які зазвичай зберігаються до 3-тижневого віку, але не захищають від зараження. Материнські антитіла гальмують імунну відповідь на вакцинацію. Клітинно-вільний вірус більш чутливий до материнських антитіл, ніж клітинно-зв'язаний.

Хвороба Марека – єдина пухлинна хвороба, яка ефективно піддається вакцинопрофілактиці. Для імунопрофілактики хвороби Марека в нашій країні використовують рідку і суху культуральні вірусвакцини проти хвороби Марека з авірулентного штаму ФС-126 альфагерпесвірусу індиків 1. Вакцинний вірус культивують культурі клітин фібробластів курячих, качиних або перепелиних ембріонів. Імунітет настає через 3–4 тижні і зберігається довічно.

5.1.4. Родина *Adenoviridae* (аденовіруси)

Назва родини *Adenoviridae* походить від грец. αδένας – залоза. Аденовіруси вперше були ізольовані в 1953 р. у США в первинних культурах клітин, які готували з мигдаликів та аденоїдів, видалених за операцій у часто хворіючих дітей.

Згідно з інформацією МКТВ (2020), родина *Adenoviridae* об'єднує 5 родів і 80 видів.

1. Рід *Atadenovirus* (8 видів): атаденовіруси овець D*, великої рогатої худоби D, оленів A, опосумів A, качок A, папуг A, змій A, ящірок A. **2.** Рід *Aviadenovirus* (15 видів): авіаденовіруси курей A*, B, C, D, E, гусей A, качок B, індиків B, C, D, голубів A, B, соколів A, папуг B, C. **3.** Рід *Ichtadenovirus* (1 вид): іхтаденовірус осетрових A*. **4.** Рід *Mastadenovirus* (50 видів): мастаденовіруси людини C*, A, B, D, E, F, G, великої рогатої худоби A, B, C, овець A, B, C, оленів A, свиней A, B, C, коней A, B, собак A, білих ведмедів A, мавп A, B, C, D, E, F, G, H, I, широконосих мавп A, скунсів A, кажанів A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, вивірок A, тупай A, мишей A, B, C, дельфінів A, B, морських левів A. **5.** Рід *Siadenovirus* (6 видів): сіаденовіруси жаб A*, індиків A, великих синиць A, хижих птахів A, південнополярних поморників A, пінгвінів A.

Основні ознаки. Віріони ікосаедральної форми, діаметром 70–90 нм (рис. 5.4). *Структура віріона:* 1) ікосаедральний капсид (252 капсомери, вершинні капсомери утворюють 12 фібрил); 2) серцевина, яка складається з дволанцюгової ДНК із мол. масою 20–25 МДа у комплексі з 4 протеїнами; 3) 10–14 структурних протеїнів. *Хімічний склад:* ДНК – 12–14 %, протеїни – 86–88 %.

Рис. 5.4. Мастаденовірус людини C
(Stannard L., 2002)

* Типовий вид.

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом рецепторного ендоцитозу. В ядрі відбувається транскрипція вірусного геному (за участю клітинної транскриптази), реплікація (за участю синтезованої ДНК-полімерази) і складання віріонів. Вихід віріонів із клітини здійснюється внаслідок її деструкції. Цикл репродукції триває 14–24 год.

Мастаденовіруси ВРХ A, B і C, атаденовірус ВРХ D
(Bovine mastadenoviruses A, B, C, Bovine atadenovirus D)

Мастаденовіруси ВРХ A, B і C та атаденовірус ВРХ D є збудниками ***аденовірусної інфекції ВРХ*** *(аденовірусного пневмоентериту телят).* Це контагіозне захворювання з гострим перебігом, яке характеризується гарячкою, пневмонією, катарально-геморагічним гастроентеритом, кон'юнктивітом та ураженням лімфоїдної тканини.

З організму ВРХ аденовірус уперше був виділений у США в 1959 р. Аденовірусна інфекція ВРХ поширена в багатьох країнах світу та відіграє істотну роль у виникненні респіраторних і шлунково-кишкових інфекцій ВРХ.

Характеристика вірусів. Мастаденовіруси ВРХ A, B і C та атаденовірус ВРХ D належать відповідно до родів *Mastadenovirus* та *Atadenovirus.* Вони мають три типи антигенів: 1) типоспецифічні антигени, які виявляють у РН; 2) гемаглютиніни; 3) комплементозв'язувальний антиген, спільний для всіх аденовірусів. Встановлено 10 серотипів вірусів, які поділені на дві антигенні підгрупи на основі спільних комплементзв'язувального і преципітувального антигенів. До 1-ї підгрупи належать серотипи 1–3, до 2-ї – 4–10.

Віруси аглютинують еритроцити миші і пацюка. Віруси політропні: проявляють тропізм до епітеліальних клітин слизових оболонок травного й респіраторного трактів, кон'юнктиви і лімфоїдної тканини.

У мастаденовірусу ВРХ B виявлено онкогенні властивості. У результаті зараження новонароджених хом'ячків в/ч, п/ш, і/ц і в грудну порожнину через 1–6 міс на місці введення вірусу розвиваються пухлини.

Культивування. Віруси репродукуються лише в культурах клітин. Найбільш чутливі до вірусів первинні культури клітин нирок ембріона ВРХ і сім'яників телят. Для культивування вірусів використовують також первинні культури клітин легень ембріона ВРХ і нирок телят і перещеплювану лінію клітин нирок теляти Т1. ЦПД з'являється на 5–7-му добу і характеризується округленням клітин та утворенням конгломератів у вигляді грона винограду; в моношарі утворюються пустоти, які нагадують соти. У заражених клітинах виявляють внутрішньоядерні тільця-включення.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Віруси стійкі до різних чинників, зокрема трипсину, ефіру, хлороформу, сапоніну, дезоксихолату натрію, 50 %-го етилового спирту, багаторазового заморожування – відтанення. Температура 56 °С та УФ-промені інактивують їх через 30–60 хв. При 4 °С віруси не втрачають інфекційність понад 6 міс, за кімнатної температури – 1–4 міс, при 37 °С – 15–60 діб. Віруси стійкі до pH у межах 3,0–9,0, інактивуються розчинами формальдегіду (2–2,5 %-й), гідроксиду натрію (2–3 %-й), хлорної води (2–3 % активного хлору).

Патогенність і шляхи передачі збудників інфекції. У природних умовах хворіють телята найчастіше у віці 2–4 міс, хоча трапляються випадки захворювання і в 2–3-тижневому віці. Основне джерело збудника інфекції – хворі тварини, що виділяють віруси в зовнішнє середовище в основному з витіканнями з носа і калом. Певну роль у поширенні інфекції відіграють і латентні вірусоносії, оскільки є факти виділення вірусів із нирок, сім'яників і крові клінічно здорових телят.

Заражаються тварини повітряно-крапельним та аліментарним шляхами, а також через кон'юнктиву. Передача збудника інфекції можлива через корм, підстилку, гній, забруднені виділеннями хворих тварин.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Віруси проникають в організм через слизові оболонки верхніх дихальних шляхів і ротової порожнини та кон'юнктиву. Репродукція їх відбувається в епітеліальних клітинах слизових оболонок респіраторного і травного трактів, що зумовлює запальну реакцію. Виникає вірусемія, з кров'ю збудник поширюється по організму, досягає різних органів, спричинюючи пневмонію, ентерит, рідше – кон'юнктивіт. Вірус размножується в лімфоїдних органах, зумовлюючи імуносупресію, на тлі якої розвиваються секундарні інфекції.

Клінічні ознаки. Інкубаційний період триває 4–7 діб. Хвороба проявляється підвищенням температури тіла до 41,5 °С, сльозотечею, серозними витіканнями з носа, кашлем, утрудненим диханням, тимпанією, кольками, діареєю. Витікання з очей і носа спочатку слизові, а потім – слизово-гнійні чи гнійні.

Перебіг хвороби залежить від умов утримання тварин, особливо за промислового ведення тваринництва. Найбільш гостро інфекція протікає у телят 15–20-добового віку. У них реєструють загальну слабкість і пронос (кал із домішками крові і шматочків слизової оболонки кишечнику). Тварини нерідко гинуть через 1–3 доби після появи перших симптомів хвороби, інші – видужують. В окремих телят, що перехворіли за гострого перебігу хвороби, через 10–15 діб може розвинутися гнійна бронхопневмонія

як результат нашарування секундарних інфекцій (пастерели, мікоплазми тощо). При цьому спостерігаються вологий кашель, ядуха, гнійні витікання з носової порожнини. Серед телят раннього віку смертність може сягати 60 %. У тварин старшого віку хвороба часто набуває хронічного перебігу. Перехворілі телята відстають у рості та розвитку.

Патологоанатомічні зміни. При розтині трупів виявляють ознаки катарально-геморагічного гастроентериту, ущільнення, ателектаз та емфізему легень. На серозних оболонках і під капсулою нирок відмічають крововиливи. Регіонарні лімфатичні вузли збільшені, набряклі, на розрізі – анемічні.

Лабораторна діагностика. Діагноз на аденовірусну інфекцію ВРХ ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

Матеріалом для вірусологічного дослідження є: за життя – змиви з носової порожнини, кон'юнктиви і прямої кишки, кал; після загибелі – слизові оболонки носа, рота, передшлунків, тонкого кишечнику, легені, трахея, бронхи, лімфатичні вузли (бронхіальні, середостінні, брижові), селезінка, нирки, мигдалини. Для серологічного дослідження – парні сироватки крові

Лабораторна діагностика включає експресні, вірусологічні та ретроспективні методи. *Експрес-методи:* ідентифікація вірусного антигену в РІФ, РЗК, РДП та ІЕА, вірусного геному – у ПЛР; також виявляють внутрішньоядерні тільця-включення методом світлової мікроскопії. *Вірусологічні методи.* Для виділення збудника заражають первинні культури клітин нирок або легень ембріона корови, сім'яників телят. Через 5–7 діб з'являється ЦПД: округлення клітин, скупчення у вигляді грона винограду, утворення внутрішньоядерних тілець-включень. Культуральну рідину досліджують у РГА (з еритроцитами миші або пацюка). Ідентифікацію виділеного вірусу здійснюють у РІФ, РН, РЗК, РДП і РЗГА. *Ретроспективна діагностика:* антитіла в парних сироватках крові виявляють у РН, РНГА, РЗК, РДП, РНІФ та ІЕА. *Диференціальна діагностика:* аденовірусну інфекцію ВРХ треба диференціювати від парагрипу-3, вірусної діареї, інфекційного ринотрахеїту, респіраторно-синцитіальної інфекції та хламідіозу ВРХ.

Імунітет та імунопрофілактика. У тварин-реконвалесцентів формується активний імунітет тривалістю до 5 міс. Напруженість пасивного імунітету в телят має прямий зв'язок із рівнем молозивних антитіл. Колостральні антитіла в сироватці крові телят зберігаються до 2,5–4-місячного віку, проте не завжди оберігають від зараження. Навіть на тлі їхнього високого титру тварини можуть захворіти.

Основний напрям створення імунітету в телят – індукування колострального імунітету шляхом вакцинації корів-матерів. Для імунопрофілактики аденовірусної інфекції ВРХ використовують живі та інактивовані вакцини, як моновалентні, так і комбіновані (асоційовані). Основною проблемою в розробці ефективних вакцин є багатотипність збудників. Перевага надається інактивованим вакцинам, а також комбінованим препаратам у зв'язку з тим, що аденовірусна інфекція ВРХ може протікати в асоціації з іншими збудниками і часто неможливо розмежувати провідну роль того чи іншого вірусу в розвитку патології

У РФ розроблені асоційовані інактивовані вакцини: 1) проти аденовірусної інфекції та ВД ВРХ; 2) Комбовак – проти та ІРТ, ПГ-3, аденовірусної інфекції та ВД ВРХ; 3) Комбовак-А – проти ІРТ, ПГ-3, ВД, РС, рота-, корона та аденовірусної инфекцій ВРХ. Для створення штучного пасивного імунітету в телят використовують полівалентну імунну сироватку проти ПГ-3, ІРТ, ВД, аденовірусної інфекції ВРХ та хламідіозу.

5.1.5. Родина *Parvoviridae* (парвовіруси)

Назва родини *Parvoviridae* походить від лат. parvus – маленький, у зв'язку з тим, що це одні з найменших ДНК-геномних вірусів.

Згідно з інформацією МКТВ (2020), родина *Parvoviridae* об'єднує 77 видів вірусів хребетних, які входять до 10 родів і 1 підродину.

Підродина *Parvovirinae* (10 родів): **1.** Рід *Amdoparvovirus* (5 видів): амдопарвовіруси м'ясоїдних 1*, 2, 3, 4, 5. **2.** Рід *Artiparvovirus* (1 вид): артіпарвовірус рукокрилих 1. **3.** Рід *Aveparvovirus* (2 види): авепарвовіруси курячих 1*, журавлеподібних 1. **4.** Рід *Bocaparvovirus* (25 видів): бокапарвовіруси копитних 1*, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, м'ясоїдних 1, 2, 3, 4, 5, 6, приматів 1, 2, зайцеподібних 1, гризунів 1, 2, рукокрилих 1, 2, 3, 4, ластоногих 1, 2. **5.** Рід *Copiparvovirus* (7 видів): копіпарвовіруси копитних 1*, 2, 3, 4, 5, 6, ластоногих 1. **6.** Рід *Dependoparvovirus* (10 видів): аденоасоційовані депендопарвовіруси А*, В, депендопарвовіруси рукокрилих 1, ластоногих 1, гризунів 1, 2, птахів 1, гусей 1, лускатих 1, 2. **7.** Рід *Erythroparvovirus* (7 видів): еритропарвовіруси приматів 1*, 2, 3, 4, гризунів 1, копитних 1, ластоногих 1. **8.** Рід *Loriparvovirus* (1 вид): лоріпарвовірус приматів 1*. **9.** Рід *Protoparvovirus* (13 видів): протопарвовіруси гризунів 1*, 2, 3, копитних 1, 2, м'ясоїдних, м'ясоїдних 1, приматів 1, 2, 3, 4, рукокрилих 1, комахоїдних 1. **10.** Рід *Tetraparvovirus* (6 видів): тетрапарвовіруси приматів 1*, копитних 1, 2, 3, 4, рукокрилих 1.

* Типовий вид.

Основні ознаки. Віріони ікосаедральної форми, діаметром 18–26 нм (рис. 5.5). *Структура віріона:* 1) ікосаедральний капсид (32 капсомери); 2) одноланцюгова ДНК (мінус- або плюс-нитка) із мол. масою 1,5–2 МДа; 3) 3–4 структурні протеїни. *Хімічний склад:* ДНК – 19–32 %, протеїни – 68–81 %.

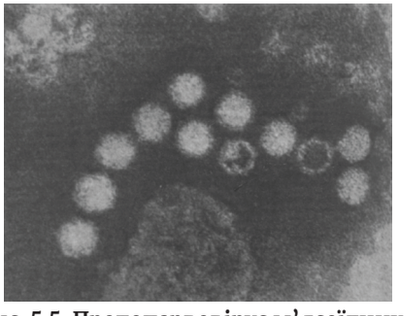


Рис. 5.5. Протопарвовірус м'ясоїдних 1
(Сюрін В.М. та ін., 1998)

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом рецепторного ендоцитозу. В ядрі клітини, що знаходиться в S-фазі циклу, відбувається транскрипція та реплікація вірусного геному (за участю клітинних ензимів транскриптази і ДНК-полімерази) і складання віріонів. Вихід віріонів із клітини здійснюється внаслідок її деструкції.

Амдопарвовірус м'ясоїдних 1 *(Carnivore amdoparvovirus 1)*

Амдопарвовірус м'ясоїдних 1 є збудником ***алеутської хвороби норок*** *(вірусного плазмоцитозу норок, АХН).* Це інфекційне захворювання частіше з хронічним перебігом, яке характеризується системною проліферацією плазмоцитів, різко вираженою гіпергаммаглобулінемією, накопиченням імунних комплексів, гломерулонефритом, артеріїтом, гепатитом, анемією, прогресуючим виснаженням. У вагітних самок спостерігаються аборти і мертвонародження.

Хвороба вперше описана в 1956 р. у США серед нововиведеної алеутської породи норок із гарним сіро-блакитним забарвленням хутра. У 1962 р. була доведена вірусна етіологія хвороби. Пізніше було встановлено, що отриманий унаслідок спонтанної мутації новий колір хутра норок зумовлюється рецесивним геном аа, який кодує також генетичну схильність норок до алеутської хвороби.

Висока сприйнятливість норок, значна стійкість збудника хвороби в зовнішньому середовищі, підвищений комерційний інтерес до нової породи норок зумовили швидке поширення алеутської хвороби в різних країнах світу. Хвороба завдає величезних економічних збитків, що пов'язано з високою смертністю норок (70–80 %), погіршенням якості хутра, зниженням плодючості самок, підвищеною стерильністю самців, масовою загибеллю новонароджених щенят.

Характеристика вірусу. Амдопарвовірус м'ясоїдних 1, належить до роду *Amdoparvovirus* підродини *Parvovirinae.* Встановлено 5 серотипів вірусу, які поділяються на 10 підтипів. Вірус зберігає інфекційну активність у складі імунних комплексів і проявляє тропізм до лімфоцитів.

Культивування. У лабораторних умовах вірус культивують в організмі норок; особливо чутливі норки алеутської породи. Експериментальна інфекція відтворюється шляхом в/ч введення сироватки, а також фільтратів з уражених тканин норок. Інкубаційний період коливається від 30 діб до 2 років, а за серійних пасажів знижується до 2 тижнів.

Вірус важко культивується *in vitro.* Найкраще він репродукується в первинних культурах клітин, виготовлених з органів заражених норок. Вірус вдається адаптувати до перещеплюваних клітинних ліній CRFK і Vero та диплоїдної клітинної лінії Wi-38. У заражених культурах клітин виявляють вірусний антиген у РІФ. Культуральний вірус уже з перших пасажів утрачає інфекційну активність для норок

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Вірус досить стійкий у навколишньому середовищі. У гомогенатах тканин зберігає інфекційність при 80 °С упродовж 1 год, при 90–95 °С – 15–30 хв. За низьких температур він не втрачає активності впродовж року. Вірус стійкий до формаліну, ефіру і дезоксихолату натрію. Розчини лугів і йоду (0,5 %-ві), глутарового альдегіду (2 %-й), УФ-промені інактивують вірус.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. У природних умовах хворіють норки усіх порід, незалежно від статі та віку. Сприйнятливість алеутських блакитних норок із гомозиготним рецесивним геном аа на 47 % перевищує чутливість стандартних пастельних норок.

У заражених тхорів і тхорзофреток іноді спостерігається тривала (до кількох років) персистенція вірусу в організмі, але захворювання зазвичай не виникає. Вірус може безсимптомно персистувати (кілька тижнів або місяців) в організмі лисиць, песців, соболів, єнотів, кролів, яких розводять у неблагополучних щодо алеутської хвороби звіроводних господарствах. Встановлена персистенція вірусу в організмі собак, котів та інших

тварин. При цьому вірус залишається патогенним для норок. Випадків захворювання у людей не відмічено, хоча у ветеринарних лікарів і працівників звірогосподарств, що мають контакт із хворими норками, виявляли специфічні антитіла.

Джерелом збудника інфекції є хворі норки. У благополучні господарства вірус заноситься з інфікованими норками, що виділяють вірус зі слиною, сечею й калом через 15 діб після зараження і впродовж всієї хвороби. Основні шляхи зараження – фекально-оральний та аерогенний. Аліментарне зараження відбувається за згодовування норкам сирих або погано проварених тушок забійних норок чи інших тварин, що розводяться в звіроводних господарствах. Щенята заражаються в період внутрішньоутробного розвитку від інфікованих матерів. Також зараження відбувається через пошкоджену шкіру (при покусах, під час спаровування, при проведенні масових щеплень тощо).

Вірус може бути поширюватися з предметами вжитку, одягом, мухами і кровосисними комахами.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Первинна репродукція вірусу відбувається в лімфоїдній тканині глоткових і мезентеріальних лімфовузлів та в тимусі.

Вірус, проявляючи виражений тропізм до лімфоцитів, стимулює інтенсивну проліферацію плазматичних клітин (плазмоцитоз) у кістковому мозку, селезінці, лімфатичних вузлах, печінці, нирках, сполучній тканині, навколо дрібних судин. Плазматичні клітини виробляють антитіла, що призводить до різкого підвищення в сироватці крові рівня імуноглобулінів (особливо IgG) – гіпергаммаглобулінемії (гаммапатії). Титри антитіл у РЗК через 1,5 міс після зараження досягають фантастичних величин – 1:8000–1:260000. У результаті накопичується величезна кількість імунних комплексів вірус – антитіло – комплемент, в яких збудник зберігає інфекційну активність.

Для АХН характерна постійна персистенція вірусу в організмі й безперервне утворення імунних комплексів. Чому антитіла не нейтралізують вірус? Існує думка, що макрофаги в процесі фагоцитозу реактивують вірус, він розмножується в макрофагах, потім потрапляє в кров, взаємодіє з гуморальними антитілами, знову утворюються імунні комплекси, які захоплюються макрофагами, і таким чином виникає замкнуте коло. Комплекси вірус – антитіло – комплемент відкладаються в різних тканинах, що є причиною важких уражень, зокрема гломерулонефриту й артеріїту.

У результаті відкладення імунних комплексів пошкоджуються лізосоми і звільняються цитофільні ензими, які денатурують протеїни цитоплазми клітин, роблячи їх автоантигенами. Змінені антигени організму стимулюють подальшу проліферацію плазматичних клітин, виробляються автоантитіла, утворюються нові імунні комплекси автоантиген – автоантитіло, що призводить до прогресуючого розвитку патологічних процесів і загибелі.

Клінічні ознаки. Перебіг хвороби буває гострим, підгострим, але частіше хронічним і латентним. Клінічні ознаки хвороби виявляють незадовго до смерті, через 1–24 міс. після зараження. Норки захворюють здебільшого в теплу пору року. Виникнувши в господарстві, інфекція зазвичай затягується на багато років.

На початку спалаху реєструють спорадичні випадки серед алеутських і сапфірових норок. У хворих тварин згасають відтворювальні функції. У більшості норок першою ознакою захворювання є апатія, схуднення, хоча апетит може зберігатися. У калі з'являються неперетравлені частки корму. Далі підвищується температура тіла, інколи спостерігаються кровотечі з ротової і носової порожнин. У калі з'являється кров або він стає дьогтеподібним, розвивається анемія слизових оболонок, іноді бувають ознаки менінгоенцефаліту (порушення координації рухів, парези і паралічі кінцівок). Хвороба закінчується кахексією та загибеллю звірів. Смерть настає від ниркової недостатності або секундарних інфекцій. У вагітних самок можуть спостерігатися аборти, мертвонародження і народження нежиттєздатних щенят.

Патоморфологічні зміни. За підгострого і хронічного перебігу хвороби трупи норок зазвичай виснажені. На яснах, твердому і м'якому піднебінні виявляють множинні дрібні кровоточиві виразки.

За гістологічного дослідження виявляють плазмоцитарні інфільтрати в кістковому мозку, селезінці, лімфатичних вузлах, нирках, печінці. У нирках встановлюють гломерулонефрит. За гострого перебігу хвороби нирки збільшені, з зернистою поверхнею. На загальному сіро-жовтому тлі коркового шару виділяються крапкові крововиливи і дрібні сіро-білі вогнища клітинної проліферації («крапчаста нирка»). За хронічного перебігу хвороби нирки сіро-жовтого кольору, нерідко зменшені в розмірі. Печінка збільшена, повнокровна, іноді набуває мускатного рисунку. Селезінка зазвичай збільшена в 2–5 разів, з ознаками гіперплазії. Лімфатичні вузли часто набряклі, соковиті, світло-сірого кольору.

Лабораторна діагностика. Діагноз на алеутську хворобу норок ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патоморфологічних змін

і результатів лабораторних досліджень. Слід відзначити важливість патоморфологічного дослідження, за якого в мазках-відбитках із різних органів виявляють характерну ознаку – дифузний плазмоцитоз.

У лабораторію направляють такий патологічний матеріал: печінка, селезінка, нирки, лімфатичні вузли. Для серологічного дослідження – сироватки крові.

Лабораторна діагностика ґрунтується на експресних, вірусологічних і ретроспективних методах. *Експрес-методи:* ідентифікація вірусного антигену в РІФ, вірусного геному – у ПЛР. *Вірусологічні методи.* Ставлять біопробу на норках, заражаючи їх в/ч. За наявності вірусу через 30–40 діб після зараження з'являються клінічні ознаки хвороби. Впродовж 3–4 міс тварини гинуть від кахексії з характерними патоморфологічними змінами. Ідентифікацію виділеного вірусу проводять у РІФ і ПЛР. *Ретроспективна діагностика:* виявлення антитіл у РНІФ, ЗІЕФ та ІЕА.

Для виявлення змін у протеїновому складі сироваток крові розроблені *неспецифічні методи:* йодно-аглютинаційний тест, реакція імуноелектроосмофорезу, імунодифузія гамма-глобулінів у агаровому гелі, тимолова проба, глутаральдегідний тест. Неспецифічні методи лабораторної діагностики АХН важливі, проте отримані результати за їхнього застосування потребують підтвердження названими вище методами.

Диференціальна діагностика передбачає виключення аліментарної жирової дистрофії печінки і псевдомонозу.

Імунітет та імунопрофілактика. У зв'язку з тим, що АХН є яскравою ілюстрацією імунокомплексних хвороб, тварини не набувають природного імунітету. Численні спроби створити вакцини виявилися безуспішними. Так, у США розробили інактивовану тканинну вакцину з 10 %-го гомогенату селезінки і печінки експериментально заражених норок, який був підданий термоінактивації та змішаний з ад'ювантом Фрейнда в рівних об'ємах. Проте ця вакцина не лише виявилася неімуногенною, а, навпаки, підвищувала сприйнятливість норок до зараження і підсилювала ступінь уражень органів і тканин унаслідок накопичення в організмі імунних комплексів. Такі самі результати були отримані при спробі сконструювами культуральні вакцини нового покоління – субодиничні, рекомбінантні та ДНК-вакцини.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Охарактеризуйте таксономію, структуру та особливості репродукції ДНК-геномних вірусів родин *Poxviridae, Asfarviridae, Herpesviridae,*

Adenoviridae і *Parvoviridae.* **2.** Охарактеризуйте збудники вірусних інфекцій тварин, патогенез, клініко-епізоотологічні дані хвороб і патологоанатомічні зміни, методи лабораторної діагностики та засоби імунопрофілактики: 1) нодулярний дерматит; 2) міксоматоз кролів; 3) африканська чума свиней; 4) хвороба Ауєскі; 5) інфекційний ринотрахеїт ВРХ; 6) ринопневмонія коней (вірусний аборт кобил); 7) хвороба Марека; 8) аденовірусна інфекція ВРХ; 9) алеутська хвороба норок.

ТЕМА 5.2. РНК-ГЕНОМНІ ВІРУСИ

5.2.1. Родина *Paramyxoviridae* (параміксовіруси)

Назва родини *Paramyxoviridae* походить від др.-грец. παρα – навколо, поряд і μύξα – слиз. Це пов'язано зі спорідненістю вірусів до мукополісахаридів і глікопротеїнів клітинних мембран (зокрема до клітинних рецепторів, які містять сіалову кислоту).

Згідно з інформацією МКТВ (2020), родина *Paramyxoviridae* поділяється на 3 підродини, 13 родів і включає 106 видів.

I. Підродина *Avulavirinae* (3 роди): **1.** Рід *Metaavulavirus* (10 видів): метаавулавіруси птахів 2*, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 14, 15, 20. **2.** Рід *Orthoavulavirus* (9 видів): ортоавулавіруси птахів 1*, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 21. **3.** Рід *Paraavulavirus* (2 види): параавулавіруси птахів 3*, 4.

II. Підродина *Metaparamyxovirinae* (1 рід): **1.** Рід *Synodonvirus* (1 вид): параміксовірус довгокрилих ящероголовів*.

III. Підродина *Orthoparamyxovirinae* (8 родів): **1.** Рід *Aquaparamyxovirus* (2 види): аквапараміксовіруси лососів*, тихоокеанських лососів. **2.** Рід *Ferlavirus* (1 вид): ферлавірус рептилій*. **3.** Рід *Henipavirus* (5 видів): хеніпавіруси Хендра*, Ніпах, Кедр, Моджіанг, ганських кажанів. **4.** Рід *Jeilongvirus* (7 видів): джейлонгвіруси Білонг*, Джун, Тайлам, жорсткошерсних мишей 1, 2, лісних полівок, довгокрилих. **5.** Рід *Morbillivirus* (7 видів): морбіллівіруси кору*, чуми великої рогатої худоби, дрібних жуйних, собак, тюленів, котів, китоподібних. **6.** Рід *Narmovirus* (4 види): нармовіруси Моспан, лісних полівок, Наріва, тупай. **7.** Рід *Respirovirus* (7 видів): респіровіруси мишей*, людини 1, 3, великої рогатої худоби 3, кіз 3, свиней 1, вивірок. **8.** Рід *Salemvirus* (1 вид): салемвірус Салем*.

IV. Підродина *Rubulavirinae* (2 роди): **1.** Рід *Orthorubulavirus* (8 видів): орторубулавіруси епідемічного паротиту*, людини 2, 4, ссавців 5, мавп, свиней, Мапуера, епідемічного паротиту кажанів. **2.** Рід *Pararubulavirus* (10 видів): пararубулавіруси Менengле*, Созуга, Ачимота 1, 2, Тевіот, Тіоман, Тухоко 1, 2, 3, Герві.

Некласифіковані віруси в родині (3 роди): **1.** Рід *Cynoglossusvirus* (1 вид): параміксовірус циноглосових. **2.** Рід *Hoplichthysvirus* (1 вид): параміксовірус гоплікхтів. **3.** Рід *Scoliodonvirus* (1 вид): параміксовірус жовтих гостроносих акул.

Основні ознаки. Віріони плеоморфні, найчастіше сферичної форми, а також бувають ниткоподібні, величиною 150–350 нм (рис. 5.6). *Структура віріона:* 1) зовнішня ліпопротеїнова оболонка з пепломерами; 2) спіральний нуклеокапсид (серцевина); 3) одноланцюгова РНК (мінус-нитка) мол. масою 5–8 МДа; 4) 5–7 структурних протеїнів, у тому числі РНК-залежна РНК-полімераза (транскриптаза). *Хімічний склад:* РНК – 0,5–3 %, протеїни – 70 %, ліпіди – 20–25 %, вуглеводи – 6 %.

Рис. 5.6. Респіровірус мишей
(Stannard L.M., 2010)

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом злиття суперкапсидної оболонки з плазмолемою. Транскрипція та реплікація вірусного геному відбувається в цитоплазмі (за участю вірусної транскриптази, що функціонує як і репліказа). Складання і вихід віріонів із клітини здійснюється брунькуванням через плазмолему. Цикл репродукції триває 8 год.

Респіровірус ВРХ 3 *(Bovine respirovirus 3)*

Респіровірус ВРХ 3 є збудником ***парагрипу-3 ВРХ (ПГ-3)***. Це контагіозне захворювання здебільшого телят із гострим перебігом, яке характеризується гарячкою, катаральним запаленням слизових оболонок верхніх дихальних шляхів, а за ускладнень – бронхопневмонією та плевритом. У тільних корів можливі аборти і народження нежиттєздатних телят.

* Типовий вид.

Вірус уперше виділений у США в 1959 р. від телят, що загинули при транспортуванні (хворобу називали – «транспортна гарячка»). Збудник ПГ-3 ВРХ зумовлює 20–25 % спалахів респіраторних хвороб телят і має значне поширення в Америці, Європі та Азії. В Україні хвороба зареєстрована в 1975 р.

Як моноінфекція ПГ-3 ВРХ протікає рідко, частіше – у вигляді змішаної інфекції в асоціації з іншими патогенами (збудником ІРТ, аденовірусами, пастерелами, мікоплазмами тощо). Захворюваність становить 70–100 %, летальність у середньому – 2 %, а за бактеріальних ускладнень може досягати 20 %. Економічні збитки від ПГ-3 ВРХ у значній мірі залежать від того, наскільки своєчасно застосовуються заходи щодо пригнічення секундарної мікрофлори.

Характеристика вірусу. Респіровірус ВРХ 3 належить до роду *Respirovirus* підродини *Orthoparamyxovirinae.* Він має один серотип та антигенну спорідненість із респіровірусами людини 1 і 3. Вірус аглютинує еритроцити різних видів тварин (мурчака, кроля, миші, корови, вівці, кози, свині, буйвола, мавпи, голуба, гуски, індика). Вірус пневмотропний.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Вірус нестійкий у навколишньому середовищі. При 56–60 °С він інактивується впродовж 30–60 хв, при 37 °С – за 2–4 доби, при 4 °С зберігається 4–5 міс, а ліофілізовані препарати – до 2 років. Вірус чутливий до ефіру, хлороформу, дезоксихолату натрію, формальдегіду, УФ-променів, кислого pH (3,0).

Культивування. Вірус репродукується в первинних культурах клітин нирок і сім'яників телят, нирок і легень ембріона корови. ЦПД з'являється через 2–3 доби і характеризується грануляцією, вакуолізацією й округленням клітин, утворенням синцитіїв, а також цитоплазматичних і внутрішньоядерних тілець-включень. Окрім ЦПД, у культурі клітин спостерігається гемадсорбція (найкраще з еритроцитами мурчака). Індикацію вірусу в культуральній рідині проводять у РГА.

Вірус культивують також у перещеплюваних культурах клітин Hela, Нер-2, КВ, Vero, MDBK, ВНК-21, а також в органних культурах слизової оболонки трахеї та легень ембріона ВРХ.

Вірус добре репродукується в курячих ембріонах віком 6–12 діб за різних методів зараження: найкраще – в амніон, можна в алантоїсну порожнину або на ХАО. Загибелі й видимих змін у курячих ембріонах вірус не викликає. Індикацію вірусу проводять у РГА.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. На ПГ-3 ВРХ хворіють зазвичай телята у віці від 10 діб до року. У дорослих тварин інфекція протікає безсимптомно.

Резервуаром збудника інфекції в природі є переважно ВРХ. Встановлена широка циркуляція вірусу серед клінічно здорової ВРХ усіх вікових груп, а також у овець, свиней, коней, буйволів, собак, гризунів і різних видів птахів. Поширене вірусоносійство серед різних видів тварин визначає постійне і повсюдне збереження збудника в природі. Основне джерело збудника інфекції – хворі телята, які в гострій стадії хвороби виділяють вірус із видихуваним повітрям і носовими витіканнями.

Зараження тварин відбувається повітряно-крапельним та аліментарним шляхами а також внутрішньоутробно. Не виключається передача вірусу статевим шляхом, оскільки його виявляють у спермі, вагінальних виділеннях і тканинах абортованих плодів.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. ПГ-3 ВРХ належить до вогнищевих інфекцій. Потрапивши в організм із вдихуваним повітрям, вірус розмножується в епітеліальних клітинах слизових оболонок дихальних шляхів. Це призводить до руйнування і десквамації клітин, унаслідок чого оголюються глибокі шари слизової оболонки, куди проникає і розмножується симбіонтна мікрофлора дихальних шляхах.

У легеневій тканині вірус спричинює характерну епітелізацію альвеол і дрібних бронхів, запальний процес у перибронхіальній тканині. Під впливом токсичних продуктів і супутньої мікрофлори запальна реакція може поширюватися на легені й регіонарні лімфатичні вузли, розвивається бронхопневмонія.

Ступінь ураження і характер запальної реакції в дихальних шляхах залежить від видового складу секундарної мікрофлори. У разі нашарування пастерел частіше розвивається фібринозна пневмонія, а за ускладнень коковою мікрофлорою – катарально-гнійна пневмонія.

У тільних корів вірус може подолати плацентарний бар'єр та спричинити аборти і народження нежиттєздатних телят.

Залежно від резистентності організму, вірулентності збудника і супутньої мікрофлори хвороба проявляється по-різному. На характер клінічного прояву інфекції впливають різноманітні чинники: переміщення і транспортування тварин, вакцинація, санітарно-гігієнічні умови утримання (висока вологість, протяги тощо), наявність у стаді латентних вірусо- і бактеріоносіїв.

Клінічні ознаки. Інкубаційний період – 1–5 діб. Хвороба протікає надгостро, гостро, підгостро або хронічно з різноманітними симптомами: від легких ринітів чи бронхітів до тяжкої бронхопневмонії.

У телят основними ознаками гострого перебігу захворювання є загальне пригнічення, зниження апетиту, підвищенням температури тіла до

40–41,5 °С, прискорення пульсу (до 120 ударів за хв) і дихання (до 84 дихальних рухів за хв), сухий кашель, хрипи, ексудат із носової порожнини (спочатку серозно-слизовий, а потім гнійний), слинотеча, сльозотеча. У деяких тварин з'являється діарея. За доброякісного перебігу вказані ознаки зникають через 1–2 тижні.

За ускладнень ПГ-3 ВРХ протікає підгостро або хронічно з ураженням легень і плеври. У тварин виникає сильний кашель, з'являються тягучі, густі витікання з носа, тварина худне. Часто розвивається хронічна бронхопневмонія, яка важко піддається лікуванню, плеврит. Іноді з'являється діарея, а в ротовій порожнині – ерозії.

У природних умовах захворювання істотно відрізняється від експериментально відтвореного. Така відмінність є результатом зазвичай змішаних чи ускладнених інфекцій.

Патологоанатомічні зміни. За розтину найчастіше відмічають катаральне запалення слизових оболонок верхніх дихальних шляхів і значне скупчення тягучого слизу, іноді – поодинокі дрібні крововиливи. У легенях встановлюють гіперемію, ділянки ущільнення, альвеолярну та інтерстиціальну емфізему, червону або сіру гепатизацію. У плевральній порожнині виявляють серозно-фібринозний ексудат, нитки фібрину на плеврі. Регіонарні лімфатичні вузли гіперемійовані, набряклі.

Лабораторна діагностика. Діагноз на парагрип-3 ВРХ ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

У лабораторію направляють такий патологічний матеріал: за життя – змиви з носової порожнини; після загибелі – слизова оболонка носа, трахея, бронхи, легені, бронхіальні й середостінні лімфатичні вузли. Для серологічного дослідження відбирають парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика базується на експресних, вірусологічних і ретроспективних методах. *Експрес-методи*: ідентифікація вірусного антигену в РІФ та ІЕА, вірусного геному – у ПЛР. *Вірусологічні методи.* 1) Ізоляцію вірусу проводять у первинних культурах клітин нирок або легень ембріона корови, нирок або сім'яників телят. Через 2–3 доби з'являється ЦПД: округлення клітин, утворення синцитіїв та цитоплазматичних і внутрішньоядерних тілець-включень. Для індикації вірусу ставлять РГАд і РГА (з еритроцитами мурчака). Ідентифікують вірус у РЗГАд, РЗГА, РН, РІФ та ІЕА. 2) Для ізоляції вірусу можна використовувати 6–10-добові курячі ембріони віком, заражаючи їх в амніотичну порожнину. Ембріони не гинуть. Індикацію вірусу проводять у РГА, ідентифікацію – в РЗГА.

3. *Ретроспективна діагностика:* антитіла в парних сироватках крові виявляють у РЗГА, РН, РНГА, ІЕА. *Диференціальна діагностика* передбачає виключення інфекційного ринотрахеїту, вірусної діареї, аденовірусної інфекції, РС-інфекції ВРХ, мікоплазмозу, хламідіозу.

Імунітет та імунопрофілактика. У результаті захворювання або вакцинації тварини набувають активний імунітет проти ПГ-3 ВРХ, який зумовлений гуморальними й секреторними антитілами та інтерфероном. Захисний рівень гуморальних вірусонейтралізувальних антитіл за ПГ-3 ВРХ становить 1: 32.

Однак не завжди навіть високі титри гуморальних антитіл забезпечують захист від зараження. Провідна роль в імунітеті проти ПГ-3 ВРХ належить секреторним антитілам класу IgA, які блокують вірус у місці проникнення й інтенсивної репродукції – епітеліальних клітинах слизових оболонок дихальних шляхів, що запобігає наступному поширенню збудника в організмі.

Постінфекційний імунітет за ПГ-3 ВРХ короткочасний – до 5–6 міс.

Новонароджені телята набувають пасивний імунітет за споживання молозива імунних матерів. Тривалість його залежить від титру антитіл і кількості молозива, спожитого новонародженими в перші дні життя. Наявність у телят 10–14-добового віку специфічних антитіл у титрі 1 : 512 створює надійний захист від зараження. У телят неблагополучних господарств колостральні антитіла зберігаються до 2–6-місячного віку, проте не завжди забезпечують достатнього захисту від інфікування.

Для імунопрофілактики ПГ-3 ВРХ розроблені живі та інактивовані вакцини, як моновалентні, так і комбіновані (проти ПГ-3, ІРТ, ВД, рота-, корона- й аденовірусних інфекцій ВРХ, пастерельозу, ешерихіозу в різних поєднаннях). Перевага надається живим вакцинам проти ПГ-3 ВРХ.

В Україні використовують дві живі вакцини: «Паравак» (проти ПГ-3 ВРХ) і «Бівак» (проти ПГ-3 та ІРТ ВРХ). Вакцинують телят і/н, починаючи з 10-денного віку, і тільних корів із метою створення колострального імунітету в потомства, який триває від 6 міс до року. Для пасивної імунізації телят використовують полівалентну сироватку проти ІРТ, ПГ-3, ВД, ротавірусної та коронавірусної інфекцій ВРХ.

Ортоавулавірус птахів 1 *(Avian orthoavulavirus 1)*

Ортоавулавірус птахів 1 є збудником ***ньюкаслської хвороби*** *(псевдочуми птахів).* Це висококонтагіозна хвороба птахів ряду курячих частіше

з гострим перебігом, яка характеризується геморагічним діатезом, ураженням респіраторного й шлунково-кишкового трактів і ЦНС.

Хвороба вперше зареєстрована в 1927 р. на острові Ява в Індонезії та у Великій Британії поблизу міста Ньюкасл (звідки і походить назва) і супроводжувалася майже 100 %-ю летальністю. Під час останньої епізоотії був ізольований перший штам вірусу і доведена його відмінність від вірусу чуми (грипу) птахів. У 1941–1945 рр. хвороба поширилася повсюдно в європейських країнах.

Ньюкаслська хвороба зареєстрована на всіх континентах і належить до особливо небезпечних (карантинних) вірусних хвороб тварин. Економічні збитки дуже великі, складаються з високої захворюваності (60–90 %) і летальності птахів (до 100 %), а також через ліквідацію всього птахопоголів'я в неблагополучному пункті й великих затрат на проведення досить жорстких карантинних та оздоровчих заходів, які порушують виробничу діяльність птахогосподарств.

Характеристика вірусу. Ортоавулавірус птахів 1, належить до роду *Orthoavulavirus* підродини *Avulavirinae*. Вірус має один серотип, аглютинує еритроцити птахів (курки, голуба, індика), мурчака, миші, корови, вівці, кози, свині, коня, людини (0 група крові). Вірус пантропний. Особливо виражений тропізм він проявляє до нервової, легеневої та вісцеральної тканин. За вірулентністю штами вірусу поділяються на три групи: 1) високовірулентні – велогенні; 2) середньої вірулентності – мезогенні (Н, Комаров); 3) слабовірулентні – лентогенні (B_1, F, Ла Сота, Бор/74/ВДНКІ). Мезогенні й лентогенні штами використовуються як вакцинні.

Культивування. Ортоавулавірус птахів 1 добре репродукується в курячих ембріонах 9–11-добового віку за будь-якого методу зараження (в аланто-їсну порожнину, амніон, на ХАО). Строки загибелі ембріонів залежать від вірулентності вірусу. Велогенні штами спричинюють загибель ембріонів через 32–60 год після зараження, мезогенні штами – через 60–90 год, а лентогенні штами – через 100 год і більше. Іноді для виділення вірусу треба провести не менше трьох «сліпих» пасажів. За розтину загиблих ембріонів виявляють крововиливи на тілі зародка. Індикацію вірусу в курячих ембріонах проводять у РГА (з еритроцитами курей).

Вірус культивують також у первинній культурі фібробластів курячого ембріона, перещеплюваних лініях ВНК-21 і Нер-2. ЦПД з'являється через 48–60 год та характеризується утворенням симпластів і цитоплазматичних тілець-включень. Індикацію вірусу в культурі клітин проводять у РГАд і РГА.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Вірус стійкий у навколишньому середовищі. У пташниках він зберігається взимку до 140 діб, влітку – тиждень, у посліді – 20 діб, у трупах птахів – місяць, у заморожених тушках курей – до 6 міс, у 20 %-му розчині гліцерину – понад 1 рік. У тушках курей за нагрівання до 90–95°С вірус гине через 40 хв. В організмі персидських кліщів він зберігається до 7 міс, на шкаралупі яєць під час інкубації – 1–2 тижні. На поверхні шкаралупи яєць під дією формальдегіду вірус гине упродовж 1 год. Прямі сонячні промені інактивують його за 2 доби, розсіяне світло – за 15 діб.

Інфіковані пташники знезаражуються впродовж доби за дезінфекції 1%-м розчином гідроксиду натрію або 3 %-м розчином формальдегіду. У разі використання 2 %-го розчину формальдегіду або 3 %-го хлорного вапна пташники знезаражуються впродовж 2 діб.

Вірус стійкий у широкому діапазоні pH (2,0–10,0).

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. У природних умовах найчастіше хворіють птахи ряду курячих: кури, індики, цесарки, фазани, перепілки, пави. Також сприйнятливі голуби, горобці, сороки, папуги, яструби, качки, гуси. Молодняк більш чутливий.

Описані випадки зараження людей, які часто контактують із вірусом: персоналу лабораторій, вакцинальних бригад, забійних цехів. Це відбувається внаслідок порушення санітарно-гігієнічних правил. У хворих осіб розвивається кон'юнктивіт.

У 1970–1972 рр. у Нідерландах загинула велика кількість норок від менінгоенцефаліту, причиною якого був збудник ньюкаслської хвороби. Тварини заразилися при поїданні потрухів інфікованих птахів.

З організму вірус виділяється вже в інкубаційному періоді через 24 год після зараження з витіканнями з рота, трахеальним слизом, видихуваним повітрям, послідом, яйцями. У перехворілих птахів може виникнути тривале вірусоносійство (2–4 міс).

Джерелом збудника інфекції є хворі та перехворілі птахи, які виділяють вірус з усіма секретами й екскретами, яйцями і видихуваним повітрям. У промислових господарствах із потоковою системою вирощування птахів формуються стаціонарні епізоотичні вогнища хвороби, що зумовлено тривалим збереженням вірусу в зовнішньому середовищі та масовим вірусоносійством.

Факторами передавання збудника інфекції можуть бути яйця, пір'я і пух від хворих птахів, тушки вимушено вбитих птахів, інвентар, підстилка, корми. Вірус довго зберігається в повітрі у вигляді аерозолю і може

вітром розноситися на великі віддалі (до 15 км). Поширювати вірус можуть і мігрувальні птахи.

Зараження відбувається в основному аерогенним та аліментарним шляхами через корм, воду, повітря за спільного утримання здорових птахів із хворими. Крім того, можливі контактний, трансоваріальний і трансмісивний шляхи зараження.

У благополучні господарства збудник частіше заноситься з яйцями, що поступають для інкубації. Певне значення має трансмісивний шлях зараження через укуси кліщів, в організмі яких вірус зберігається 7 міс і передається трансоваріально. Збудник може тривалий час зберігатися в яйцях аскарид і передаватися сприйнятливим птахам.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Проникнувши через слизові оболонки дихальних шляхів і травного тракту, вірус потрапляє в кров та заноситься до різних органів і тканин. Вірус розмножується в ендотеліальних клітинах, зумовлюючи руйнування стінок кровоносних судин із розвитком запально-некротичних процесів. Через 24–36 год вірус локалізується в паренхіматозних органах, кістковому і головном мозку, м'язах, респіраторному, репродуктивному і щлунково-кишковому трактах, причинюючи поряд із порушенням гемодинаміки, тяжкі некрозодистрофічні зміни. У результаті розвивається інтоксикація, масові крововиливи на серозних і слизових оболонках, дистрофічні й застійні процеси в різних органах і тканинах. У несучок порушується секреторна функція яйцепроводів, що впливає на якість шкаралупи яєць (тонка або взагалі відсутня).

Клінічні ознаки. Інкубаційний період триває 2–15 діб. Перебіг хвороби буває гострий (1–4 доби), підгострий (до 10 діб) і хронічний (2–3 тижні). Залежно від вірулентності штаму вірусу і клінічного прояву розрізняють 5 форм ньюкаслської хвороби.

Велогенная вісцеротропна форма (відома ще під назвами «псевдочума птахів», форма Дойла) спричинюється велогенними штамами вірусу. Відмічають підвищення температури до 43–44 °С, пригнічення, слабкість, втрату апетиту, скуйовдженість пір'я, пронос (послід водянистий, зеленувато-жовтого кольору, іноді з домішками крові), сильні виділення з рота і носа, утруднене дихання (з відкритим дзьобом), хрипи, кашель, чхання, ознаки ураження нервової системи (частіше у молодняку: порушення координації рухів, м'язовий тремор, парези і паралічі лап, крил, скручування шиї). У результаті порушення обміну речовин спостерігається фіолетово-блакитний колір гребеня і борідки, птахи впадають у коматозний

стан і гинуть упродовж 4–8 діб. Летальність досягає 90 %. Знижується або повністю припиняється несучість упродовж 1–3 тижнів. Виробництво яєць нормалізується дуже повільно, і навіть через 2 міс іноді не досягає планової величини. Основна патологоанатомічна ознака – геморагічне ураження травного каналу.

Велогенна нейротропна форма (пневмоенцефаліт, форма Біча) спричинюється велогенними штамами вірусу і характеризується ураженням органів дихання й нервової системи без домінантності геморагічних змін у травному тракті. У курей знижується несучість. Смертність становить від 10 до 50 %, серед курчат – до 90 %.

Пневмотропна мезогенна форма (форма Бодетта) спричинюється мезогенними штамами вірусу. Проявляється в дорослих курей у вигляді гострого респіраторного захворювання, а в молодняку – іноді у вигляді летального нервового захворювання. Доросла птиця гине рідко.

Лентогенная форма (форма Хітчнера) спричинюється лентогенними штамами вірусу, проявляється як інапарантна інфекція або легке респіраторне захворювання птахів усіх вікових категорій із мінімальною смертністю У хворих птахів відмічають незначні зміни респіраторного і гермінативного трактів (ооворити, сальпінгіти, припинення або зниження несучості).

Асимптоматична ентеротропна форма (безсимптомна форма) спричинюється лентогенними штамами вірусу, протікає як субклінічна інфекція травного тракту без клінічних ознак або з легкими кишковими розладами. Захворювання часто встановлюють лише на основі серологічних чи вірусологічних досліджень (за наявністю антитіл або ізоляції вірусу з кишечнику чи посліду).

Патологоанатомічні зміни. За гострого перебігу найхарактерніші зміни спостерігають у травному каналі (картина сепсису): множинні крововиливи на слизовій оболонці стравоходу, шлунку і кишечнику, в кишечнику – катаральне запалення, гіперемія, вогнища некрозу, ерозії та виразки. Також відмічається катаральне запалення слизової оболонки гортані й трахеї; атрофія й некрози в селезінці, печінці, солітарних лімфатичних вузлах і тимусі; гіперемія яєчників; крововиливи в серці; набряк і гіперемія головного мозку.

Лабораторна діагностика. Діагноз на ньюкаслську хворобу ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

У лабораторію надсилають такий патологічний матеріал: за життя – змиви з трахеї й клоаки; після загибелі – слизові оболонки трахеї та

кишечнику, паренхіматозні органи, головний мозок, кістковий мозок. Для серологічного дослідження – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика базується експресних, вірусологічних і ретроспективних методах. *Експрес-методи:* ідентифікація вірусного антигену в РІФ, РНГА, ІЕА, вірусного геному – у ПЛР. *Вірусологічні методи*. Ізоляцію вірусу проводять в курячих ембріонах і культурі клітин. 1) Курячі ембріони віком 9–11 діб заражають в алантоїсну порожнину. Через 1–3 доби ембріони гинуть, при розтині виявляють крововиливи на тілі зародка. Ставлять РГА (з еритроцитами курки). 2) У первинній культурі фібробластів курячого ембріона через 2–3 доби з'являється характерна ЦПД: утворення симпластів і цитоплазматичних тілець-включень. Індикацію вірусу здійснюють у РГАд і РГА. 3) Іноді ставлять біопробу на курчатах, яких заражають в/м. Через 3–7 діб з'являються клінічні ознаки хвороби, курчата гинуть із характерними патологоанатомічними змінами. Ідентифікацію виділеного вірусу проводять у РЗГА, РЗГАд та ІЕА. *Ретроспективна діагностика:* антитіла виявляють у РЗГА, РРГта ІЕА. *Диференціальна діагностика:* ньюкаслську хворобу треба диференціювати від грипу, інфекційного бронхіту, інфекційного ларинготрахеїту, інфекційного енцефаломієліту, параміксовірусної хвороби-2, пастерельозу і респіраторного мікоплазмозу.

Імунітет та імунопрофілактика. Напруженість і тривалість активного імунітету після захворювання або вакцинації залежить від віку птахів, біологічних властивостей вірусу і методу введення його в організм. Від імунних курей антитіла передаються потомству трансоваріально і зберігаються в курчат до 2–3-тижневого віку.

Розроблена система міжнародного контролю ньюкаслської хвороби, прийнята країнами ЄС, яка передбачає порядок виявлення і профілактики захворювання. Для імунопрофілактики ньюкаслської хвороби використовують здебільшого живі вакцини на основі лентогенних (Ла-Сота, Бор-74 ВГНКИ, ВІ, F), рідше – мезогенних (Н, ГАМІР-61, Комаров, Roakin) штамів вірусу. Вакцинують курчат з 7–14-добового віку перорально (випоювання), інтраокулярно, інтраназально, великодисперсним спреєм, іноді – аерозольно. Схема вакцинації повинна враховувати особливості епізоотичної ситуації кожного господарства і може включати до 3–5 обробок птахів. Племінних птахів старшого віку і несучок перед початком яйцекладки щеплять інактивованими вакцинами, що забезпечує захист погоолів'я птахів та їхнього потомства.

Ефективність вакцинації визначають за допомогою контролю динаміки титрів антигемаглютинінів у сироватках крові імунізованої птиці.

Для цього 25 проб сироваток крові з кожного пташника досліджують у РЗГА через кожні 12–25 діб після вакцинації, а потім – за декілька діб перед кожним наступним щепленням. Вакцинацію вважають ефективною, якщо в понад 80 % проб сироваток крові курчат до 30-добового віку титр антитіл становить 1: 8 і вище, у молодняку до 4-місячного віку – 1: 16 і вище, у дорослих курей – 1: 64 і вище. Нижчі титри антитіл у щеплених птахів свідчать про необхідність проведення ревакцинації.

5.2.2. Родина *Rhabdoviridae* (рабдовіруси)

Назва родини *Rhabdoviridae* походить від др.-грец. ραβδος – палка, стрижень, що пов'язано з формою віріонів рабдовірусів рослин.

Згідно з інформацією МКТВ (2020), родина *Rhabdoviridae* об'єднує 87 видів вірусів хребетних, які поділяються на 12 родів.

1. Рід *Ephemerovirus* (8 видів): ефемеровіруси гарячки великої рогатої худоби*, річки Аделаїде, Берріма, Кімберлі, Кулпінья, Котонкан, Ободгіанг, Ята. **2.** Рід *Ledantevirus* (16 видів): ледантевіруси Ле Дантек*, Барур, Фікіріні, Фукуока, Нішимура, каньйону Керн, Кураліба, Коленте, Кумасі, кажанів гори Елгон, Нкольбіссон, Ойта, Ухань, Йонгджія, Каньявара, Вапріо. **3.** *Lissavirus* (17 видів): ліссавіруси сказу*, європейських кажанів 1, 2, австралійських кажанів, кажанів Бокело, кажанів Лагос, кажанів Шимоні, західнокавказьких кажанів, кажанів Ганнорува, Ікома, Дувенхаге, Іркут, Мокола, Худжанд, Араван, Ллейда, Тайвань, **4.** Рід *Novirhabdovirus* (4 види): новірабдовіруси лососевих*, риб, хіраме, змієголовів. **5.** Рід *Perhabdovirus* (3 види): перабдовіруси окунів*, морських форелей, вугрів. **6.** Рід *Sprivivirus* (2 види): спрівіруси коропів*, мальків щук. **7.** Рід *Sripuvirus* (8 видів): сріпувіруси Ньяха*, Алмпівар, Чако, Сена Мадурейра, Сріпур, Шарлевіль, Куяба, Хайнань. **8.** Рід *Sunrhavirus* (2 види): сунрхавіруси Гарба, Сунгуру. **9.** Рід *Tibrovirus* (7 видів): тібровіруси Тіброгарган*, Нижнього Конго, прибережних рівнин, Екпома 1, Екпома 2, прісноводних притоків, Беатріс Хілл. **10.** Рід *Tupavirus* (3 види): тупавіруси Дарем*, Клемет, тупай. **11.** Рід *Vesiculovirus* (16 видів): везикуловіруси Індіана*, Алагоас, Кокал, Нью-Джерсі, американських кажанів, Караяс, Чандіпура, Ісфаган, Юрона, джерела Мальпіс, Мараба, Морретон, Перінет, Пірі, Південь Богдановац, Раді. **12.** Рід *Zarhavirus* (1 вид): зархавірус Захедан*.

Основні ознаки. Віріони мають кулеподібну форму, завдовжки 130–380 нм, діаметром 60–80 нм (рис. 5.7). *Структура віріона:* 1) зовнішня ліпопротеїнова оболонка з пепломерами; 2) спіральний нуклеокапсид

* Типовий вид.

(серцевина); 3) одноланцюгова РНК (мінус-нитка) із мол. масою 3,5–4,6 МДа; 4) 4–5 структурних протеїнів, у тому числі РНК-залежна РНК-полімераза (транскриптаза). *Хімічний склад:* РНК – 1–2 %, протеїни – 65–75 %, ліпіди – 15–25 %, вуглеводи – 3 %.

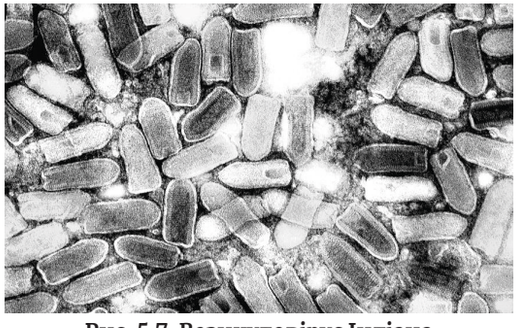


Рис. 5.7. Везикуловірус Індіана
(Murphy F.A., 1975)

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом злиття суперкапсидної оболонки з плазмолемою. Транскрипція і реплікація вірусного геному відбувається в цитоплазмі (за участю вірусної транскриптази, що функціонує як і репліказа). Складання і вихід віріонів із клітини здійснюється брунькуванням через плазмолему. Цикл репродукції триває 4–6 год.

Ліссавірус сказу *(Rabies lyssavirus)*

Ліссавірус сказу є збудником дуже небезпечної хвороби ***сказ***. Це зоонантропонозне захворювання всіх видів теплокровних тварин із гострим перебігом, яке характеризується ураженням ЦНС (негнійним енцефаломієлітом), проявляється збудженням, агресивністю, слинотечею, судомами, парезами, паралічами і закінчується загибеллю.

Інфекційна природа хвороби була встановлена у Франції в 1804 р., коли вперше експериментально доведена заразність слини скажених собак, а в 1879–1881 рр. було відтворено сказ у кролів.

Л. Пастер у 1881–1889 рр довів тропізм збудника сказу до мозкової тканини і розробив оригінальний метод послаблення його вірулентності шляхом і/ц пасажів на кролях. Після 178-го пасажу був отриманий вірус, який проявляв патогенність лише за і/ц зараження кролів, причому з постійним інкубаційним періодом (5–6 діб). Цей вірус назвали фіксованим (virus fixe).

Після додаткової інактивації шляхом висушування над кристалами гідроксиду калію Л. Пастер використав спинний мозок зараженого кроля для виготовлення антирабічної вакцини. У 1885 р. зроблено перші вимушені щеплення людям.

Серед учнів і послідовників Л. Пастера великий вклад у вивчення сказу зробили І.І. Мечников і М.Ф. Гамалія. З їхньої ініціативи в 1886 р. в Одесі організовано пастерівську станцію.

Важливим етапом наукових досліджень було відкриття в нейронах головного мозку цитоплазматичних включень (В. Бабеш, 1887; А. Негрі, 1903). Виявлення тілець Бабеша – Негрі стало поширеним методом лабораторної діагностики сказу.

Сказ входить до п'ятірки зооантропонозних хвороб, які завдають найбільших економічних збитків, і має важливе соціальне значення у зв'язку з абсолютною летальністю для людини. Згідно з даними ВООЗ (2018), нині сказ реєструють у 113 країнах світу, де щороку від нього гине до 61 тис. людей, а близько 20 млн. отримують профілактичні щеплення.

Характеристика вірусу. Ліссавірус сказу належить до роду *Lyssavirus*. Вірус має 4 серотипи. Абсолютна більшість польових і лабораторних штамів належить до 1-го серотипу, інші – ізольовані досі лише в Африці (від людей, землерийок, коней, комарів і москітів). Незважаючи на значну антигенну варіабельність, усі штами ліссавірусу сказу мають імунобіологічну спорідненість. Вірус аглютинує еритроцити гуски, курки, мавпи, мурчака, пацюка, вівці й людини (0 група крові). Вірус нейротропний.

Культивування. Ліссавірус сказу культивують в організмі мишей, кролів, мурчаків і хом'яків за і/ц зараження. У лабораторних тварин розвивається паралітична форма сказу з летальним наслідком.

Вірус важко репродукується *in vitro*. Його вдається адаптувати до первинних культур клітин нирок сірійського хом'яка, поросяти, кроля, собаки, теляти, ембріона овець, фібробластів курячого ембріона, а також до перещеплюваних клітинних ліній ВНК-21 і Нер-2. У культурі клітин встановлена тривала персистенція вірусу з формуванням хронічної інфекції (внаслідок утворення ДІ-часток), яку виявляють за наявністю вірусного антигену (у РІФ) та утворенням цитоплазматичних тілець-включень. У деяких культурах клітин інфекція завершується ЦПД – лізисом клітин і деструкцією клітинного шару. У культурі клітин вірус індукує гемадсорбцію.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Ліссавірус сказу стійкий до дії низьких температур. При 0–4 °С залишається стабільним упродовж кількох діб, при –70 °С і в ліофілізованому стані – кілька років. У слині, що

виділяється хворою твариною, зберігається до 24 год, у гниючому трупі – 2–3 тижні. У поверхневих шарах ґрунту може зберігатися 2–3 міс. Миттєво руйнується при кип'ятінні, при 60 °С – через 5–10 хв, при 50 °С – за 1 год, при 23 °С – через 28–53 доби.

До дії дезінфекційних засобів вірус нестійкий: 1–5 %-ві розчини формаліну вбивають його за 5 хв, 1%-й розчин перманганату калію – 20 хв, 3–5 %-й розчин соляної кислоти – 5 хв, 10 %-й розчин йоду – 5 хв. Вірус швидко інактивується при pH 3,0–11,0.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. Ліссавірус сказу – це єдиний вірус із відомих представників домену *Vira*, який уражає всіх теплокровних тварин і людину в глобальному масштабі з 100 %-ю летальністю.

За ступенем сприйнятливості до ліссавірусу сказу всі теплокровні тварини розділяють на 4 групи: 1) надвисока – лисиці, койоти, шакали, ласки, вовки, миші-полівки; 2) висока – гризуни, скунси, єноти, коти, кажани, рисі, ВРХ; 3) середня – люди, примати, собаки, вівці, кози, коні; 4) слабка – опосуми, птахи. Вроджену несприйнятливість до ліссавірусу сказу мають холоднокровні – риби, жаби, змії, черепахи.

Розрізняють *дикий (вуличний)* і *фіксований* ліссавірус сказу. Вуличний вірус циркулює в природних умовах і характеризується високою вірулентністю для людей і тварин та утворює в клітинах головного мозку специфічні тільця Бабеша – Негрі. Фіксований вірус був отриманий Л. Пастером шляхом тривалого і/ц пасажування вуличного ліссавірусу сказу на кролях, унаслідок чого він втратив свою вірулентність для людини і тварин, а також здатність утворювати тільця Бабеша – Негрі. Фіксований вірус використовується як вихідний матеріал для виготовлення антирабічних вакцин.

З організму вірус виділяється зі слиною вже в інкубаційному періоді за 8–10 діб до появи клінічних ознак хвороби. Вірус міститься в слинних залозах 54–90 % собак, що загинули від сказу. Можливе вірусовиділення через легені, кишечник і з сечею.

Основним резервуаром ліссавірусу сказу в природних умовах є дикі й домашні м'ясоїдні тварини. Циркуляцію вірусу в природі забезпечують хижі тварини, які передають вірус один одному за укусів. Людина є випадковою ланкою в природному вогнищі й не бере участі в циркуляції вірусу.

Основним резервуаром ліссавірусу сказу в Європі, Азії й Північній Америці є лисиці, які спричиняють 60–85 % випадків захворювання. Середня щільність популяції лисиць 5 гол. і більше на 250 га забезпечує високий рівень підтримання й поширення епізоотії. Сказ серед лисиць з'являється насамперед на територіях із масовим поширенням гризунів – основного

джерела корму. У 40–80 % заражених лисиць сказ протікає хронічно і латентно.

Крім лисиць, резервуаром збудника в Європі, Азії й Північній Америці є вовки, куниці, гризуни, у США – скунси, єноти-полоскуни, в Центральній і Південній Америці – кажани (вампіри, комахоїдні й м'ясоїдні), в Південній Азії й Північній Африці – шакали, в Африці – мангусти, в Полярному ареалі (Арктика, Гренландія, Аляска) – песці.

Найбільшу небезпеку для людей становлять собаки і коти, хоча кількість випадків сказу серед них приблизно в 9 разів менша, ніж серед диких тварин.

Отже, джерелом збудника інфекції є хворі дикі й домашні тварини і безсимптомні вірусоносії, які виділяють вірус зі слиною й передають його контактним шляхом через укуси. Можливе зараження і при ослиненні пошкодженої шкіри (подряпини, ссадна).

М'ясоїдні тварини можуть заражатися аліментарним шляхом при поїданні головного і спинного мозку загиблих тварин. Воротами інфекції в такому разі є пошкоджена слизова оболонка ротової порожнини.

Зареєстровані випадки зараження людей аерогенним шляхом, особливо в місцевостях, де водяться кажани. Доведена можливість трансплацентарної передачі збудника сказу в природних умовах із виявленням вірусу в органах плоду ВРХ. Можливо існує трансмісивний шлях передачі збудника. Описані унікальні випадки зараження людей ліссавірусом сказу внаслідок операції з трансплантації рогівки ока.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни.

Після проникнення в організм первинна репродукція вірусу відбувається в м'язових клітинах у місці укусу, де його виявляють до 2 міс. Від вхідних воріт інфекції збудник поширюється по аксоплазмі периферійних нейронів, зв'язуючись із ацетилхоліновими рецепторами нервово-м'язових синапсів. Швидкість дисемінації збудника по нервових стовбурах становить приблизно 3 мм/год. Досягнувши ЦНС, вірус інтенсивно розмножується там і по відцентрових нервах потрапляє в слинні залози й рогівку ока. За сказу виявляється тотальне ураження нервової системи. Можлива генералізація інфекційного процесу з локалізацією вірусу у внутрішніх органах і крові. Вірусемія частіше відмічається до прояву клінічних ознак захворювання і збігається з підвищенням температури тіла. Не можна повністю виключити і гематогенний шлях поширення вірусу в організмі.

Унаслідок репродукції вірусу в клітинах головного мозку виникають запальні й дегенеративні процеси, що зумовлює підвищену рефлекторну

збудливість та агресивність тварини, паралічі й судоми. Загибель настає внаслідок паралічу дихальних м'язів.

У цитоплазмі уражених нервових клітин утворюються специфічні цитоплазматичні включення – тільця Бабеша – Негрі. Вони представляють собою скупчення нуклеокапсидів ліссавірусу сказу (без суперкапсидної оболонки) в поєднанні з продуктами клітинної реакції на вірусну інфекцію. Їх виявляють у цитоплазмі заражених клітин: за буйної форми сказу частіше всього в клітинах амонових рогів, а за паралітичної форми – в довгастому і спинному мозку. Найчастіше трапляються тільця округлої форми, діаметром 4–10 мкм. Вони оточені оболонкою й містять зернисті включення (від 1 до 15). Тільця Бабеша – Негрі виявляють у 65–85 % випадків сказу. Це є діагностичною ознакою хвороби.

Клінічні ознаки. Тривалість інкубаційного періоду за сказу залежить від місця укусу, розмірів і глибини рани, кількості вірусу, індивідуальної резистентності тварини. Найкоротший інкубаційний період – 7–8 діб, але частіше він становить від 2 до 8 тижнів. У 70 % свійських тварин клінічні ознаки сказу починають виявлятися між 15–60 днями після зараження. У людини у 84 % випадків інкубаційний період триває від 12 до 99 діб. Іноді хвороба проявляється через 3–6 і навіть 12 міс після зараження.

Для сказу характерний гострий перебіг. Клінічна картина в цілому подібна у тварин усіх видів. Основними ознаками є підвищена збудливість, агресивність, слинотеча, паралічі.

У *собак* сказ протікає в двох формах буйній і тихій (паралітичній).

За *буйної форми* сказу розрізняють три стадії: 1) продромальна; 2) стадія збудження; 3) паралітична.

Продромальна (початкова) стадія триває від 12 год до 3 діб. Підвищується температура, змінюється поведінка тварини. Собака пригнічений, неслухняний або дуже лагідний, поступово стає роздратованим, легко збудливим, лякається шуму, дотику. Апетит збочений, виникає свербіння в місці укусу. Нерідко з'являються галюцинації: тварина шалено гавкає при вигляді давно знайомих предметів, ніби кусає щось у повітрі («ловить мух»). До кінця продромальної стадії внаслідок парезу м'язів глотки утруднюється ковтання. Складається враження, що собака чимось подавився. Посилюється слинотеча, гавкіт стає хриплим, часто переходить у виття. Зростає агресивність, з'являється прагнення вкусити іншу тварину або людину.

Ці симптоми свідчать про перехід хвороби *у стадію збудження*, яка триває 3–7 діб. У цей період тварини агресивні й дуже небезпечні. У собаки зникає

почуття страху, починаються напади буйства. Він рветься з прив'язі, гризе ланцюг, кидається на людей, намагається втекти. За добу скажений собака може пробігти десятки кілометрів, нападаючи на зустрічних тварин і людей, причому мовчки, без гавкоту. Знаходячись у клітці, собака гризе підлогу й залізні прути стінок, іноді ламає при цьому зуби і пошкоджує язик. Напади буйства продовжуються кілька годин і змінюються періодами пригнічення, коли знесилена тварина лежить нерухомо. Але будь-який подразник провокує новий спалах буйства.

Далі настає *паралітична стадія*, яка триває 1–4 доби. Поступово розвиваються паралічі м'язів, що призводить до повної втрати голосу (афонії), відвисання нижньої щелепи, косоокості. Паралізується мускулатура кінцівок, тулуба.

Хвороба триває 8–11 діб, але іноді смерть настає вже через 3–4 доби.

Тиха (паралітична) форма сказу часто трапляється в разі зараження собак від лисиць. Збудження виражене слабо або взагалі відсутнє. Першими ознаками хвороби є утруднене ковтання, слинотеча. Потім відвисає нижня щелепа, швидко розвиваються паралічі м'язів кінцівок і тулуба, і через 2–4 доби тварина гине.

Дуже рідко спостерігається *атипова форма* сказу, за якої собака не проявляє агресивності. Хвороба характеризується підгострим перебігом, прогресуючим виснаженням тварин, атрофією м'язів, ознаками гастроентериту, паралічами. Ще рідше реєструють *абортивну форму* сказу, яка закінчується видужанням.

У *котів* переважає буйна форма сказу з високою агресивністю, що становить значну небезпеку для людей. Загибель настає через 2–5 діб після паралічу задньої частини тіла.

У *ВРХ* переважає паралітична форма сказу. Відмічають хрипке ревіння, слинотечу, утруднене ковтання, свербіння в місці укусу. Швидко розвиваються паралічі кінцівок. За буйної форми сказу тварини в момент нападу рвуться з прив'язі, хрипло ревуть, піднявши догори голову, риють кінцівками землю, кидаються на стіни, ламають огорожі. Виражена агресивність, особливо до собак і котів. Можуть виникати ознаки статевого збудження, судомне скорочення окремих м'язів. Поступово розвиваються паралічі м'язів нижньої щелепи, язика, кінцівок. Язик звисає з рота, безперервно тече слина. На 3–6-ту добу хвороби настає смерть. Нерідко буває атиповий перебіг хвороби, який супроводжується відмовою від корму, атонією передшлунків, частим потягом до сечовиділення й дефекації. Іноді бувають напади судом, потім розвиваються паралічі.

У *овець і кіз* за буйної форми сказу стадія збудження короткочасна. У цей період відмічають агресивність, особливо до собак, статеве збудження, слинотечу, скреготіння зубами. Уже з 2-го дня хвороби розвиваються паралічі, а на 3–5-ту добу тварина гине.

У *коней* частіше трапляється буйна форма сказу. Відмічають лякливість, неспокій, свербіння в місці укусу, частий потяг до сечовиділення, сильні тенезми. Напади буйства характеризуються агресивністю, намаганням зірватися з прив'язі, втекти. Іноді з'являються ознаки статевого збудження. Буйство змінюється депресією, оглумоподібним станом. Утруднюється ковтання, іржання стає хриплим, з'являється слинотеча. Відмічають судомне скорочення м'язів, особливо жувальних, потім розвивається параліч м'язів кінцівок і тулуба. Смерть настає зазвичай на 3–4-ту добу, іноді – через 24 год. Паралітична форма хвороби буває в разі зараження коней від диких м'ясоїдних.

У *свиней* сказ частіше протікає в буйній формі і супроводжується збудженням, рохканням, сильною слинотечею, свербінням у місці укусу. На 4–6-ту добу настають паралічі й загибель.

Для сказу *диких м'ясоїдних* найбільш характерними є втрата страху перед людьми й агресивність. Особливо агресивні скажені вовки і шакали. Навіть удень вони забігають у населені пункти, нападають на тварин і людей. До кінця хвороби розвиваються парези, а потім – паралічі кінцівок.

Патологоанатомічні зміни недостатньо характерні та мають певне діагностичне значення лише з урахуванням клінічних ознак. Трупи тварин виснажені, на шкірі можуть бути сліди укусів, незагоєних ран, а в м'ясоїдних – травми губ, пошкодження зубів. Шерсть у ділянці нижньої щелепи і підгрудка змочена слиною.

За розтину відмічають застійне повнокров'я внутрішніх органів. Шлунок зазвичай порожній, але іноді містить різні неїстівні предмети, що особливо характерно для м'ясоїдних. Слизова оболонка травного тракту набрякла, з крововиливами. Аналогічну картину виявляють у головному мозку. Кров темно-червоного кольору, не згортається.

За гістологічного дослідження головного і спинного мозку виявляють дисемінований негнійний енцефаломієліт, а в цитоплазмі нейронів – тільця Бабеша – Негрі,

Лабораторна діагностика. Діагноз на сказ ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

У лабораторію направляють трупи дрібних тварин і голову з двома шийними хребцями від великих тварин.

Лабораторна діагностика сказу ґрунтується на дослідженні головного мозку тварин експресними і вірусологічними методами.

Експрес-методи: ідентифікація вірусного антигену в РІФ, РДП, ІЕА; виявлення цитоплазматичних тілець-включень Бабеша – Негрі методом світлової мікроскопії (фарбування препаратів за Муромцевим або Селлером).

Вірусологічні методи використовують у разі негативних результатів експрес-діагностики. Ставлять біопробу на білих мишенятах віком 3–5 тижнів: у двох варіантах: 1) Заражають 10–12 мишенят, половину – і/ц, половину – п/ш у ділянці носа або верхню губу. Строк спостереження – 30 діб. Починаючи з 7–10-ї доби після зараження, у тварин з'являються клінічні ознаки: скуйовдження шерсті, горбатість спини, порушення координації рухів, параліч кінцівок. Тварини гинуть. Ідентифікацію вірусу проводять у РІФ, РДП або за наявністю тілець Бабеша – Негрі. 2) Заражають 20–30 мишенят і/ц та п/ш. Через 3–4 доби щоденно вбивають по 1–2 тварини і досліджують головний мозок у РІФ. Цей варіант постановки біопроби дає змогу скоротити строк дослідження на 6–7 діб.

Нині розроблено альтернативний метод ізоляції ліссавірусу сказу – зараження досліджуваним матеріалом перещеплюваної культури клітин НГУК (невриноми Гассерова вузла пацюка). Через 24 год заражену культуру клітин досліджують у РІФ для ідентифікації вірусного антигену.

Диференціальна діагностика передбачає виключення хвороби Ауєскі, чуми м'ясоїдних (нервової форма), східного, західного і венесуельского енцефаломієлітів коней.

Імунітет та імунопрофілактика. Сказ невиліковний і завжди закінчується летально в людей і тварин. Однак у новітній літературі описано 6 випадків повного або часткового одужання людини від сказу. При цьому 5 з 6 пацієнтів отримали певну кількість ін'єкцій антирабічної вакцини до початку клінічного прояву хвороби. Успішне відтворення абортивної форми сказу на різних видах тварин, інтенсивні дослідження молекулярних механізмів абортивної інфекції та імунітету, а також випадки виживання людей після гострого рабічного енцефаліту викликають певний оптимізм щодо можливості в майбутньому переведення летальної інфекції сказу в абортивну.

Для імунопрофілактики сказу застосовують інактивовані та живі вакцини. У медицині використовуються лише інактивовані, слабкоалергійні або безалергійні вакцини. Вакцинні препарати здебільшого відрізняються

за способом культивування штаму вірусу, концентрації та ступенем очищення вірусного антигену. Залежно від способу одержання вакцинного штаму вірусу антирабічні вакцини поділяють на тканинні (виготовлені з головного мозку тварин, інфікованих фіксованим ліссавірусом сказу), культуральні та генноінженерні. Для культивування вакцинного вірусу використовують в основному перещеплювані культури клітин Vero і ВНК-21 та диплоїдну клітинну лінію Wi-38.

З метою імунопрофілактики сказу в людей виготовляють культуральну антирабічну вакцину зі штаму Внуково-32, а також антирабічний імуноглобулін. Для імунізації тварин використовують цілу низку препаратів, зокрема інактивовану концентровану антирабічну вакцину зі штаму Щолково-51, живі культуральні вакцини зі штамів Внуково-32, Fluri HEP/ВНК-21, SAD/ВНК-2.

У країнах Західної й Центральної Європи сказ серед домашніх тварин не реєструється. Таких результатів вдалося досягти завдяки проведенню планомірних і науково-обґрунтованих кампаній із пероральної вакцинації диких м'ясоїдних тварин як основного резервуару ліссавірусу сказу в природі та обов'язковій антирабічній парентеральній вакцинації собак і котів.

В Україні для профілактики сказу здійснюється системна парентеральна імунізація домашніх тварин: собак – на всій території країни, котів – у зонах стійкого неблагополуччя, сільськогосподарських тварин – у разі спалахів захворювання. Також проводиться пероральна імунізація диких м'ясоїдних у природних умовах. З цією метою застосовують живі вірусвакцини, а також рекомбінантні вакцини на основі вірусу вісповакцини як вектора протективного антигену ліссавірусу сказу, зокрема вакцини V-RG і Raboral VR-G.

Одним з основних механізмів, що забезпечує резистентність організму до ліссавірусу сказу, є нейтралізація вірусу специфічними антитілами класу Ig G, що утворюються до основного протективного антигену – глікопротеїну суперкапсидної оболонки віріона. Згідно з даними ВООЗ, титр вірусонейтралізувальних антитіл на рівні 0,5 МО/мл є достатньою імунною реакцією організму на введення вакцини проти сказу. Контроль напруженості поствакцинального імунітету здійснюють за допомогою РН на білих мишах і в культурі клітин та ІЕА.

5.2.3. Родина *Orthomyxoviridae* (ортоміксовіруси)

Назва родини *Orthomyxoviridae* походить від др.-грец. ορθός – правильний, μύξα – слиз. Це пов'язано зі спорідненістю вірусів до мукополісахаридів

і глікопротеїнів клітинних мембран (зокрема до клітинних рецепторів, які містять сіалову кислоту).

Згідно з інформацією МКТВ (2020), родина *Orthomyxoviridae* об'єднує 7 родів і 9 видів.

1. Рід *Influenzavirus A* (1 вид): вірус грипу А*. **2.** Рід *Influenzavirus B* (1 вид): вірус грипу В*. **3.** Рід *Influenzavirus C* (1 вид): вірус грипу С*. **4.** Рід *Influenzavirus D* (1 вид): вірус грипу D*. **5.** Рід *Isavirus* (1 вид): вірус інфекційної анемії лососів*. **6.** Рід *Quaranjavirus* (2 види): віруси Кваранфіл*, атола Джонстон. **7.** Рід *Thogotovirus* (2 види): віруси Тогото*, Дорі.

Основні ознаки. Віріони плеоморфні, найчастіше сферичної форми, діаметром 80–120 нм (рис. 5.8). Бувають також ниткоподібні віріони завдовжки до 4 мкм. *Структура віріона:* 1) зовнішня ліпопротеїнова оболонка з пепломерами; 2) спіральний нуклеокапсид (серцевина); 2) одноланцюгова фрагментована РНК (6–8 фрагментів, мінус-нитка) із мол. масою 5 МДа; 4) 7–8 структурних протеїнів, у тому числі РНК-залежна РНК-полімераза (транскриптаза). *Хімічний склад:* РНК – 1–2 %, протеїни –70 %, ліпіди – 18–37 %, вуглеводи – 5 %.

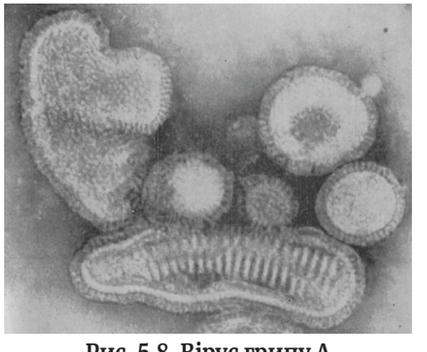


Рис. 5.8. Вірус грипу А
(Бредлі С. та ін., 1977)

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом рецепторного ендоцитозу. В ядрі відбувається транскрипція і реплікація вірусного геному (за участю вірусної транскриптази і синтезованих полімеразних протеїнів) та формування нуклеокапсиду. Складання і вихід віріонів із клітини здійснюється брунькуванням через плазмолему. Цикл репродукції триває 6–8 год.

* Типовий вид.

Вірус грипу А *(Influenzavirus A)*

Вірус грипу А має глобальне поширення й обумовлює майже щорічно епідемії в популяціях людей і періодично (кожні 10–40 років) – небезпечні пандемії, що забирають сотні тисяч і навіть десятки мільйонів людських життів. Вірус грипу А спричинює також епізоотичні спалахи серед різних видів тварин зі значними економічними збитками. Майже кожна епідемія грипу супроводжується інтродукцією збудника в популяції свійських і диких тварин (включаючи птахів), де вірус може автономно циркулювати тривалий час. Штами вірусу грипу А, адаптовані до організму тварин, іноді виходять за межі власної екологічної ніші та спричинюють тяжку патологію в людини.

Основним природним резервуаром вірусу грипу А є водоплавні перелітні птахи. Періодична поява нових високопатогенних антигенних варіантів пов'язана переважно із взаємодією різних штамів вірусу грипу А на генетичному рівні, що можливе за змішаної інфекції, коли вони інфікують одночасно один і той самий організм.

Грип птахів *(класична чума птахів, чума птахів, високопатогенний грип птахів, КЧП)* – висококонтагіозна хвороба з гострим перебігом, що характеризується геморагічним діатезом, ураженням респіраторного й шлунково-кишкового трактів і ЦНС.

Класична чума птахів (КЧП) відома з початку XIX століття під назвою «ломбарджинська хвороба», коли в Італії в 1831 р. і 1847 р. це захворювання викликало масову загибель свійських птахів. У 1878 р. ця хвороба описана в Італії під назвою «ексудативний тиф курей» зі 100 %-ю летальністю. Термін «чума птахів» з'явився в 1901 р. під час великої епізоотії в Австрії, яка повністю знищила поголів'я свійських птахів. У цьому ж році в Італії була доведена вірусна етіологія КЧП, а 1955 р. належність збудника до вірусу грипу типу А.

На початку XXI століття спалахи високопатогенного грипу птахів, обумовлені антигенним варіантом H5N1, стали реєструвати у багатьох країнах світу, в тому числі і в Україні. Економічні збитки від цього захворювання надзвичайно великі у зв'язку з масовою загибеллю птахів, необхідністю проведення жорстких ветеринарно-санітарних заходів. Проблема грипу птахів актуальна ще й тим, що пташині штами вірусу грипу А є патогенними для людини.

Характеристика вірусу. Вірус грипу А, належить до роду *Influenzavirus A.*

Циркулюючі в природі штами вірусу грипу А характеризуються унікальною мінливістю поверхневих антигенів – гемаглютиніну (H) і нейрамінідази (N). Ці антигени мають першочергове значення в реалізації інфекційного процесу та є основними протективними антигенами, які стимулюють утворення вірусонейтралізувальних антитіл. H характеризується більшою варіабельністю, ніж N. Встановлено 18 підтипів H і 11 підтипів N, поєднання яких обумовлює велику кількість антигенних варіантів вірусу грипу А (близько 50). Основна маса їх циркулює серед птахів, особливо качок.

Для птахів найбільш вірулентними є штами вірусу, які містять підтипи H5 і H7. Пташині штами вірусу грипу А H5N1, H7N7, H7N9, H9N2 патогенні і для людини. Антигенний варіант вірусу H5N1 уражає також різні види тварин: свиней, коней, котів, тигрів, собак, норок, куниць, кролів, пацюків, китів, котиків, тюленів

Пташині штами вірусу грипу А аглютинують еритроцити курки, кроля, мурчака, а також еритроцити вівці й коня, на відміну від збудника ньюкаслської хвороби. Ця властивість використовується для диференціації виділених у курячих ембріонах штамів вірусів. Пташині штами вірусу грипу А, що спричинюють КЧП, є пантропними, інші – пневмотропні.

Культивування. Пташині штами вірусу грипу А репродукуються в курячих ембріонах при зараженні в алантоїсну чи амніотичну порожнини. Накопичення вірусу залежить від вірулентності штаму і ступеня його адаптації. У разі виділення вірулентних штамів, які спричинюють КЧП, ембріони гинуть уже в першому пасажі через 26–36 год після зараження. При розтині виявляють крововиливи на тілі зародка.

Пташині штами вірусу грипу А після адаптації розмножуються також у первинній культурі фібробластів курячого ембріона. Через 1–2 доби з'являється ЦПД, яка подібна до спонтанної (вікової) дегенерації клітин. Індикацію вірусу проводять у РГАд і РГА.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Пташині штами вірусу грипу А нестійкі в зовнішньому середовищі, швидко руйнуються за дії різних дезінфектантів. Розчини 5 %-ї соляної кислоти, 4 %-го фенолу, 3 %-го хлорного вапна, 2 %-го гідроксиду натрію, 5 %-ї карболової кислоти інактивують вірус за 5 хв. Температура 56 °С інактивує вірус упродовж 1 год, 60 °С – за 10 хв, 65–70 °С – за 2–5 хв, сонячні промені – за 40 год. За низьких температур (–30 °С) і в ліофілізованому стані вірус зберігається до 2 років, при 4 °С – кілька тижнів. У замороженому м'ясі вірус зберігається 9,5 міс, в інкубованих яйцях – 4 міс, на пір'ї – 8–20 діб; у посліді при 4 °С – 35 діб, 37 °С – 6 діб. Чутливий до pH 3,0.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. Вірус грипу А уражає курей будь-якого віку, а також багато інших видів птахів, у тому числі індиків, гусей, качок, цесарок, фазанів, граків, галок і горобців. Як зазначалося вище, пташині штами вірусу грипу А є патогенними для людини і різних видів тварин.

Основне джерело збудника інфекції – хворі птахи, які виділяють вірус із послідом, що призводить до контамінації кормів, води й інших об'єктів навколишнього середовища. Факторами передачі вірусу слугують забруднені виділеннями інфікованих птахів приміщення, підстилка, гнізда, вигули, різні предмети догляду, а також трупи, тушки забитих птахів, незнешкоджені відходи забою, яйця, пух і пір'я хворих птахів. Поширенню хвороби сприяють синантропні й дикі птахи, гризуни, комахи, транспортні засоби, а також порушення правил карантину.

Зараження відбувається повітряно-крапельним шляхом, а також аліментарно через вживання контамінованих кормів і води. У разі первинного виникнення грипу в господарстві спостерігається епізоотія, яка впродовж місяця охоплює майже все сприйнятливе поголів'я птахів із високою летальністю.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Потрапивши на слизові оболонки дихальних шляхів, вірус репродукується там, потім проникає в кров і заноситься до різних органів і тканин. Залежно від вірулентності й тропізму вірусу та природної резистентності організму розвивається генералізована або респіраторна форма хвороби. Ураження стінок кровоносних судин спричинює порушення гемодинаміки, зумовлює ексудативні явища і геморагічний діатез. Гіпоплазія лімфоїдних органів, лімфоцитопенія та виражена імуносупресія зумовлюють генералізовану форму інфекції й швидку загибель птахів.

Клінічні ознаки. Інкубаційний період триває до 2–5 діб. Перебіг хвороби зазвичай гострий або підгострий, що залежить від антигенного варіанту вірусу і його вірулентності.

Перебіг грипу курей, зумовленого штамами вірусу з H5 і H7, частіше гострий і проявляється в характерній для КЧП *септичній формі*. Спостерігається підвищення температури тіла до 44 °С, відмова від корму, пригнічення, синюшність слизових оболонок, гребеня і сережок, парези й паралічі. Хвора птиця сидить, настовбурчившись, упирається дзьобом у підлогу, крила опущені, хода хитка. Перед загибеллю температура тіла знижується до 30 °С. В окремих хворих курей можуть виявлятися симптоми ураження ЦНС або травного каналу, набряки підшкірної клітковини в ділянці голови і шиї. Летальність становить від 70 до 100 %.

У разі захворювання курей на грип, спричинений штамом вірусу з H1, відмічається *респіраторна форма* хвороби, ступінь прояву якої залежить від вірулентності штаму, наявності секундарних інфекцій, віку та умов утримання птахів. Спостерігається підвищення температури тіла до 44 °С, чхання, утруднене дихання, хрипи, задуха, ціаноз гребеня, сережок, кон'юнктивіт, сльозотеча. Хворі птахи втрачають апетит, пір'я настовбурчене, голова й крила опущені, з дзьоба витікає слиз. В окремих птахів виявляються атаксія, тремор та інші ознаки ураження нервової системи. За респіраторної форми хвороби летальність не перевищує 20 %.

Зниження несучості в дорослих птахів – характерна ознака, що спостерігається і за відсутності симптомів ураження органів дихання. У такому разі погіршується якість шкаралупи, знижуються запліднюваність і виводимість.

Вірус грипу А з H6 спричинює епізоотію серед дорослих птахів із переважним ураженням травного каналу. За *ентеритної форми* спостерігається відмова від корму і зниження несучості. Птахи стають малорухливими, млявими, пір'я скуйовджене. Визначаються спрага, пронос, послід пінистий, має зеленувато-жовтий колір, іноді – з домішкою крові. За цієї форми хвороби спостерігається висока захворюваність, однак летальність не перевищує 15 %.

Патологоанатомічні зміни залежать від біологічних властивостей підтипу вірусу, що зумовлює загибель птахів. Патологічні зміни варіюють у широких межах залежно від тривалості перебігу хвороби. Найбільш типовою ознакою є картина геморагічного діатезу, що характеризується підшкірними набряками в ділянці голови, шиї, підгруддя. Ці набряки свідчать про порушення функції органів кровообігу. Відзначаються масивні й поодинокі крововиливи під шкіру, в м'язи, а також у паренхіматозні органи і слизові оболонки, а в курей-несучок – у яєчник та яйцепровід. М'язи синюшні, з крапчастими і смугастими крововиливами. Виявляють також геморагічний ентерит і перитоніт. У більшості загиблих птахів виявляють риніт, фарингіт, кон'юнктивіт, крововиливи в шлунок і кишечник. Можливі крововиливи в міокард. Досить часто відмічають крововиливи в серозних покривах, паренхіматозних органах, скелетних м'язах і травному каналі.

Характерні некротичні ураження селезінки, печінки, нирок. Оболонки головного мозку гіперемійовані, набряклі, під твердою мозковою оболонкою виявляються дифузні крововиливи, іноді вогнища некрозу. Під кутикулою м'язового шлунка виявляються смугасті крововиливи, а сама кутикула знімається дуже важко. Зоб переповнений водянистим вмістом.

Селезінка анемічна, печінка, нирки, серозні оболонки кишок у стані застійної гіперемії, яйцеві фолікули деформовані, розм'якшені, з крововиливами та гематомами.

Лабораторна діагностика. Діагноз на грип птахів ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

У лабораторію направляють такий патологічний матеріал: від хворих тварин – змиви з носоглотки і клоаки; після загибелі – цілі трупи або трахея, підочні синуси, повітроносні мішки, легені, печінка, селезінка, кишечник, головний мозок. Для серологічного дослідження – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика включає експресні, вірусологічні та ретроспективні методи. *Експрес-методи:* ідентифікацію вірусного антигену проводять у РІФ та ІЕА, вірусного геному – у ПЛР; певне діагностичне значення має виявлення цитоплазматичних тілець-включень. *Вірусологічні методи.* Ізоляцію вірусу проводять у курячих ембріонах і культурі клітин. 1) Заражають 9–11-добові курячі ембріони в алантоїсну або амніотичну порожнину. Через 2–3 доби ембріони гинуть, при розтині виявляють крововиливи на тілі зародка. Ставлять РГА (з еритроцитами курки). 2) У разі зараження первинної культури фібробластів курячого ембріона через 1–2 доби з'являється ЦПД, яка подібна до спонтанної дегенерації клітин. Індикацію вірусу проводять у РГАд і РГА. 3) Іноді ставляють біопробу на курчатах, заражаючи їх п/ш, в/м, і/ц або в кон'юнктиву. Через 2–3 доби з'являються типові клінічні ознаки хвороби, курчата гинуть, при розтині виявляють характерні патологоанатомічні зміни. Ідентифікація виділеного вірусу проводять у РЗГА, РЗГАд, РН, РЗК. *Ретроспективна діагностика:* антитіла виявляють у РЗГА, РЗК, РРГ та ІЕА. *Диференціальна діагностика* передбачає виключення ньюкаслської хвороби, інфекційного бронхіту, інфекційного ларинготрахеїту і респіраторного мікоплазмозу птахів.

Імунітет та імунопрофілактика. Постінфекційний імунітет у птахів триває до 6 міс. Захворювання можуть спричинити різні антигенні варіанти вірусу грипу А, які не індукують перехресного імунітету. Після перехворювання, спричиненого одним антигенним варіантом, організм птахів не має захисту стосовно інших.

Виділення від птахів різних антигенних варіантів вірусу грипу А ускладнює розробку засобів імунопрофілактики. Комерційне виробництво моновалентних вакцин є недоцільним. Тому використовують інактивовані цільновіріонні вакцини, що містять кілька антигенних варіантів вірусу.

Також розроблені рекомбінантні вакцини, в яких як вектор використовують збудники інфекційного ларинготрахеїту птахів або віспи курей.

Для імунопрофілактики грипу птахів, що спричинює вірус H7N1, застосовують живі вакцини з аттенуйованих штамів Ру і Р5. З метою імунопрофілактики грипу птахів, що спричинюють штами підтипів Н1 – Н8, застосовують інактивовану β-пропіолактоном гідроокисалюмінієву вакцину. Напруженість імунітету контролюють у серологічних реакціях на 21-шу добу після вакцинації. Перед ревакцинацією треба також перевірити титр антигемаглютинінів, і якщо він нижче встановлених норм, проводять ревакцинацію.

5.2.4. Родина *Coronaviridae* (коронавіруси)

Назва родини походить від лат. corona, оскільки пепломери суперкапсиду за розгляду негативно контрастованих препаратів створюють враження корони навколо Сонця.

Згідно з інформацією МКТВ (2020), родина *Coronaviridae* об'єднує 2 підродини, 5 родів, 26 підродів* і 46 видів.

I. Підродина *Letovirinae* (1 рід): **1.** Рід *Alphaletovirus* (1 вид): альфалетовірус вузькоротих квакш.

II. Підродина *Orthocoronavirinae* (4 роди)*:* **1.** Рід *Alphacoronavirus* (19 видів): альфакоронавірус 1**, коронавіруси людини 229E, NL63, норок 1, кажанів HKU10, CDPHE15, довгокрилих кажанів 1, HKU8, підковоносів HKU2, домових гладконосів 512, звичайних бурозубок T14, гігантських білозубок X74, пацюків Лученг Рн, альфакоронавіруси великих підковоносів HuB-2013, азійських рибоїдних нічниць Sax-2011, китайських вечірниць SC-2013, середземноморських нетопирів 3398, NL63-подібний штам коронавірусу кажанів BtKYNL63–9b, вірус епізоотичної діареї свиней. **2.** Рід *Betacoronavirus* (14 видів): коронавіруси мишей**, людини HKU1, тяжкого гострого респіраторного синдрому, респіраторного синдрому Близького Сходу, справжніх їжаків 1, нетопирів HKU5, китайських пацюків HKU24, лісних полівок 2JL14, клишоногих кажанів HKU4, нічних криланів HKU9, GCCDC1, пальмових криланів C704, бетакоронавіруси 1, листоносів Пратта Чжецзян2013. **3.** Рід *Deltacoronavirus* (7 видів): коронавіруси бюльбюлів HKU11**, муній HKU13, HKU15, очеретянок HKU21, нічних чапель HKU19, білоочкових HKU16, свищів HKU20. **4.** Рід *Gammacoronavirus* (5 видів): коронавіруси птахів**, птахів 9203, гусей CB17, качок 2714, білуг SW1.

* Підроди не вказані.

** Типовий вид.

Основні ознаки. Віріони плеоморфні, частіше сферичної форми, діаметром 80–220 нм (рис. 5.9). *Структура віріона:* 1) зовнішня ліпопротеїнова оболонка з булавоподібними пепломерами у вигляді сонячної корони; 2) спіральний нуклеокапсид (серцевина); 3) одноланцюгова РНК (плюснитка) із мол. масою 5,5–8,1 МДа; 4) 4–5 структурних протеїнів.

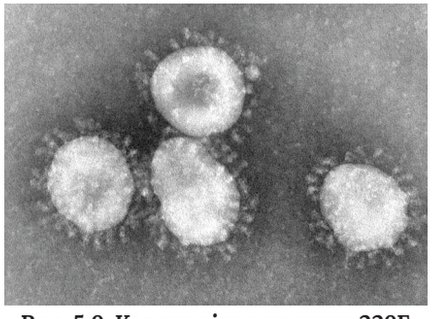


Рис. 5.9. Коронавірус людини 229Е
(Murphy F.A., 1975)

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом рецепторного ендоцитозу. Транскрипція та реплікація вірусного геному (за участю синтезованої реплікази) відбувається в цитоплазмі, а формування віріонів – брунькуванням через мембрани ендоплазматичної сітки і комплексу Гольджі. Віріони звільняються з клітини шляхом екзоцитозу, транспортуючись у цитоплазматичних вакуолях, які зливаються з плазмолемою. Цикл репродукції триває 12 год.

Альфакоронавірус 1 *(Alphacoronavirus 1)*

Альфакоронавірус 1 є збудником ***трансмісивного гастроентериту свиней*** *(інфекційного гастроентериту свиней, ТГЕС).* Це висококонтагіозне захворювання з гострим перебігом, що характеризується катарально-геморагічним гастроентеритом та проявляється блюванням, діареєю, дегідратацією організму і високою летальністю (90–100 %) серед поросят до 2-тижневого віку.

ТГЕС уперше описаний у США у 1945 р., а вірус уперше був виділений в Японії в 1970 р. Хвороба реєструється в усіх країнах світу з інтенсивним веденням свинарства і завдає великих економічних збитків у зв'язку з високою захворюваністю і масовою загибеллю новонароджених поросят,

зниження приросту живої маси у відгодівельних свиней і витрат на проведення ветеринарно-санітарних заходів.

Характеристика вірусу. Альфакоронавірус 1 належить до роду *Alphacoronavirus* підродини *Orthocoronavirinae.* Вірус має один серотип, аглютинує еритроцити корови, мурчака і курки. Вірус появляє тропізм до епітеліальних клітин слизової оболонки тонкого кишечнику.

Культивування. Вірус репродукується в первинних культурах клітин сім'яників, нирок, легень, шкіри, щитоподібної залози і слинних залоз поросят, у перерещеплюваних культурах клітин сім'яників і нирок поросят (РК-15), органних культурах стравоходу, кишок, епітелію слизової оболонки носової порожнини. Для виділення вірусу найбільш придатні первинна культура клітин щитоподібної залози поросят і перещеплювана клітинна лінія РК-15.

ЦПД вірусу проявляється зазвичай після попередньої адаптації упродовж 2–7 пасажів і характеризується округленням клітин та утворенням синцитіїв.

Часом виділяють польові нецитопатогенні штами альфакоронавірусу 1. Для їхньої індикації використовують феномен інтерференції. Він полягає в тому, що нецитопатогенні штами збудника ТГЕС гальмують розвиток ЦПД у культурі клітин, зараженій збудником вірусної діареї ВРХ.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. У замороженому стані вірус зберігається до 18 міс, при нагріванні до 56 °С інактивується за 30 хв, при 37 °С – за 4 доби, за кімнатної температури – впродовж 45 діб. У рідкому калі хворих свиней на сонці інактивується за 6 год, у тіні – за 3 доби. Вірус чутливий до ефіру, хлороформу і дезоксихолату натрію, стійкий до дії трипсину, жовчних кислот і змін pH від 3,0 до 11,0. Розчини фенолу, формальдегіду (0,5 %-ві), гідроксиду натрію (2 %-й) інактивують вірус упродовж 30 хв.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. У природних умовах хворіють свині різного віку і порід, особливо чутливі новонароджені поросята в перші тижні життя. У свіжому епізоотичному вогнищі хвороба охоплює впродовж 3–4 діб усе свинопоголів'я. Летальність серед поросят до 2-тижневого віку становить 90–100 %, 1–2-місячного. віку – 30 %, серед дорослих свиней не перевищує 3 %, але за несприятливих умов годівлі й утримання, різних стресових факторів може сягати 10–15 %.

Джерелом збудника інфекції є хворі й перехворілі свині, які виділяють вірус, починаючи з інкубаційного періоду і упродовж 2–3 міс після перехворювання. Особливо небезпечний кал: концентрація вірусу в ньому

особливо висока на початку хвороби, тому інфекція швидко (за 3–4 доби) поширюється в неблагополучному стаді.

Тварини в основному заражаються фекально-оральним і повітряно-крапельним шляхами. Факторами передачі збудника інфекції слугують субпродукти й охолоджене до 3–5 °С м'ясо перехворілих тварин, контаміновані корми, вода, повітря, гній, транспортні засоби, спецодяг та інші об'єкти зовнішнього середовища. У поширенні збудника важливе значення можуть мати собаки, лисиці й перелітні птахи (шпаки).

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Потрапивши в організм найчастіше аліментарним шляхом, вірус завдяки кислотостійкості долає кислотний бар'єр шлунку і потрапляє в кишечник. Вірус репродукується в епітеліальних клітинах слизової оболонки тонкого кишечнику, спричинюючи їхню загибель і десквамацію. У результаті циліндричний епітелій замінюється кубічним і плоским, що приводить до атрофії кишкових ворсинок через 12–24 год після зараження. Це особливо чітко виражено в новонароджених поросят. Атрофія кишкових ворсинок спричинює порушення процесу травлення і всмоктування. Унаслідок цього розвивається профузний пронос, який призводить до порушення водно-електролітного балансу, ацидозу, зневоднення і загибелі. Зазвичай розвиваються секундарні інфекції, частіше всього – ешерихіоз.

Окрім основного патологічного процесу в тонкому кишечнику, репродукція вірусу відбувається в паренхіматозних органах, особливо в легенях, куди вірус заноситься з кров'ю. Це призводить до істотних ушкоджень альвеолярних макрофагів та епітелію легень.

Клінічні ознаки. Інкубаційний період триває в середньому 1–3 доби. Чим молодша тварина, тим він коротший: у поросят-сисунів – 12–18 год, у дорослих тварин –7 діб.

Основна клінічна ознака хвороби у свиней різного віку – порушення функції шлунково-кишкового тракту. Особливо важко хворіють поросята-сисуни до 10-денного віку, в яких відмічається підвищення температури, блювання, відмова від ссання, в'ялість, діарея (кал водянистий, жовтувато-зеленого кольору, неприємного запаху), сильна спрага, схуднення і загибель на 2–7-му добу. Поросята, які вижили, відстають у рості й розвитку. Іноді до шлунково-кишкових розладів приєднується енцефаломіеліт із гіперестезією.

У дорослих свиней хвороба протікає доброякісно та супроводжується короткочасним підвищенням температури до 40,5–40,8 °С, пригніченням, зниженням апетиту і незначною діареєю. У свиноматок зменшується або

повністю припиняється лактація. Хвороба триває 1–2 тижні та закінчується одужанням.

Патоморфологічні зміни. Труп зневоднений. Шлунок заповнений згустками зсілого молока. Слизова оболонка шлунку набрякла, гіперемійована, з дрібними крововиливами, а слизова оболонка кишечнику, крім того, вкрита виразками і тягучим слизом. Тонкий кишечник розтягнутий газами і пінистим водянистим вмістом зі згустками неперетравленого молока. Лімфатичні вузли (особливо мезентеріальні) збільшені й гіперемійовані.

За гістологічного дослідження виявляють атрофію кищкових ворсинок. Співвідношення довжини ворсинок до глибини крипт, що в нормі становить 7:1, може зменшуватися до 1:1. Це є важливою патоморфологічною ознакою ТГЕС.

Лабораторна діагностика. Діагноз на трансмісивний гастроентерит свиней ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патоморфологічних змін і результатів лабораторних досліджень.

У лабораторію направляють такий патологічний матеріал: від тварин, убитих у перші години появи клінічних ознак хвороби, – тонкий кишечник із вмістом, мезентеріальні лімфатичні вузли, паренхіматозні органи, головний мозок. Для серологічного дослідження – парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика базується на експресних, вірусологічних і ретроспективних методах. *Експрес-методи:* вірусний антиген виявляють у РІФ, ЗІЕФ та ІЕА, вірусний геном – у ПЛР.

Вірусологічні методи. Ізоляцію вірусу здійснюють у первинних культурах клітин нирок, сім'яників або щитоподібної залози поросят, перещеплюваній клітинній лінії РК-15. За відсутності ЦПД проводять послідовні пасажі. Здебільшого ЦПД вірусу настає через 2–7 пасажів і характеризується округленням клітин та утворенням синцитіїв. Ідентифікацію виділеного вірусу проводять у РН, РІФ та ІЕА.

У зв'язку з наявністю нецитопатогенних штамів збудника ТГЕС надійним методом виділення вірусу є біопроба на 2–3-добових поросятах, які отримані з благополучних господарств. Вірусовмісний матеріал (суспензія з ушкодженого кишечника, звільнена від бактерій) вводять перорально. За зараженими поросятами ведуть спостереження впродовж 3–4 діб. Поява у тварин блювання і діареї впродовж 24–72 год після інокуляції свідчить, що в досліджуваному матеріалі є збудник ТГЕС. На 3–5-ту добу після початку діареї тварини гинуть. За розтину трупів поросят знаходять катаральний ентерит, а за гістологічного дослідження – атрофію ворсинок кишечнику.

Ретроспективна діагностика: виявлення антитіл у РН, РНІФ, РНГА, РЗГА (з еритроцитами курей або мурчака), ІЕА. *Диференціальна діагностика* передбачає виключення ротавірусної інфекції, епідемічної діареї, класичної чуми свиней, ешерихіозу, сальмонельозу, кормових отруєнь.

Імунітет та імунопрофілактика. За ТГЕС провідне значення має місцевий імунітет кишечника, оскільки гуморальні антитіла не захищають організм тварини від зараження. Активний імунітет розвивається лише за потрапляння вірусу в кишечник, і він зв'язаний із резистентністю епітеліальних клітин тонкого кишечника. Для нейтралізації вірусу до проникнення його в ентероцити антитіла мають вільно знаходитися в просвіті кишечника (потрапляють із молозивом і молоком) або бути тісно зв'язані з чутливими клітинами (секреторні IgA). У вмісті клубової, сліпої та прямої кишок виявлені вірусонейтралізувальні антитіла, які маскують вірус, що виділяється, утруднюючи його виявлення.

У перехворілих свиней імунітет триває до 2 років; у поросят він слабкий і короткочасний. Несприйнятливість до вірусу новонароджених поросят досягається вакцинацією супоросних свиноматок, які передають потомству лактогенним шляхом антитіла класів IgA та Ig G. Захист поросят зумовлений безперервним поступленням із молоком материнських антитіл, які нейтралізують вірус. Короткочасність і слабкість колострального імунітету в поросят зв'язано з нерегулярним смоктанням, недостатністю молока й інших чинників. Поросята від перехворілих або раніше інфікованих свиноматок стійкі до інфекції, якщо вони зразу ж після народження і не рідше ніж через кожні 4 год вживають імунне молозиво або молоко.

Оскільки існує тісний зв'язок між ступенем захисту й утворенням секреторних антитіл, продукція яких залежить від низки чинників (у тому числі способу введення антигену), тому найбільш раціональним є пероральний метод вакцинації тварин, який індукує місцевий імунітет кишечника. Живий атенуйований вірус, введений перорально, приживляється тільки в епітеліальних клітинах, які покривають ворсинки тонкого кишечника, стимулюючи плазматичні клітини до утворення секреторних антитіл.

Для імунопрофілактики ТГЕС використовують суху культуральну вірусвакцину із штаму ВДНКІ. Вакцинують супоросних свиноматок за 21–24 доби до опоросу щоденно впродовж 7 діб. Вакцину згодовують із сухим кормом. Вакцинація супоросних свиноматок забезпечує пасивний імунітет у потомства.

5.2.5. Родина *Flaviviridae* (флавівіруси)

Назва родини *Flaviviridae* походить від лат. flavus – жовтий у зв'язку з назвою хвороби людини – жовта гарячка, збудник якої належить до цієї родини.

Згідно з інформацією МКТВ (2020 р.), родина *Flaviviridae* об'єднує 4 роди і 89 видів.

1. Рід *Flavivirus* (53 види): віруси жовтої гарячки*, омської геморагічної гарячки, кліщового енцефаліту, японського енцефаліту, енцефаліту долини Муррей, енцефаліту Сент Луїс, менінгоенцефаліту індиків Ізраїля, Апої, Ароа, Багаза, Бензі, Боубоуі, кажанів Букаласа, Каціпакор, Острова Кері, Каубоун Рідж, кажанів Дакар, Денге, Едж Хілл, кажанів Ентеббе, Гаджец Галлі, Ільєус, Югра, Ютіапа, Кадам, Кедоугоу, Кокобера, Кутанго, хвороби лісу Кьясанур, Лангат, хвороби Люпінга, Меабан, Модок, лейкоенцефалопатії коротковухих кажанів Монтана, Нтайя, кажанів Пномпень, Повассан, Ріо Браво, Ройял Фарм, Сабоя, Сал Віея, Сан Перліта, рифу Саумарез, Сепік, Тембусу, Тюленячий, Уганда S, Усуту, Вессельсброн, Західного Нілу, Яунде, Йокосе, Зіка. **2.** Рід *Hepacivirus* (14 видів): гепацівіруси С*, A, B, D, E, F, G, H, I, J, K, L, M, N. **3.** Рід *Pegivirus* (11 видів): пегівіруси А*, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K. **4.** Рід *Pestivirus* (11 видів): пестівіруси А*, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K.

Основні ознаки. Віріони сферичної форми, діаметром 40–60 нм (рис. 5.10). *Структура віріона:* 1) зовнішня ліпопротеїнова оболонка з пепломерами; 2) ікосаедральний нуклеокапсид; 3) одноланцюгова РНК (плюс-нитка) із мол. масою 4,2 МДа; 4) 3–4 структурні протеїни. *Хімічний склад:* РНК – 8 %, протеїни – 66 %, ліпіди – 17 %, вуглеводи – 9 %.

Рис. 5.10. Пестівірус С
(Сюрін В.М. та ін., 1998)

* Типовий вид.

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом рецепторного ендоцитозу. Транскрипція та реплікація вірусного геному відбувається в цитоплазмі (за участю синтезованої реплікази), а складання віріонів – брунькуванням через мембрани ендоплазматичної сітки. Віріони звільняються з клітини шляхом екзоцитозу, транспортуючись у цитоплазматичних вакуолях. Цикл репродукції триває 24–30 год.

Пестівірус С *(Pestivirus C)*

Пестівірус С є збудником ***класичної чуми свиней*** *(КЧС).* Це висококонтагіозна хвороба свійських і диких свиней, яка характеризується гарячкою, ураженням кровоносної й кровотворної систем, крупозною пневмонією та крупозно-дифтеритичним запаленням товстого кишечнику.

Хвороба вперше була описана в Північній Америці в 1833 р. У 1862 р. вона з'явилася в Англії і швидко поширилася по всій території Європи. Вірусна етіологія хвороби встановлена в США в 1903 р.

Нині КЧС зареєстрована на всіх континентах більш ніж у 60 країнах. Хвороба належить до особливо небезпечних (карантинних) інфекцій тварин. Вона завдає величезних економічних збитків свинарству, які зумовлені масовою захворюваністю (95–100 %) і високою летальністю (60–80 %) серед свиней усіх вікових груп, вимушеним забоєм тварин і витратними заходами з ліквідації її спалаху.

Характеристика вірусу. Пестівірус С належить до роду *Pestivirus*. Вірус має один серотип, який поділяється на три антигенні групи – А, В і С, що відрізняються за вірулентністю. Група А включає високовірулентні епізоотичні штами, які спричинюють у свиней різного віку гострий перебіг захворювання з майже 100 %-ю летальністю, а також лапінізовані і так звані «холодні» варіанти культурального вірусу. До групи В належать помірно вірулентні штами вірусу (зокрема американський штам 331), які зумовлюють гострий перебіг хвороби у поросят, а в дорослих свиней – атипову форму КЧС (зазвичай хронічну, що призводить до загибелі або одужання тварин). Група С об'єднує авірулентні, здебільшого вакцинні штами Тівераль і К, які непатогенні для дорослих тварин і плодів.

Пестівірус С має тісний антигенний зв'язок із пестівірусами А і В (збудниками вірусної діареї ВРХ). Зв'язок односторонній: антитіла до пестівірусу С нейтралізують пестівіруси А і В, але не навпаки. Пестівірус С пантропний.

Культивування. Вірус репродукується в первинних культурах клітин легень, селезінки, нирок і лейкоцитів свиней, у перещеплюваній клітинній

лінії РК-15, проте без прояву ЦПД. Максимальний титр вірусу досягається через 4–8 діб після зараження. Індикацію і титрування вірусу в культурі клітин проводять методом бляшок під агаровим покриттям або в РІФ. Слід відзначити, що за люмінесцентної мікроскопії виявляють дифузне світіння цитоплазми уражених клітин, які розміщені групами, тому їх називають флуоресціювальними мікробляшками. Уже через 24–48 год у культурі клітин РК-15 можна спостерігати появу цих мікробляшок.

Для індикації й титрування пестівірусу С у культурі клітин запропоновано метод екзальтації збудника ньюкаслської хвороби. Суть цього методу полягає в прояві ЦПД за спільного культивування обох вірусів у первинній культурі клітин сім'яників поросят (клітини, заражені нецитопатогенним пестівірусом С, під дією збудника ньюкаслської хвороби лізуються).

Шляхом тривалих серійних пасажів пестівірус С вдалося адаптувати до організму кролів. Таким способом було отримано атенуйований лапінізований штам К, який і нині є базовим для виготовлення живих вакцин.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Пестівірус С досить стійкий до впливу факторів зовнішнього середовища. В охолоджених м'ясних тушах він не втрачає вірулентності понад 2–4 міс, у замороженому м'ясі – декілька років, у солонині – понад 10 міс, у копченостях – понад 3 міс. У разі прогрівання м'ясних продуктів вірус інактивується при 44 °С через 4 год, при 65 °С – через 30 хв, при 71 °С – через 1 хв. У сироватці крові при 37 °С вірус інактивується через 18–20 діб, при 2–4 °С – через 4–6 міс. У гною і трупах вірус гине через 3–5 діб, у ґрунті – через 1–2 тижні, у свинарниках (підлоги, стіни) не втрачає вірулентності до року. Сонячні промені вбивають вірус упродовж 5–9 діб. При 56 °С він інактивується за 60 хв, при 60 °С – за 10 хв.

Чутливий до ефіру, хлороформу, дезоксихолату натрію, трипсину і ліпаз, стабільний в діапазоні pH 5,0–10,0. Найкращі дезінфектанти – 2–3 %-й гідроксид натрію, 2,5 %-й формальдегід і 15–20 %-ва водна суспензія хлорного вапна, які інактивують вірус за 1 год.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. У природних умовах хворіють свійські свині всіх порід і вікових груп, особливо високопородні, а також дикі кабани.

Джерелом збудника інфекції є хворі тварини, які виділяють вірус у навколишнє середовище з сечею, калом, секретами слизових оболонок очей, носа, а також перехворілі тварини-вірусоносії. Зараження відбувається в основному аліментарним шляхом через контаміновані корми і воду, а також аерогенно, контактно через пошкоджену шкіру і слизові оболонки. Можливе внутрішньоутробне і трансмісивне (через укуси комарів) зараження.

Факторами передачі збудника інфекції слугують контаміновані корми, вода, підстилка, гній, трупи, продукти забою, незнешкоджені відходи м'ясокомбінатів, боєнь, кухонь тощо.

У благополучні господарства пестівірус С заноситься частіше з незнешкодженими харчовими і боєнськими відходами, транспортом і тваринами-вірусоносіями. Поширенню збудника інфекції можуть сприяти підприємства із забою свиней і переробки свинини, які не виконують ветеринарно-санітарних вимог, а також безконтрольна торгівля живими свинями і продуктами забою.

КЧС може виникати в будь-яку пору року, проте її частіше реєструють восени, коли здійснюються масові переміщення, продаж і забій свиней. У свіжих вогнищах за наявності неімунного поголів'я інфекційний процес протікає у вигляді епізоотії. У разі занесення збудника в господарство вірусоносіями спочатку захворює небагато тварин і лише через 10–14 діб – усе поголів'я. Якщо вірус занесений з інфікованим кормом, тоді інфекція охоплює за 2–3 дні майже все поголів'я.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Потрапивши в організм, вірус розмножується в місці вхідних воріт інфекції, потім проникає в кров і розноситься по всьому організму. Вірус репродукується у всіх внутрішніх органах і тканинах, але в найбільшій кількості концентрується в лімфатичних вузлах, кістковому мозку, слизовій оболонці кишечника, селезінці, печінці й ендотелії кровоносних судин. Уражаючи ендотелій судин, вірус спричинює некроз судинних стінок, унаслідок чого виникають розриви їх і масові крововиливи. У результаті порушення кровопостачання в лімфатичних вузлах, кишечнику та інших органах утворюються вогнища некрозу, а в селезінці – інфаркти. Унаслідок ураження кровотворних органів розвивається анемія й лейкопенія. Запальні процеси в мозковій тканині зумовлюють розвиток у головному і спинному мозку периваскулярних інфільтратів, характерних для негнійного енцефаліту, що супроводжується нервовими явищами (депресія, збудження, судомні напади).

За гострого перебігу КЧС смерть настає в результаті морфологічних уражень всіх систем організму, особливо органів кровотворення і кровообігу. За підгострого і хронічного перебігу виникає блокада імунної системи та пригнічення природної резистентності. На цьому тлі активізується секундарна мікрофлора (сальмонели, пастерели тощо), розвивається крупозна пневмонія і крупозно-дифтеритичний коліт. Це призводить до глибокого порушення обміну речовин, виснаженню тварини та її загибелі.

Перебіг захворювання може бути надгострим, гострим, підгострим і хронічним. Інкубаційний період триває здебільшого 5–8 діб, інколи – 3 доби, ще рідше – до 2–3 тижнів.

Надгострий перебіг спостерігають іноді в молодих тварин. Відмічається висока температура (41 °С і вище), пригнічення, блювання, прискорене серцебиття і дихання, яскраво-червоні плями на шкірі, прогресуюча загальна слабкість і загибель через 1–2 доби.

Гострий перебіг буває на початку епізоотії, характеризується підвищенням температури тіла до 40–41 °С, загальним пригніченням і слабкістю. Через 2–3 доби розвивається анорексія, часто блювання, запор, що змінюється на пронос. Розвивається кон'юнктивіт, повіки опухають, з очей з'являються слизово-гнійні виділення. В окремих тварин відмічається кровотеча з носа. Поросні свиноматки абортують. Тварини в основному лежать. Їхня хода хитка, невпевнена. На шкірі внутрішньої поверхні стегон, шиї, вушних раковин з'являються пустули з ексудатом жовтого кольору, пізніше – крапкові крововиливи, які поступово зливаються, утворюючи темно-багряні плями, що не зникають при натискуванні пальцем. Прогресують слабкість, ознаки ураження органів дихання і серцева недостатність. Шкіра п'ятачка, вушних раковин, черева і кінцівок набуває ціанотичного відтінку. У крові виявляють лейкопенію. Тварини гинуть з ознаками епілепсії.

За гострого перебігу в окремих тварин можуть домінувати ознаки ураження ЦНС. Тому деякі фахівці виділяють *нервову форму* КЧС, яка характеризується порушенням координації рухів, манежними рухами, паралічами задніх кінцівок, нервовим збудженням, апатією, сонливістю. Смерть настає через 24–48 год за явищ епілепсії або коматозного стану.

Підгострий перебіг спостерігають нерідко після гострого перебігу, хвороба триває 3 тижні й ускладнюється секундарними інфекціями.

У разі ускладнень сальмонелами уражається шлунково-кишковий тракт (*кишкова форма* КЧС). Розвивається крупозно-дифтеритичний коліт. Запор змінюється виснажливим проносом із смердючим запахом і домішками слизу, а іноді – крові. Свині худнуть і здебільшого гинуть.

За ускладнень пастерелами розвивається *легенева форма* КЧС, яка характеризується пневмонією, що супроводжується високою температурою, судомним кашлем, утрудненим диханням, слизово-гнійними витіканнями з носа, болючістю грудної клітини. Хвороба частіше закінчується загибеллю тварин. Нерідко спостерігають *змішану форму* хвороби, коли КЧС ускладнюється одночасно сальмонельозом і пастерельозом. Тварини гинуть.

Хронічний перебіг триває кілька тижнів і навіть місяців і характеризується тяжким крупозно-дифтеритичним ураженням шлунково-кишкового тракту, гнійно-фібринозним запаленням легень, плевритом. У хворих тварин відмічають втрату апетиту, кон'юнктивіт, пронос, який іноді змінюється на запор, анемію і прогресуюче схуднення. Шкіра зморщується, покривається екзематозними струпами. Нерідко відмічають некрози кінчиків вух і хвоста. Летальність становить 30–60 %. Тварини, які перехворіли, мають вигляд заміркв і залишаються небезпечними вірусоносіями впродовж багатьох місяців.

Іноді спостерігають субклінічний і хронічний перебіги КЧС, які характеризуються порушенням функції відтворення (безпліддя, аборти, мертвонародження, муміфікація та вади розвитку плодів). Однією з причин цього є репродукція вірусу в недостатньо імунному організмі, зокрема у тварин, щеплених інактивованими вакцинами.

Мертвонародження, відставання в рості свідчать про внутрішньоутробне зараження плода. Трансплацентарна передача вірусу поросятам може супроводжуватися довготривалою персистентною віремією. Такі поросята виглядають клінічно здоровими, але з перших тижнів життя розсіюють вірус у навколишнє середовище і є небезпечним джерелом збудника інфекції. В одному пометі можуть бути поросята інфіковані й неінфіковані, і клінічно їх неможливо відрізнити. Лише через певний час у персистентно інфікованих поросят спостерігали хронічний перебіг хвороби, відставання в рості і загибель у віці 3–8 тижнів. Описано вроджений тремор м'язів у поросят, зв'язаний із хронічним перебігом КЧС.

Патологоанатомічні зміни. Зміни за КЧС дуже різноманітні й залежать від віку тварин, перебігу хвороби і наявності ускладнень секундарною інфекцією (сальмонельоз, пастерельоз тощо). Найбільш типові зміни бувають у підсвинків і дорослих тварин.

За гострого перебігу *(септична форма)* чума зазвичай протікає без ускладнення вторинною інфекцією. Кон'юнктива, слизові оболонки носа і рота бліді й ціанотичні. Шкіра вух, шиї, живота, внутрішній поверхні стегон плямисто або дифузно забарвлена в багрово-червоний колір, видно крапково-плямисті крововиливи. Спостерігаються виражені явища геморагічного діатезу в різних органах. Найбільш значні й постійні (патогномонічні) зміни відмічають на надгортаннику, в лімфатичних вузлах, сечовому міхурі, селезінці й нирках. Лімфатичні вузли (переважно голови і шиї) набряклі, соковиті, червоного кольору зовні і мармурового вигляду на розрізі. Характерні крапкові крововиливи під слизовою оболонкою

надгортанника. У селезінці (особливо по краях) у 60 % випадків виявляють геморагічні інфаркти у вигляді щільних чорно-червоних ділянок. Нирки анемічні, з крапковими крововиливами в корковому шарі, а також у сечоводах і сечовому міхурі. У шлунково-кишковому тракті відмічають катаральне або геморагічне запалення з численними крововиливами. Легені кровонаповнені, набряклі й плямисті. У поросят-сисунів ознаки геморагічного діатезу проявляються слабкіше і патологоанатомічні зміни знаходять в основному в органах травлення і нирках.

За КЧС, ускладненої пастерельозом *(легенева форма)*, основні зміни спостерігають в органах грудної порожнини. Встановлюють крупозно-геморагічну пневмонію, множинні некрози, серозно-геморагічний або фібринозний плеврит і перикардит, крововиливи на серозних покривах грудної порожнини, а також на слизовій оболонці гортані й трахеї.

За КЧС, ускладненої сальмонельозом *(кишкова форма)*, хвороба протікає переважно хронічно і характеризується виразково-некротичними процесами в травному тракті (глотці, мигдалинах, шлунку і кишечнику). Найчастіше вражаються сліпа й ободова кишки, де знаходять дифтеритичні «бутони» і виразки, рідше – дифузне дифтеритичне запалення.

Лабораторна діагностика. Діагноз на класичну чуму свиней ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

Для лабораторної діагностики направляють такий патологічний матеріал: від тварин, убитих в агональному стані або загиблих, – кров, паренхіматозні органи, мигдалини, лімфатичні вузли, серце, грудна кістка, головний і спинний мозок. Для серологічного дослідження – сироватки крові тварин-реконвалесцентів.

Лабораторна діагностика включає експресні, вірусологічні та ретроспективні методи. *Експрес-методи:* ідентифікація вірусного антигену в РІФ, РНГА, РДП, ЗІЕФ та ІЕА, вірусного геному – у ПЛР. *Вірусологічні методи.* 1) Для ізоляції вірусу використовують первинні культури клітин нирок або сім'яників поросят, лейкоцитів крові свині, перещеплювану лінію РК-15. ЦПД не проявляється. Ідентифікацію виділеного вірусу проводять у РІФ. 2) Іноді ставлять імунологічну пробу на поросятах, імунних до КЧС, заражаючи їх в/м суспензією з досліджуваного матеріалу. У позитивних випадках через 2–5 діб після зараження в неімунних тварин з'являються клінічні ознаки хвороби, вони гинуть. Імунні тварини залишаються здоровими. Ідентифікацію вірусу в патматеріалі загиблих тварин здійснюють у РІФ, ІЕА, РНГА і ПЛР. *Ретроспективна діагностика:* для виявлення антитіл

у сироватках крові реконвалесцентів використовують у РНІФ, РНФМ, РНГА та ІЕА. *Диференціальна діагностика* передбачає виключення африканської чуми свиней, хвороби Ауєскі, грипу, парагрипу, трансмісивного гастроентериту, бешихи, пастерельозу, сальмонельозу, сибірки. При цьому слід враховувати можливість секундарних і змішаних інфекцій.

Імунітет та імунопрофілактика. Тварини, що перехворіли, набувають стійкий імунітет. В організмі тварин-реконвалесцентів і щеплених свиней виявляються вірусонейтралізувальні та преципітувальні антитіла. Вірусонейтралізувальні антитіла з'являються через 7–10 діб після інфікування чи імунізації. Максимальний їхній титр реєструється через 3–4 тижні. Істотне значення має колостральний імунітет, завдяки якому поросята можуть бути резистентними до КЧС упродовж 1–2 міс.

Для імунопрофілактики нині використовують живі вакцини, які готують здебільшого на основі аттенуйованих лапінізованих штамів К, Ровак і Гудзон.

Розроблено два варіанти живих вакцин: 1) лапінізовані, які виготовляють із внутрішніх органів і крові кролів, заражених вакцинним штамом вірусу; 2) культуральні, одержані на основі первинних або перещеплюваних культур клітин. Культуральні вакцини виявилися більш імуногенними

Живі вакцини, виготовлені на основі штаму К, безпечні для супоросних свиноматок і новонароджених поросят і генетично стабільні. Серед живих вакцин найбільшу популярність набули вакцини ВДНКІ та ЛК-ВНІІВВіМ на основі штамів вірусу, що культивують відповідно у первинних культурах клітин нирок ембріона свині та сім'яників ягнят.

Незважаючи на переваги живих вакцин при КЧС, існує потреба також і в інактивованих препаратах. Раніше широко використовувалися інактивовані формалін- і кристалвіолетвакцини, за допомогою яких вдалося істотно покращити епізоотичну ситуацію щодо КЧС. Проте із-за низки притаманних недоліків, зокрема недостатньої імуногенності, громіздкої технології виготовлення і незручності застосування, вони поступово були замінені на живі вакцини. Нині в Україні для імунопрофілактики КЧС використовують вірусвакцину на основі штаму ЛК-М.

У більшості країн Європи свиней не вакцинують проти КЧС у зв'язку з персистенцією вакцинного штаму в організмі, що значно ускладнює діагностику захворювання і тим самим перешкоджає його викоріненню. Оскільки застосування живих вакцин маскує циркуляцію збудника КЧС, у багатьох країнах проводяться дослідження щодо розробки маркованих вакцин для серологічної диференціації інфікованих та вакцинованих

тварин. Сьогодні в багатьох лабораторіях створено інфекційні копії геному пестівірусу С, що забезпечує можливість генетичних маніпуляцій, вивчення і зміни біологічних властивостей вакцинних штамів із метою створення вакцин нового покоління.

5.2.6. Родина *Picornaviridae* (пікорнавіруси)

Назва родини *Picornaviridae* походить від лат. pico – маленький, англ. rna – РНК, у зв'язку з малими розмірами вірусного геному і самих віріонів.

Згідно з інформацією МКТВ (2020), родина *Picornaviridae* об'єднує 147 видів вірусів хребетних, які входять у 63 роди.

1. Рід *Aalivirus* (1 вид): аалівірус А*. **2.** Рід *Ailurivirus* (1 вид): айлурівірус А. **3.** Рід *Ampivirus* (1 вид): ампівірус А*. **4.** Рід *Anativirus* (3 види): анатівіруси А*, В. **5.** Рід *Aphthovirus* (4 види): віруси ящуру*, риніту великої рогатої худоби А, В, риніту коней А. **6.** Рід *Aquamavirus* (1 вид): аквамавірус А*. **7.** Рід *Avihepatovirus* (1 вид): авігепатовірус А*. **8.** Рід *Avisivirus* (3 види): авісівіруси А*, В, С. **9.** Рід *Boosepivirus* (3 види): бооосепівіруси А*, В, С. **10.** Рід *Bopivirus* (1 вид): бопівірус* А. **11.** Рід *Cardiovirus* (6 видів): кардіовіруси А*, В, С, D, Е, F. **12.** Рід *Cosavirus* (5 видів): косавіруси А*, В, D, Е, F. **13.** Рід *Crahelivirus* (1 вид): крахелівірус А*. **14.** Рід *Crohivirus* (2 види): крохівіруси А*, В. **15.** Рід *Dicipivirus* (2 види): кадіціівіруси А*, В. **16.** Рід Diresapivirus (2 види): діресапівірус А*, В. **17.** Рід *Enterovirus* (15 видів): ентеровіруси С*, А, В, D, Е, F, G, H, I, J, K, L, риновіруси А, В, С. **18.** Рід *Erbovirus* (1 вид): вірус риніту коней В*. **19.** Рід *Felipivirus* (1 вид): феліпівірус А*. **20.** Рід *Fipivirus* (5 видів): фіпівіруси А*, В, С, D, Е. **21.** Рід *Gallivirus* (1 вид): галлівірус А*. **22.** Рід *Gruhelivirus* (1 вид): грухелівірус А*. **23.** Рід *Grusopivirus* (2 види): грусопівіруси А*, В. **24.** Рід *Harkavirus* (1 вид): харкавірус А*. **25.** Рід *Hemipivirus* (1 вид): геміпівірус А*. **26.** Рід *Hepatovirus* (9 видів): гепатовіруси А*, В, С, D, Е, F, G, H, I. **27.** Рід *Hunnivirus* (1 вид): хуннівірус А*. **28.** Рід *Kobuvirus* (6 видів): айчівіруси А*, В, С, D, Е, F. **29.** Рід *Kunsagivirus* (3 види): кунсагівіруси А*, В, С. **30.** Рід *Limnipivirus* (3 види): лімніпівіруси А*, В, С. **31.** Рід *Livupivirus* (1 вид): лівупівірус А*. **32.** Рід *Ludopivirus* (1 вид): лудопівірус А*. **33.** Рід *Malagasivirus* (2 види): малагасівіруси А*, В. **34.** Рід *Megrivirus* (5 видів): мелегрівіруси А*, В, С, D, Е. **35.** Рід *Mischivirus* (4 види): мішівіруси А*, В, С, D. **36.** Рід *Mosavirus* (2 види): мосавіруси А*, В. **37.** Рід *Mupivirus* (1 вид): мупівірус А*. **38.** Рід *Myrropivirus* (1 вид): мирропівірус А*. **39.** Рід *Orivirus* (1 вид): орівірус А*. **40.** Рід *Oscivirus* (1 вид): осцівірус А*. **41.** Рід *Parabovirus* (3 види): парабовіруси А*, В, С. **42.** Рід *Parechovirus* (6 видів): пареховіруси А*, В, С, D, Е, F. **43.** Рід *Pasivirus*

* Типовий вид.

(1 вид): пасівірус A*. **44.** Рід *Passerivirus* (2 види): пассерівіруси A*, B. **45.** Рід *Pemapivirus* (1 вид): пемапівірус A*. **46.** Рід *Poecivirus* (1 вид): поецівірус A*. **47.** Рід *Potamipivirus* (2 види): потаміпівіруси A*, B. **48.** Рід *Rabovirus* (4 види): рабовірус A*, B, C, D. **49.** Рід *Rafivirus* (3 види): рафівіруси A*, B, C. **50.** Рід *Rohelivirus* (1 вид): рохелівірус A*. **51.** Рід *Rosavirus* (3 види): росавіруси A*, B, C. **52.** Рід *Sakobuvirus* (1 вид): сакобувірус A*. **53.** Рід *Salivirus* (1 вид): салівірус A*. **54.** Рід *Sapelovirus* (2 види): сапеловіруси A*, B. **55.** Рід *Senecavirus* (1 вид): сенекавірус A*. **56.** Рід *Shanbavirus* (1 вид): шанбавірус A*. **57.** Рід *Sicinivirus* (1 вид): сіцінівірус A*. **58.** Рід *Symapivirus* (1 вид): симапівірус A*. **59.** Рід *Teschovirus* (2 види): тешовірус A*, B. **60.** Рід *Torchivirus* (1 вид): торчівірус A*. **61.** Рід *Tottorivirus* (1 вид): тоттовірус A*. **62.** Рід *Tremovirus* (2 види): тремовірус A*, B. **63.** Рід *Tropivirus* (1 вид): тропівірус A*.

Основні ознаки. Віріони сферичної форми, діаметром 22–30 нм (рис. 5.11). *Структура віріона:* 1) ікосаедральний капсид (60 структурних одиниць); 2) одноланцюгова РНК (плюс-нитка) із мол. масою 2,4–2,7 МДа; 3) 4 структурні протеїни. *Хімічний склад:* РНК – 30 %, протеїни – 70 %.

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом рецепторного ендоцитозу. У цитоплазмі відбувається транскрипція і реплікація вірусного геному (за участю синтезованої реплікази) та складання віріонів. Вихід віріонів із клітини здійснюється внаслідок її деструкції. Цикл репродукції триває 5–10 год.

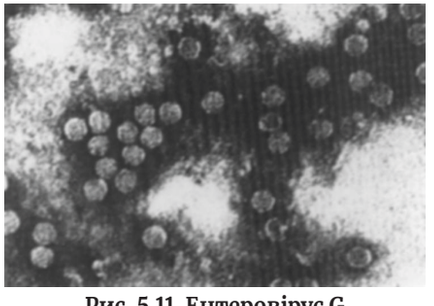


Рис. 5.11. Ентеровірус G
(Сюрін В.М. та ін., 1998)

Вірус ящуру *(Foot-and-mouth disease virus)*

Ящур – висококонтагіозна хвороба свійських і диких парнокопитних тварин із гострим перебігом, що характеризується гарячкою та афтозно-ерозійним ураженням слизової оболонки ротової порожнини і безшерстих

ділянок шкіри (голови, вимені, вінчика, міжкопитної щілини), У молодняку ящур протікає злоякісно з ураженням міокарда, скелетних м'язів, геморагічним гастроентеритом і високою летальністю (30–100 %).

Перше повідомлення про захворювання тварин на ящур з'явилося в 1546 р. в Італії. У 1764 р. у Норвегії доведено контагіозність хвороби, а у 1897 р. німецькі вчені Ф. Лефлер і П. Фрош встановили вірусну етіологію хвороби. Це був відритий перший вірус тварин. Множинність серотипів збудника встановлено у Франції в 1922 р., що мало велике практичне значення в розробці засобів діагностики і профілактики хвороби.

Згідно з даними МЕБ, щорічно ящур реєструють у 55–65 країнах світу. Україна вже кілька десятиліть є благополучною щодо цієї хвороби. Ящур завдає величезних економічних збитків. Так, під час епізоотії ящуру на Тайвані в 1997 р. загинуло і було знищено понад 4 млн. свиней, сумарні економічні збитки становили близько 10 млрд. $. За епізоотії ящура у Великій Британії в 2001 р. було знищено понад 4 млн. тварин, загальні збитки склали близько 12 млрд. $.

Характеристика вірусу. Вірус ящуру, належить до роду *Aphtovirus.* Вірус має складний антигенний склад. Розрізняють 7 серотипів: O, A, C, CAT-1, CAT-2, CAT-3 та Азія-1. Кожен серотип має певне число варіантів (підтипів): серотип A – 32 варіанти, O – 13, C – 5, CAT-1–7, CAT-2–3, CAT-3–4, Азія-1–2. Найбільш поширеними у світі є серотипи A, O і C, які зустрічаються в країнах Європи, Азії, Африки і Південної Америки. CAT-1 має поширення в Африці та Азії, CAT-2 і CAT-3 лише в Африці, а Азія-1 – тільки в Азії. Вірус епітеліотропний.

Культивування. У лабораторних умовах стандартні й польові штами вірусу ящуру підтримують в організмі лабораторних тварин і в культурах клітин. Тривале пасажування вірусу у лабораторних об'єктах призводить до його атенуації, і такий вірус стає непридатним для виготовлення інактивованих вакцин.

Із лабораторних тварин до вірусу чутливі мурчаки, новонароджені кроленята і мишенята-сисуни. Мурчаки сприйнятливі до вірусу за в/ш зараження в плантарну поверхню задніх лапок. Через 2–3 доби в мурчаків на кінцівках і слизовій оболонці рота розвиваються афти. У новонароджених мишенят і кроленят за п/ш або в/ч зараження розвиваються паралічі, і тварини гинуть. За розтину виявляють некроз скелетних м'язів і міокарда, часто уражається підшлункова залоза і надлопатковий жир.

Вірус можна підтримувати серійними пасажами і в організмі природно сприйнятливих тварин (ВРХ, свині, вівці, кози) за різних методів зараження

(в/ш в язик, п/ш, в/м, у вінчик копит і в ділянку п'ятачка у свиней). Однак цей метод дорогий і зв'язаний із небезпекою винесення вірусу за межі установи, тому використовується нечасто і лише зі спеціальною метою.

Вірус добре репродукується в первинних культурах клітин нирок теляти, свині, вівці, в перещеплюваних клітинних лініях ВНК-21, СНЕВ та ін. ЦПД з'являється через 1–3 доби та характеризується округленням і фрагментацією клітин. Вірус також розмножується в переживаючій культурі епітелію язика ВРХ, що використовується при виробництві інактивованої протящурної вакцини за методом Френкеля

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Вірус дуже стійкий у зовнішньому середовищі. У замороженому м'ясі він зберігається понад рік, у засоленому м'ясі при 1 °С – 4 міс, у ковбасах – 2 міс. У молоці вірус інактивується при 65 °С за 30 хв, при 70 °С – за 15 хв, при 80–100 °С – за кілька секунд. В охолодженому молоці вірус зберігається 12 діб, у маслі – 45 діб. Він швидко інактивується за скисання, пастеризації й кип'ятінні молока.

У стінках афт вірус зберігається понад 2 міс, на шкірі тварин – 1 міс, у гною – до 40 діб, у стічних водах у холодну пору – понад 3 міс.

Вірус стійкий до ефіру, хлороформу, чутливий до кислого (< 6,0) і лужного (> 10,0) pH. Розчини гідроксиду натрію (2 %-й), формальдегіду (2 %-й), свіжогашеного вапна (20 %-й) інактивують вірус упродовж 10–30 хв.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. До вірусу ящуру найбільш сприйнятливі ВРХ, свині, менш чутливі – вівці, кози, верблюди, буйволи, яки й інші дикі парнокопитні. Молоді тварини більш чутливі й хворіють важче, ніж дорослі. Іноді уражаються люди (особливо діти) в разі вживання молока від хворих тварин.

З організму інфікованих тварин вірус виділяється вже в інкубаційному періоді з видихуваним повітрям, слиною, молоком, сечею, калом і спермою. У більшості секретів та екскретів вірус зберігає інфекційність упродовж 5–10 діб. У період клінічного прояву хвороби вірус у найвищій концентрації міститься в стінках афт і везикулярній рідині (10^8 $ІД_{50}$ на 1 г тканини або 1 мл афтозної рідини).

Перехворювання на ящур супроводжується тривалим вірусоносійством, особливо у ВРХ. Близько 50 % виздоровілої ВРХ та овець виділяють вірус упродовж 7–8 міс, а в деяких тварин вірусовиділення триває до 2 років. Від реконвалесцентів вірус виділяють із зіскрібів епітелію глотки, м'якого піднебіння, мигдалин і стравоходу.

Висока контагіозність захворювання, довготривале вірусоносійство і виживання вірусу в зовнішньому середовищі, широкий спектр

сприйнятливих свійських і диких тварин, множинність серотипів і підтипів вірусу – всі ці чинники забезпечують збереження вірусу ящуру в природі та виникнення епізоотичних спалахів хвороби.

Джерелом збудника інфекції є хворі тварини, які виділяють вірус у навколишнє середовище з різними секретами та екскретами. З моменту зараження і до появи перших симптомів хвороби проходить від 1 до 7, а іноді і до 14 діб. За цей час хвора тварина контамінує навколо себе корм, підстилку, годівниці, напувалки, молочний посуд, інвентар (лопати, вили, мітли, скребниці), стіни і підлоги приміщень, одяг і взуття обслуговуючого персоналу. У разі недотримання правил санітарної й особистої гігієни люди, які контактували з хворими тваринами, можуть переносити збудник на великі відстані.

Зараження відбувається найчастіше за безпосереднього контакту хворих тварин зі здоровими через слизові оболонки ротової порожнини в разі споживання кормів, води або молока, облизуванні різних контамінованих предметів. Зараження можливе через пошкоджену шкіру вимені й кінцівок, а також аерогенно і внутрішньоутробно.

У поширенні вірусу ящуру велику роль відіграють продукти і сировина тваринного походження: молоко, м'ясо, субпродукти, кров, кістки, шкіра, шерсть, копита і роги від убитої худоби. Переносниками збудника інфекції можуть бути собаки, коти, коні та інші несприйнятливі тварини, а іноді – кури, качки, гуси, горобці й інші птахи. Можливе механічне перенесення вірусу з комахами і кліщами. Деякі дикі парнокопитні (лосі, кабани, сайгаки тощо) підтримують тривалу циркуляцію збудника інфекції в природі.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Потрапивши в організм, вірус проникає в епітеліальні клітини слизових оболонок ротової порожнини і дихальних шляхів, де швидко репродукується, обумовлюючи утворення первинних афт із високою концентрацією збудника. Звідси вірус поступає в кров і розноситься по всьому організму. Віремія супроводжується гарячкою. Через 48 год після зараження розвиваються вторинні афти в ротовій порожнині, на шкірі вимені, вінчика і міжкопитної щілини. Стінки афт розриваються, лімфа витікає, і на місці афт утворюються ерозії. У молодняку за злоякісного перебігу хвороби вірус інтенсивно репродукується в клітинах скелетних м'язів і міокарда, обумовлюючи тяжкі дистрофічні зміни і загибель тварин.

Клінічні ознаки хвороби залежать від індивідуальної чутливості тварин до вірусу ящуру, їхнього фізіологічного стану і ступеня вірулентності

збудника. Найяскравіше ознаки хвороби виражені в дорослої ВРХ. У інших тварин (ягнят, поросят, телят) вони можуть бути менш типовими.

У *ВРХ* інкубаційний період триває 2–7 діб, зрідка – до 3 тижнів. Перебіг хвороби гострий. За доброякісного перебігу ящуру у тварини спочатку погіршується апетит, сповільнюється жуйка, посилюється слинотеча. Потім температура тіла підвищується до 41,5°С. Відмічають пригнічення, прискорення пульсу і дихання, відсутність жуйки, різке зниження надоїв. У цей період слизова оболонка суха, гаряча, гіперемійована.

На 2–3-тю добу після початку гарячки на слизовій оболонці ротової порожнини (на верхній і нижній губі, беззубому краю нижньої щелепи), на язиці, крилах носа, іноді – на носовому дзеркалі з'являються афти, наповнені спочатку прозорою, потім – каламутною рідиною. У разі генералізації процесу утворюються характерні афтозні утворення на сосках вимені, шкірі вінчика, в міжкопитній щілині, на м'якушах копит, іноді – біля основи рогів. Через 10–36 год афти розриваються, лімфа змішується зі слиною і виділяється з ротової порожнини. Відмічають інтенсивну слинотечу, своєрідне прицмокування, пінисту масу в кутах рота. На місці тріснутих афт утворюються ерозії з нерівними краями. Температура тіла за появи афт знижується до норми. Іноді у хворих спостерігають мастити, ендометрити і діарею. Молоко слизове, з гіркуватим присмаком. Надої різко знижуються на 40–80 % і після одужання повністю не відновлюються. У новонароджених телят афти не утворюються.

Тривалість хвороби за доброякісного перебігу – до 10 діб, у разі ускладнень – до 25 діб. За злоякісного перебігу телята часто гинуть від паралічу серця. У тільних корів можуть статися аборти, затримка посліду, мертвонародження.

У овець, кіз і свиней афти з'являються частіше на кінцівках і вимені, рідше – на слизовій оболонці ротової порожнини. У свиней також уражається п'ятачок. Серед новонароджених тварин високий процент летальності (60–80 %).

Патологоанатомічні зміни. За розтину трупів загиблих тварин виявляють афти й ерозії в ротовій порожнині, іноді – на слизовій оболонці стравоходу і передшлунків.

У молодняку за злоякісного перебігу ящуру основні зміни відмічають у м'язі серця. Міокард дряблий, має сіро-жовтувате чи білувате забарвлення або смугастість («тигрове серце»); під епі- та ендокардом – крововиливи. Такі ж зміни виявляють і в скелетній мускулатурі. Печінка збільшена в об'ємі, має ознаки переродження. Також виявляють геморагічний гастроентерит.

Лабораторна діагностика. Діагноз на ящур ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

У лабораторію доставляють стінки і вміст незруйнованих афт від 2–3 хворих тварин у кількості не менше 5–10 г (у ВРХ – з язика, у свиней – із п'ятачка, у дрібних тварин – із беззубого краю верхньої щелепи та вінчика); від трупів молодняку – лімфатичні вузли голови і заглоткового кільця, підшлункову залозу, серце. Для ретроспективної діагностики надсилають сироватки крові (5–10 проб), відібраної з інтервалом 15 діб.

Лабораторна діагностика ящуру базується на експресних, вірусологічних і ретроспективних методах. *Експрес-методи:* вірусний антиген ідентифікують у РЗК, РДП, РНГА та ІЕА, вірусний геном – у ПЛР. *Вірусологічні методи.* Для ізоляції вірусу заражають чутливі тест-об'єкти – лабораторних тварин і культури клітин. 1) У разі зараження первинних культур клітин нирок телят, поросят або ягнят, перещеплюваної клітинної лінії ВНК-21 через 24 год з'являється ЦПД: округлення і фрагментація клітин. 2) Біопроба на 4–6-добових білих мишенятах, заражають п/ш або в/ч. Через 2–5 діб тварини гинуть із парезами і паралічами; за розтину виявляють некроз скелетних м'язів і міокарда. 3) Біопроба на мурчаках, заражають в/ш у плантарну поверхню задніх кінцівок. Через 2–5 діб спостерігають появу афт на лапках і слизовій оболонці ротової порожнини. Ідентифікацію виділеного вірусу здійснюють за допомогою РЗК, РНГА та ІЕА. *Ретроспективна діагностика:* виявлення антитіл у РЗК, РНГА, РН, РРІД, РНІФ та ІЕМ. *Диференціальна діагностика:* ящур треба диференціювати від везикулярного стоматиту, віспи, злоякісної катаральної гарячки, чуми ВРХ, вірусної діареї ВРХ, контагіозної ектими овець і кіз, блутангу, везикулярної екзантеми свиней, некробактеріозу, копитної гнилі.

Імунітет та імунопрофілактика. Тварини, що перехворіли, набувають імунітет до того серотипу і варіанту вірусу, який спричинив захворювання. Тривалість імунітету у ВРХ – до року, у свиней – 10 міс, а у овець – 18 міс. У телят, отриманих від вакцинованих корів, пасивний захист зберігається до 3–4 міс.

Основне значення в імунітеті за ящуру належить гуморальним антитілам. Місцевий тканинний імунітет формується раніше, ніж гуморальний, проте він нетривалий. Тому за реінфекції через 4–7 міс на місці введення вірусу утворюються афти, але генералізації процесу не відбувається.

Для імунопрофілактики ящуру розроблені інактивовані вакцини. У РФ розроблена полівалентна інактивована вакцина, що містить 7 серотипів

вірусу ящуру. В Україні у свій час застосовували моновалентні, бівалентні й тривалентні протиящурні ГОА формолвакцини на основі вірусу, який культивували в організмі 2–3-денних кроленят, переживаючій культурі епітелію язика ВРХ або в суспензійній перещеплюваній клітинній лінії ВНК-21. Для великої і дрібної рогатої худоби як ад'ювант частіше застосовують ГОА і сапонін. Для свиней застосовують емульговані вакцини. Імунітет настає через 2 тижні після імунізації та триває 8–12 міс.

Тешовірус А *(Teshovirus A)*

Тешовірус А є збудником ***тешенської хвороби*** *(хвороби Тешена, тешовірусного енцефаломієліту свиней, ензоотичного енцефаломієліту свиней).* Це висококонтагіозне захворювання з гострим перебігом, яке характеризується ураженням ЦНС (негнійним енцефаломієлітом) та супроводжується судомами і паралічами.

Хвороба вперше була діагностована в 1929 р. у Чехословаччині поблизу містечка Тешен, звідки і походить її назва. Вірусна етіологія захворювання встановлена в 1931 р. Наприкінці 1930-х рр. хворобу стали реєструвати в багатьох європейських країнах, і поступово вона поширилася по всьому світу. В Україні тешенська хвороба реєструється з 1969 р.

Економічні збитки зумовлюються високою летальністю (30–90 %) і вимушеним забоєм усіх хворих і підозрюваних щодо зараження свиней. Відчутних втрат зазнають господарства і під час проведення карантинних заходів із ліквідації хвороби.

Характеристика вірусу. Тешовірус А належить до роду *Teschovirus*. Він має один серотип вірусу, який поділяється на 2 підтипи. Вірус нейротропний.

Культивування. Вірус репродукується в первинних культурах клітин нирок, легень, серця і сім'яників поросят, перещеплюваній клітинній лінії СНЕВ. ЦПД з'являється через 3–5 діб та характеризуються зернистістю цитоплазми, округленням і рефрактильністю клітин. Адаптовані штами спричинюють ЦПД значно раніше – вже через 12–16 год після зараження культури клітин.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Вірус стійкий у зовнішньому середовищі. У солених і копчених продуктах він зберігається понад 3 тижні, у гною й інфікованих приміщеннях – 6–8 тижнів. Вірус витримує нагрівання при 60 °С упродовж 20 хв, при 70 °С – 10 хв. При 37 °С вірус виживає 17 діб, витримує висушування на сонці впродовж 3 тижнів. При 0–4 °С він зберігається рік, при –20...–80 °С – декілька років.

Вірус стійкий до дії ефіру, хлороформу, трипсину, широкого діапазону pH (2,8–9,5). Він інактивується 0,5 %-м розчином фенолу за 18 год, 2 %-м розчином формальдегіду – за 1 год, 2 %-м розчином гідроксиду натрію – за 7 год, 5 %-м хлороформом –за 3 год та 5 %-м розчином хлораміну – за 3 год.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. У природних умовах хворіють свійські й дикі свині. Більш сприйнятливі тварини 2–10-місячного віку. Дорослі тварини хворіють рідко.

Джерелом збудника інфекції є хворі тварини, реконвалесценти і латентні вірусоносії. З інфікованого організму вірус виділяється в основному з калом вже в інкубаційному періоді та в перші 2–3 доби клінічного прояву хвороби.

Воротами інфекції слугує слизова оболонка носа і травного каналу. Зараження відбувається контактним шляхом через слизову оболонку носа та аліментарно за споживання корму, води, помиїв, м'ясних або боєнських відходів, забруднених виділеннями хворих тварин. Факторами передачі збудника інфекції можуть бути транспорт, корми, вода, підстилка, предмети догляду.

Хвороба може проявитися у будь-який період року, але частіше – восени, коли холодно і вогко. У господарстві можуть уражатися від 15 до 80 % тварин уже в перші дні клінічного прояву захворювання. Воно може протікати у вигляді ензоотій чи епізоотій. Вірусоносійство спостерігається до 2 міс.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Потрапивши на слизову оболонку носа або травного каналу, вірус спочатку репродукується в мигдалинах та епітеліальних клітинах кишечнику. Потім гематогенним шляхом він проникає у ЦНС. У результаті репродукції вірусу у ЦНС розвивається запальний процес у м'якій мозковій оболонці й сірій речовині головного мозку, уражається мозочок і спинний мозок. Ураження мозочка спричинює хитку ходу, парез і параліч кінцівок, афонію із-за паралічу голосових зв'язок; ураження таламуса – підвищену чутливість шкіри (гіперстезію).

Клінічні ознаки. Інкубаційний період триває від 7–9 діб до 5 тижнів. Температура тіла підвищується до 41,5°С у продромальному періоді. Відмічають в'ялість, зниження апетиту. Через 1–2 доби температура нормалізується, і з'являються симптоми ураження ЦНС. Тварини збуджені, здійснюють мимовільні рухи. В окремих тварин спостерігається гіперестезія шкіри (болюча реакція при погладжуванні спини). Спостерігається також анорексія, хрипота, скрегіт зубів, іноді – збочення апетиту. Згодом з'являються ознаки ураження спинного мозку. Хода невпевнена, тварина поступово

втрачає рівновагу, подовгу лежить, часто на боці, здійснює кінцівками плавальні рухи, потім настає повний параліч кінцівок. Температура тіла знижується до 35°С і нижче. Характерною ознакою хвороби є закреп, який спостерігається впродовж усього періоду хвороби.

Перебіг хвороби частіше гострий із загибеллю до 90 % тварин. За підгострого перебігу летальність значно менша. Хронічний перебіг реєструється частіше в дорослих тварин і триває від декількох тижнів до кількох місяців. При цьому може загинути до 20 % тварин.

Патоморфологічні зміни. Основні патологоанатомічні зміни знаходять у ЦНС. Виявляють набряклість і гіперемію оболонок головного мозку й крапкові крововиливи. За гістологічного дослідження встановлюють негнійний менінгоенцефаліт. На зрізах мозку відмічають крововиливи, вогнищеву дегенерацію гангліозних клітин, каріорексис і вакуолізацію клітин. У довгастому і спинному мозку виявляють дегенерацію нейронів. Навколо дрібних артеріальних і венозних судин, що живлять сіру речовину мозку, розвивається запальний процес.

Також виявляють гіперемію слизових оболонок носової порожнини і кишечнику, а за хронічного перебігу – атрофію м'язів і пневмонію.

Лабораторна діагностика. Діагноз на тешенську хворобу ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патоморфологічних змін і результатів лабораторних досліджень.

У лабораторію направляють такий патологічний матеріал: за життя – кал, змиви з прямої кишки; від тварин, убитих у перші дні появи клінічних ознак хвороби, – головний і спинний мозок, слизова оболонка обідкової кишки. Слід зазначити, що до моменту загибелі вірус зникає із ЦНС. Для гістологічного дослідження матеріал фіксують 10 %-м розчином формаліну Для серологічного дослідження відбирають парні сироватки крові.

Лабораторна діагностика включає гістологічне дослідження тканин головного і спинного мозку, експресні, вірусологічні та ретроспективні методи. *Експрес-методи:* ідентифікація вірусного антигену в РІФ, вірусного геному – у ПЛР. *Вірусологічні методи.* Для ізоляції вірусу заражають первинні культури клітин нирок поросят або ембріона свині, перещеплювану клітинну лінію СНЕВ. Через 3–5 діб з'являється характерна ЦПД: зернистість цитоплазми, округлення і рефрактильність клітин. Ідентифікацію вірусу проводять у РІФ та ІЕА. *Ретроспективна діагностика:* антитіла виявляють у РН та ІЕА. *Диференціальна діагностика:* тешенську хворобу слід диференціювати від хвороби Ауєскі, сказу, класичної чуми свиней, лістеріозу і кормових отруєнь.

Імунітет та імунопрофілактика. Перехворювання свиней на тешенську хворобу супроводжується формуванням напруженого імунітету тривалістю до 9 міс. Колостральний імунітет у поросят, народжених від імунних свиноматок, триває 1 міс.

Із метою імунопрофілактики тешенської хвороби розроблені живі та інактивовані вакцини. Живі вакцини готують на основі аттенуйованих штамів вірусу, які отримують шляхом серійного пасажування в первинній або перещеплюваній культурах клітин нирок поросят. В Україні розроблено живу вакцину на основі атенуйованого штаму «Закарпатський». Живі вакцини забезпечують імунітет тривалістю до 9 міс.

Інактивовані вакцини виявилися не менш імуногенними порівняно з живими. Інактивовану емульговану вакцину готують із вірусу, репродукованого у перещеплюваній культурі клітин нирок поросят та інактивованого формаліном. Імунітет триває 11 міс. Поросята, що народжуються від імунізованих свиноматок, набувають імунітет тривалістю не менше 1 міс.

5.2.7. Родина *Caliciviridae* (каліцівіруси)

Назва родини *Caliciviridae* від лат. calix – чаша, кубок, у зв'язку із чашеподібними заглибинами на сферичній поверхні капсиду.

Згідно з інформацією МКТВ (2020), родина *Caliciviridae* об'єднує 11 родів і 13 видів.

1. Рід *Bavovirus* (1 вид): вірус Баварія*. **2.** Рід *Lagovirus* (2 види): віруси геморагічної хвороби кролів*, синдрому європейських зайців-русаків. **3.** Рід *Minovirus* (1 вид): міновірус А*. **4.** Рід *Nacovirus* (1 вид): наковірус А*. **5.** Рід *Nebovirus* (1 вид): вірус Ньюбері-1*. **6.** Рід *Norovirus* (1 вид): вірус Норволк*. **7.** Рід *Recovirus* (1 вид): рековірус А*. **8.** Рід *Salovirus* (1 вид): вірус Норланд*. **9.** Рід *Sapovirus* (1 вид): вірус Саппоро*. **10.** Рід *Valovirus* (1 вид): вірус Сен-Валерієн*. **11.** Рід *Vesivirus* (2 види): вірус везикулярної екзантеми свиней*, каліцівірус котів.

Основні ознаки. Віріони сферичної або ікосаедральної форми, діаметром 27–40 нм (рис. 5.12). *Структура віріона:* 1) ікосаедральний капсид (32 капсомери); 2) одноланцюгова РНК (плюс-нитка) із мол. масою 2,6–2,8 МДа; 3) 3 структурні протеїни. *Хімічний склад:* РНК – 18 %, протеїни – 82 %.

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом рецепторного ендоцитозу. У цитоплазмі відбувається транскрипція та реплікація вірусного геному (за участю синтезованої реплікази) і складання віріонів.

* Типовий вид.

Вихід віріонів із клітини здійснюється внаслідок її деструкції. Цикл репродукції триває 6–8 год.

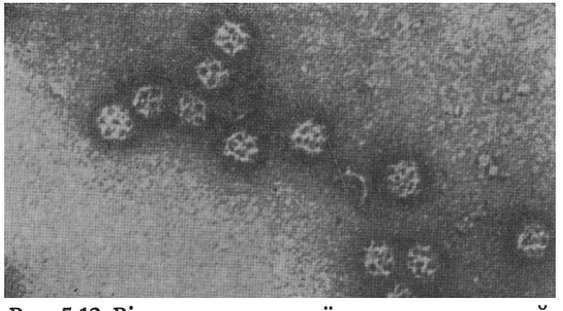


Рис. 5.12. Вірус везикулярної екзантеми свиней
(Філдс Б. та ін., 1989)

Вірус геморагічної хвороби кролів
(Rabbit hemorrhagic disease virus)

Вірусна геморагічна хвороба кролів *(некротичний гепатит кролів, ВГХК)* – висококонтагіозне захворювання з гострим перебігом, що характеризується тяжким геморагічним синдромом, дистрофічними змінами в усіх органах і високою (до 100 %) летальністю.

Хвороба вперше описана в Китаї в 1984 р., а з 1989 р. вона реєструється практично в усіх країнах із розвинутим кролівництвом. Нині вона вважається однією з найнебезпечніших захворювань кролів. Із моменту першого спалаху в 1984 р. ВГБК призвела до загибелі близько чверті мільярда диких і свійських кролів.

Характеристика вірусу. Вірус геморагічної хвороби кролів належить до роду *Lagovirus*. Він має один серотип, аглютинує еритроцити вівці, курки і людини (0 група крові) та є гепатотроним.

Культивування. Вірус репродукується в первинній і перещеплюваній культурах клітин нирок кролів. ЦПД з'являється через 48–72 год після зараження та характеризуються округленням і фрагментацією клітин.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Вірус досить стійкий у зовнішньому середовищі. У приміщеннях при 18 °С він виживає 20 діб. У печінці загиблих кролів при 4 °С вірус зберігається впродовж року. У замороженому стані при –40...–50 °С він не знижує вірулентність понад 5 років. Прогрівання при 50 °С інактивує вірус за 1 год. Вірус інактивується 0,1 %-м розчином формаліну за добу. Стійкий до ефіру, хлороформу, pH 3,0.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. До ВГХК сприйнятливі кролі незалежно від віку, породи і статі, причому найбільш чутливі дорослі особини масою 3,0–3,5 кг. На початку епізоотії першими починають хворіти дорослі тварини, потім уражаються всі вікові групи, за винятком підсисного молодняка. Гинуть практично всі тварини.

Джерелом збудника інфекції є хворі тварини, які виділяють вірус з усіма секретами й екскретами вже через добу після зараження. Зараження відбувається в основному аліментарним шляхом.

Факторами передачі збудника інфекції можуть бути трупи загиблих тварин, шкурки і пух хворих кролів, а також корми, вода, предмети догляду, підстилка та ін. Сезонність хвороби припадає на весняно-осінній період і зумовлюється наявністю в цей час найбільш сприйнятливих вікових груп молодняку. Летальність досягає спочатку практично 100 %, а в подальшому дещо знижується і становить 75–80 %.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Після проникнення в організм вірус швидко потрапляє в кров, уражає кровоносні судини, обумовлюючи явища геморагічного діатезу і дистрофічні зміни в усіх органах, особливо в легенях, нирках, печінці, селезінці та лімфовузлах.

Основний елемент у патогенезі ВГХК – тяжке пошкодження печінки, чим і пояснюються швидкоплинність хвороби і летальний наслідок. Зміни в інших органах на завершальному етапі розвитку хвороби є результатом різкого порушення функції печінки.

Клінічні ознаки. Інкубаційний період триває 2–3 доби. Зазвичай захворювання проявляється гарячкою і раптовою загибеллю. У кролів часто з'являються кров'янисті пінисті виділення з носової порожнини, тяжка дихальна недостатність і передсмертні судоми. Як виняток, кролі 45–50-денного віку виживають після зараження без прояву клінічних ознак.

Розрізняють декілька форм перебігу хвороби: блискавичний, гострий, хронічний і латентний. Безсимптомний і блискавичний перебіг хвороби переважає на початку епізоотії. У подальшому тривалість захворювання зростає, а летальність знижується.

За *блискавичного перебігу* хвороби кролі гинуть раптово без клінічних ознак. Зовні здорові тварини, приймаючи корм, видають пронизливі крики і моментально гинуть із залишками корму в роті або просто роблять кілька судомних рухів кінцівками перед загибеллю. При зовнішньому огляді неможливо відрізнити хворого кроля від інших клінічно здорових, навіть за кілька хвилин до загибелі.

За *гострого перебігу* захворювання виявляють підвищення температури до 40,8 °С, утруднене дихання, спазми і кровотечі з носа, рота й анального отвору. У вагітних самок відмічають пригнічення, іноді вони абортують.

Хронічний перебіг інфекції спостерігається у 2–3 % тварин. Це сприяє персистенції вірусу в організмі, оскільки тварини не гинуть, але й не одужують. За хронічного перебігу знижуються або повністю втрачаються репродуктивні функції, і спостерігається втрата маси тіла.

Патологоанатомічні зміни характеризуються чітко вираженою картиною геморагічного діатезу. На серозних покривах і слизових оболонках дихальних шляхів і травного каналу виявляються множинні крововиливи, кровонаповнення судин. Встановлюють також катарально-геморагічне запалення шлунка і кишечника. Печінка збільшення, жовто-брунатного кольору, щільної консистенції («варена печінка»), легко рветься, при розрізі витікає кров темно-червоного кольору, що не згортається. Нирки збільшені, мають крапчасті крововиливи під капсулою. Селезінка з притупленими краями, темно-червоного кольору з фіолетовим відтінком. Легені щільні, кровонаповнені, забарвлені в темно-червоний колір.

Лабораторна діагностика. Діагноз на вірусну геморагічну хворобу кролів ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін і результатів лабораторних досліджень.

У лабораторію направляють 2–3 трупи кролів або паренхіматозні органи (обов'язково – печінку).

Лабораторна діагностика включає експресні та вірусологічні методи. *Експрес-методи:* ідентифікація вірусного антигену в РГА і РЗГА (з еритроцитами вівці або курки), РЗК та ІЕА; виявлення вірусного геному у ПЛР. *Вірусологічні методи.* Для ізоляції вірусу ставлять біопробу на кролях, яких заражають в/м або п/ш. Через 2–3 доби тварини гинуть. Вірус ідентифікують у РЗГА, РЗК, ІЕА і ПЛР. *Диференціальна діагностика:* ВГХК необхідно диференціювати від пастерельозу, сальмонельозу, ешерихіозу, міксоматозу, еймеріозу, отруєнь, сонячного і теплового удару.

Імунітет та імунопрофілактика. Гуморальний імунітет має вирішальне значення для захисту від ГБК. Для імунопрофілактики ВГХК використовують інактивовану тканинну вакцину, яку виготовляють із печінки заражених кролів. Для інактивації вірусу використовують формалін, теотропін або β-пропіолактон. Вакцинують кролів, починаючи з 1,5-місячного віку, в/м, одноразово в дозі 0,5 мл. Імунітет настає на 3-тю – 4-ту добу і зберігається не менше 12 міс.

Швидка індукція резистентності після вакцинації зумовлена гуморальними чинниками імунітету. Специфічні антитіла, які виявляють у РН, РЗК і РЗГА, з'являються на 4–5-ту добу після вакцинації, зберігаються 15 міс і забезпечують захист від зараження. Встановлена кореляція між напруженістю поствакцинального імунітету і титром антигемаглютинінів, який має бути не нижче 1 : 32.

Пасивний імунітет у кроленят, отриманих від вакцинованих кролиць, до 30-денного віку забезпечує 100 %-й захист, а в 50–60-денному віці – 75–80 %-й захист після зараження вірулентним ВГХК.

Розроблена комбінована вакцина Песторін Мормікс (Чехія) проти ВГХК і міксоматозу, яка містить інактивований ВГХК та атенуйований вірус міксоми. Вакцину вводять п/ш у дозі 1 мл. Імунітет настає через 10 діб і триває до року.

Ефективним є застосування імунної сироватки п/ш або в/м у дозі 0,5 мл. Захисний ефект проявляється вже через 2 год і триває 30 діб.

5.2.8. Родина *Retroviridae* (ретровіруси)

Назва родини *Retroviridae* походить від лат. retro – назад, що пов'язано з активністю зворотної транскриптази вірусу і передачі генетичної інформації від РНК до ДНК.

Згідно з інформацією МКТВ (2020), родина *Retroviridae* об'єднує 2 підродини, 11 родів і 68 видів.

I. Підродина *Orthoretrovirinae* (6 родів): **1.** Рід *Alpharetrovirus* (9 видів): віруси лейкозу птахів*, мієлобластозу птахів, мієлоцитоматозу птахів, саркоми Рауса, карциноми птахів Mill Hill 2, саркоми птахів СТ10, Фуджінамі, UR2, Y73. **2.** Рід *Betaretrovirus* (5 видів): віруси пухлини молочних залоз мишей*, мавп Мейсон – Пфайзера, лангурів, ретровіруси овець Джаагсіекте, саймірі. **3.** Рід *Deltaretrovirus* (4 види): вірус лейкозу великої рогатої худоби*, Т-лімфотропні віруси приматів 1, 2, 3. **4.** Рід *Epsilonretrovirus* (3 види): віруси шкірної саркоми судаків*, епідермальної гіперплазії судаків 1, 2. **5.** Рід *Gammaretrovirus* (18 видів): віруси лейкозу мишей*, лейкемії котів, лейкемії мавп гібонів, саркоми шерстистих мавп, саркоми котів Гарднер – Арнштайн, Харді – Цукерман, Снайдер – Тейлен, саркоми мишей Харві, Фінкель – Біскіс – Джанкінс, Кірстен, Молоні, ретикулоендотеліозу, некрозу селезінки качок, онковіруси типу-С свиней, типу-С мурчаків, синцитіальний вірус курчат, ретровіруси коал, гадюк. **6.** Рід *Lentivirus* (10 видів):

* Типовий вид.

віруси імунодефіциту людини 1*, 2, мавп, великої рогатої худоби, котів, віруси інфекційної анемії коней, вісни/меді, артриту-енцефаліту кіз, хвороби Джембрана, лентівірус пум.

II. Підродина *Spumaretrovirinae* (5 родів): **1.** Рід *Bovispumavirus* (1 вид): пінистий вірус великої рогатої худоби*. **2.** Рід *Equispumavirus* (1 вид): пінистий вірус коней*. **3.** Рід *Felispumavirus* (1 вид): пінистий вірус котів*. **4.** Рід *Prosimiispumavirus* (1 вид): пінистий вірус великих коричневих галаго просіміанців*. **5.** Рід *Simiispumavirus* (15 видів): мавпячі пінисті віруси східних шимпанзе*, центральних шимпанзе, західних шимпанзе, борнейських орангутангів, гріветів, генонів, японських макак, макаки резус, мавпавуків, макак-крабоїдів, білячих мавп, тайванських макак, західних низинних горил, мармозеток, жовтобрюхий капуцинів.

Основні ознаки. Віріони сферичної форми, діаметром 80–100 нм (рис. 5.13). *Структура віріона:* 1) зовнішня ліпопротеїнова оболонка з пепломерами; 2) серцевина, яка включає ікосаедральний капсид і спіральний нуклеопротеїновий комплекс; 3) дві молекули одноланцюгової РНК (плюснитки) із мол. масою 6 МДа; 4) 8–10 структурних протеїнів, у тому числі РНК-залежна ДНК-полімераза (зворотна транскриптаза, або ревертаза) та інтеграза; 5) клітинна тРНК. *Хімічний склад:* РНК – 2 %, протеїни – 60 %, ліпіди – 35 %, вуглеводи – 3 %.

Рис. 5.13. Вірус лейкозу мишей
(Биковський А.Ф. та ін., 1983)

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом рецепторного ендоцитозу. В ядрі відбувається транскрипція і реплікація вірусного геному (за участю ревертази) з утворенням ДНК-провірусу, який інтегрує з клітинним геномом (за участю інтегрази) і транскрибується клітинною транскриптазою. Складання і вихід віріонів із клітини здійснюється брунькуванням через плазмолему. Цикл репродукції триває 24–48 год.

Вірус лейкозу ВРХ *(Bovine leukemia virus)*

Лейкоз ВРХ – хронічна інфекційна хвороба, яка характеризується злоякісною проліферацією клітин кровотворної тканини з порушенням їхнього дозрівання, внаслідок чого відбувається дифузна інфільтрація різних органів цими клітинами або з'являються пухлини.

Лейкоз ВРХ уперше діагностовано в Німеччині в 1878 р. Упродовж майже цілого століття науковці багатьох країн проводили дослідження з вивчення етіології цього захворювання. У 1960-ті рр. йшов активний пошук етіологічного агента лейкозу ВРХ, і деяким ученим вдалося виявити методом ЕМ у молоці й біопсійних тканинах хворих на лейкоз корів віріони, які були подібні до вірусу лейкозу мишей. Найбільш переконливі результати отримано в США в 1969 р., коли в короткострокових культурах лейкоцитів крові корів, хворих на лімфосаркому, було виявлено і вперше достовірно описано морфологію віріонів вірусу.

До 1960-х рр. лейкоз ВРХ не посідав значного місця в інфекційній патології тварин. Епізоотичний процес проявлявся переважно у вигляді поодиноких, не зв'язаних між собою випадків захворювання. У наступні роки захворюваність тварин на лейкоз ВРХ стала зростати.

Нині лейкоз ВРХ діагностують майже в усіх країнах світу з розвинутим тваринництвом, у тому числі і в Україні (з 1953 р.). Найбільше поширення хвороба має у США, низці країн Європи, країнах Близького Сходу й Африки, а також в Австралії. Хвороба завдає значних економічних збитків через порушення відтворення стад, вимушеного забою і вибракування високопродуктивних хворих тварин, обмежень господарської діяльності (продаж молока, племінного молодняку), витратами на оздоровчі заходи.

Характеристика вірусу. Вірус лейкозу ВРХ належить до роду *Deltaretrovirus* підродини *Orthoretrovirinae*. Вірус має один серотип, аглютинує еритроцити миші та проявляє тропізм до лімфоцитів.

На відміну від інших онкогенних ретровірусів (збудників сарком, карцином, гострих лейкозів), вірус лейкозу ВРХ не містить у геномі спеціальних генів (онкогенів), що кодують протеїни, відповідальні за клітинну трансформацію. ДНК-провірус змінює експресію клітинних генів, які знаходяться поблизу ділянки інтеграції (зокрема клітинних генів onc), завдяки чому відбувається трансформація клітин.

Вірус лейкозу ВРХ належить до екзогенних ретровірусів і не має антигенної спорідненості з відомими вірусами лейкозів інших видів тварин.

Виявлена гомологія амінокислот у вірусу лейкозу ВРХ і Т-лімфотропних вірусів приматів 1, 2, 3 (людини і мавп), які належать до роду *Deltaretrovirus.*

Культивування. Вірус культивують у короткострокових культурах лейкоцитів крові інфікованих тварин. Уже через 3–6 год інкубації клітини починають продукувати інфекційний вірус.

Для культивування вірусу використовують перещеплювану хронічно інфіковану культуру клітин FLK-BLV, яка отримана шляхом спільного культивування лімфоцитів хворої на лейкоз корови з клітинами нирки ембріона вівці. Ця клітинна лінія є одним із найкращих продуцентів вірусу: на одну клітину припадає в середньому 600 провірусних ДНК.

Окрім того, у вірусологічній практиці широко застосовуються перещеплювані хронічно інфіковані вірусом лейкозу ВРХ клітинні лінії легень ембріона корови (АІД-15), нирки ембріона корови (М118 ВСКК/П), тимусу ембріона корови (ТЭК-МВА-776 LmTT), селезінки вівці (FLS, J-1228) легень макаки-резус (BLV-Simian), легень ембріона кажана (Тб1-Lu).

Репродукція вірусу в клітинних культурах не супроводжується деструкцією клітин і руйнуванням моношару. Але, на відміну від інших ретровірусів, вірус лейкозу ВРХ спричинює виражений цитопатичний ефект у нетрансформованих клітинних лініях, зокрема в перещеплюваній культурі клітин селезінки ембріона корови (BESP), де через 4–8 діб утворюються гігантські багатоядерні клітини – синцитії. Кожне вогнище синцитію виникає внаслідок злиття 5–25 клітин і є результатом репродукції одного віріона.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Стійкість вірусу в навколишньому середовищі відносно невисока. Вірус чутливий до температурних впливів, руйнується за повторних заморожувань і відтавань. У плазмі й сироватці крові при 4 °С він зберігається впродовж 3 тижнів. Температура 56 °С інактивує вірус за 15 хв, 73–85 °С – за 30 сек, пастеризація молока при 72–74 °С – за 15–20 сек. Проте є дані, що пастеризація молока при 75 °С упродовж 30 сек не забезпечує повну інактивацію вірусу. У молоці при 1 °С вірус зберігається 3 доби, при 10 °С – 2 доби, при 14,5 °С – 1 добу.

Сонячні промені інактивують вірус упродовж 4–6 год. У кислому (рН 6,0) і лужному (рН 8,0) середовищі вірус не знижує інфекційної активності впродовж 3 год. Вірус інактивується за скисання молока (рН 4,75), під дією дезінфікуючих розчинів гідроксиду натрію (2 %-й), формальдегіду (3 %-й), хлорного вапна (з 2 % активного хлору). У рідкому азоті (–196 °С) інфіковані лімфоцити зберігають інфекційність упродовж кількох років.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. У природних умовах до вірусу сприйнятлива ВРХ. На лейкоз хворіють молоді й дорослі тварини

усіх порід але частіше у віці 4–9 років. Телята до 6-місячного віку стійкі до збудника, що обумовлено колостральним імунітетом. Здебільшого лейкоз ВРХ має латентний перебіг. Захворюваність коливається від 3 до 20 %, летальність сягає 15 %.

Експериментальна інфекція відтворюється на на вівцях за різних методів зараження (в/ч, п/ш, в/ш, в/м, і/н). Слід зазначити, що вірус лейкозу ВРХ проявляє вищу онкогенність в організмі овець: пухлини з'являються через 1–3 роки у 25 % заражених тварин, тоді як у ВРХ – максимум у 10 %. Проте в природних умовах випадків зараження овець не зареєстровано навіть за спільного утримання з інфікованою ВРХ.

Джерелом збудника інфекції є хворі тварини і латентні вірусоносії. З організму хворої або інфікованої тварини вірус виділяється з будь-якими секретами або екскретами, що містять заражені лімфоцити крові. Кров може потрапляти в секрети й екскрети внаслідок високої проникливості чи розриву кровоносних судин або безпосередньо з кров'яного русла за травм, патологічних процесів на шкірі, слизових оболонках, за різних ветеринарно-зоотехнічних процедур.

Вже на ранніх стадіях інфекції (через 15–20 діб після зараження) вірус з'являється в крові, молозиві й молоці інфікованих корів, де виявляють віріони або лімфоцити з інтегрованим вірусним геномом. Біопрепарати, що виготовляються з крові, молозиво і молоко є важливими факторами передачі збудника інфекції.

У слині, сечі, калі, носових виділеннях вірус не виявлений. Стосовно наявності вірусу в спермі серопозитивних биків-плідників існує думка, що сперма інфікованих биків становить небезпеку лише в тому разі, якщо вона містить інфіковані лімфоцити крові (наприклад, у разі запальних процесів).

У природних умовах поширені два механізми передачі вірусу лейкозу ВРХ: пренатальний (вертикальний) і постнатальний (горизонтальний).

Пренатальний механізм передачі збудника інфекції полягає у внутрішньоутробному зараженні плоду. Це відбувається у 8–23 % телят, народжених від інфікованих матерів. Бувають надзвичайно рідкісні випадки генетичної передачі збудника, що зумовлено інтеграцією вірусного геному з геномом гермінальних клітин, з яких формуються яйцеклітини і сперматозоїди.

Постнатальний механізм передачі збудника інфекції здійснюється такими шляхами: 1) парентеральний (через кров) – передача вірусу через контаміновані об'єкти під час проведення ветеринарно-зоотехнічних процедур (ректальні дослідження, фіксація за носові перегородки, масові вакцинації, взяття крові, проведення хірургічних операцій тощо);

2) контактний (через слизові оболонки носа, кон'юнктиви, статевих органів); факторами передачі вірусу слугують секрети та екскрети, які містять інфіковані лімфоцити; 3) аліментарний – через молозиво і молоко.

Хоч молозиво і молоко інфікованих корів містить вірус або заражені лімфоцити і в експерименті вдається заразити телят шляхом згодовування їм молока серопозитивних корів, у природних умовах аліментарний шлях зараження відбувається нечасто – лише у 6–8 % телят. Це пов'язано з наявністю у них колостральних антитіл, отриманих із молозивом інфікованої матері. Вірус лейкозу ВРХ має низьку інфекційність і не здатний подолати імунологічний захист. Своєчасне виявлення і видалення зі стада внутрішньоутробно інфікованих телят та випоювання іншим молозива й молока від здорових корів дає змогу використати 80 % молодняку для відтворення стада в процесі оздоровчих заходів і для племінного продажу.

Важливе значення в передачі вірусу лейкозу ВРХ має кров. Для зараження корови достатньо ввести в/ш 2500 лімфоцитів крові (0,0005 мл цільної крові). Це треба враховувати під час проведення ветеринарно-зоотехнічних заходів (взяття крові, вакцинація, туберкулінізація, обрізання рогів, кастрація тощо), і для кожної тварини треба використовувати окремий стерильний інструмент. Недотримання цього елементарного правила різко підвищує інфікованість тварин неблагополучних господарств. Окрім того, в разі проведення лікувально-профілактичних заходів треба виключити можливість передачу вірусу з біопрепаратами, які виготовляють із крові (імунні сироватки, сироватки реконвалесцентів, неспецифічні гаммаглобуліни).

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Патогенез лейкозу ВРХ визначається взаємовідносинами вірусу і клітин. Хвороба частіше протікає в латентній формі. Латентна інфекція є безсимптомною персистенцією вірусу, коли не відбувається повний цикл його репродукції і в клітинах хазяїна вірус паразитує у вигляді інтегрованого ДНК-провірусу. За латентної інфекції під дією певних чинників може індукуватися інтенсивна репродукція вірусу, що призводить до прояву клінічних ознак хвороби.

Проникнення вірусу в організм здебільшого обмежується лише проявом безсимптомного вірусоносійства, про що свідчить наявність специфічних антитіл. Розвиток гематологічних ознак захворювання (персистентний лімфоцитоз) відмічається в 30 % тварин, а пухлинну форму лейкозу – тільки в 0,1–10 % інфікованих тварин.

Основною ознакою лейкозу ВРХ є порушення нормального процесу проліферації та дозрівання клітин кровотворних тканин. Найчастіше

відбувається злоякісна проліферація різних типів лейкоцитів у кістковому мозку, селезінці, лімфатичних вузлах. Клітини крові, які безконтрольно розмножуються, поширюються по організму і, потрапляючи в різні органи й тканини, зумовлюють утворення пухлин. У результаті змінюється структура і функція уражених органів, порушується кровотворення, збільшується кількість лейкоцитів у крові. Зокрема, розвивається персистентний лімфоцитоз, який характеризується підвищенням у крові кількості циркулювальних В-лімфоцитів до 40–80 % від загальної кількості, тоді як у здорової тварини В-лімфоцити складають 15–20 %

Клінічні ознаки. Тривалість інкубаційного періоду за лейкозу ВРХ (від моменту проникнення вірусу в організм до появи гематологічних змін) у природних умовах – 2–6 років, за експериментального зараження – від 2 міс до 2 років.

Вірус лейкозу ВРХ спричинює ензоотичну форму хвороби, що об'єднує дві групи захворювань. *Системні лейкози* характеризуються системним ураженням кровотворної та лімфоїдної тканини із залученням в інфекційний процес кісткового мозку, селезінки і лімфатичних вузлів. До системних лейкозів належать лімфоїдний і мієлоїдний лейкози та злоякісний гістіоцитоз. *Пухлинні лейкози* характеризуються первинним ураженням лімфоїдної тканини. До них належать лімфосаркома, плазмоцитома, ретикулосаркома і лімфогранулематоз.

Найпоширенішими формами лейкозу ВРХ є лімфоїдний лейкоз і лімфосаркома. Рідше зустрічається лімфогранулематоз і дуже рідко – інші форми хвороби.

Для лейкозу ВРХ характерна стадійність інфекційного процесу, який розвивається повільно і в ньому розрізняють 4 стадії: передлейкозна, початкова (доклінічна, субклінічна), розгорнута (клініко-гематологічна) і термінальна (пухлинна).

Передлейкозна стадія діагностується за допомогою серологічних і вірусологічних досліджень. В окремих заражених тварин вона проявляється у вигляді відносного лімфоцитозу (до 14000/мкл) за рахунок лімфоїдних клітин, характерних для підозрілих у захворюванні за «лейкозним ключем». Виявити інші патологічні зміни не вдається.

Початкова (субклінічна) стадія характеризується відсутністю клінічних ознак хвороби, але постійними змінами кількісного та якісного складу крові. Число лейкоцитів коливається від 15000 до 40000/мкл, а серед лімфоцитів переважають юні й середні клітини. Гематологічні зміни можуть залишатися стабільними впродовж багатьох років. Водночас якихось

інших ознак хвороби не виявляється. Лише в разі загострення хвороби можуть з'являтися такі ознаки, як зниження надоїв, виснаження тощо.

Розгорнута (клініко-гематологічна) стадія триває 1–2 роки (рідше до 3 років) та супроводжується, крім гематологічних зрушень, різноманітністю специфічних і неспецифічних клінічних ознак. У тварини погіршується загальний стан, відзначаються швидка стомлюваність, поганий апетит, знижуються надої, прогресує виснаження, спостерігається атонія передшлунків, що часто змінюється діареєю. У зв'язку із серцевою слабкістю у тварини розвиваються набряки підшкірної клітковини в ділянці підгруддя і міжщелепного простору.

Патогномонічною клінічною ознакою захворювання є прогресуюче збільшення поверхневих лімфатичних вузлів. У молодняку разом зі збільшенням лімфатичних вузлів у ділянці голодної ямки, попереку, шиї часто відмічають пухлиноподібні розростання зобної залози, що обумовлюють ускладнене дихання. За значного збільшення селезінки можливий її розрив, і тварина несподівано гине від внутрішнього крововиливу. Відмічають також збільшення печінки. Значне збільшення деяких лімфатичних вузлів, а також пухлинних розростань у тазовій і черевній ділянках встановлюють за ректального дослідження. У деяких хворих тварин відмічають екзофтальм (витрішкуватість). За розгорнутої стадії лейкозного процесу виявляють лейкемічну картину крові (40000 і більше лейкоцитів в 1 мкл крові).

Термінальна (пухлинна) стадія лейкозу характеризується подальшим розвитком патологічного процесу і виразним проявом клінічних ознак: різким збільшенням лімфатичних вузлів, які можуть помітно виступати на тілі; набряками підшкірної клітковини в ділянці підгруддя, міжщелепного простору, кінцівок. Число лейкоцитів у крові іноді знижується, при цьому переважають їхні патологічні форми. Це призводить до виснаження органів кровотворення, блокади імунної системи і закінчується смертю тварини.

У ВРХ буває *шкірна форма* лейкозу. На тілі тварини з'являються вузликові припухлості діаметром до 2,5 см, добре помітні на шиї, спині, крижах і стегнах. Упродовж кількох тижнів відбувається облисіння припухлостей, їхня поверхня покривається кірками, які з часом відпадають, а облисілі ділянки знову покриваються шерстю. Проте через кілька місяців після уявного одужання настає рецидив із появою тих самих ознак хвороби, відбувається інфільтрація вісцелярних органів, і тварина гине.

Патоморфологічні зміни. Усі форми лейкозу ВРХ характеризуються збільшенням лімфатичних вузлів. За системних лейкозів (окрім злоякісного гістіоцитозу) вони збільшені рівномірно, капсула знімається легко, на

розрізі сіро-білого кольору, соковиті, салоподібні. За пухлинних лейкозів, а також за злоякісного гістіоцитозу лімфатичні вузли бугристі, капсула зрощена з паренхімою, на розрізі виявляють крововиливи і некрози.

За всіх форм лейкозу ВРХ відмічають дифузні або вогнищеві пухлинні розростання сіро-білого або сіро-жовтого кольору в органах черевної й тазової порожнин, на серозних оболонках.

Селезінка збільшена в усіх випадках системного лейкозу і в 40–60 % випадків лімфогранулематозу. За лімфосаркоми і ретикулосаркоми селезінка не збільшена. У термінальній стадії хвороби може відбуватися розрив селезінки.

За гістологічного дослідження виявляють дифузну інфільтрацію різних органів лімфоцитами і появу незрілих клітин. Це спостерігається в усіх органах кровотворення: кістковому мозку, селезінці, лімфатичних вузлах, а також у пейєрових бляшках і фолікулах кишечника, печінки, нирках, серці, легенях та скелетній мускулатурі.

Лабораторна діагностика. Діагноз на лейкоз ВРХ ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патоморфологічних змін і результатів лабораторних досліджень.

Лабораторна діагностика включає серологічні, вірусологічні, гематологічні та гістологічні дослідження. Для *серологічного дослідження* беруть кров з яремної вени від тварин, починаючи з 6-місячного віку. У лабораторію направляють 5–6 мл сироватки в термосі з льодом. Для *гематологічного дослідження* беруть кров з антикоагулянтом – 10 %-м трилоном Б. Не дозволяється брати кров від тварин за 15 діб до отелення і 15 діб після нього. Для *вірусологічного дослідження* беруть кров із 2,5 %-м розчином натрію цитрату або гепарином. Для *гістологічного дослідження* відбирають шматочки уражених органів (селезінки, лімфатичних вузлів, грудної кісти, печінки, нирок, легень, серця і правого вушка серцевого м'яза, сичуга, матки, скелетних м'язів).

Основу діагностики лейкозу ВРХ становить *серологічні методи* – РІД та ІЕА, за допомогою яких виявляють специфічні антитіла. Крім того, для виявлення антитіл розроблені інші серологічні реакції – РНІФ, РНГА, РАЛ, ЗІЕФ, проте вони за чутливістю поступаються РІД та ІЕА.

Вірусологічні методи. Для ізоляції вірусу використовують короткострокову культуру лейкоцитів крові інфікованих тварин (48–72 год інкубації при 37 °С) або співкультивують лімфоцити крові інфікованих тварин із клітинами моношарової культури (субкультури легень ембріона корови). Вірус виділяють також у перещеплюваній культурі клітин BESP, заражаючи

її безклітинним фільтратом. Індикацію вірусу проводять у РБТЛ і за появою ЦПД (тест синцитієутворення).

Реакція бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) визначає відсоток трансформованих лімфоцитів (перехідні клітини, бласти, мітози) шляхом підрахунку не менше 1000 клітин у короткострокових культурах лімфоцитів крові інфікованих тварин. У здорових корів показник РБТЛ складає 58–62 %, а у хворих – знижений уже в субклінічній стадії і коливається від 0 до 40 %. Гематологічний діагноз на лейкоз ВРХ вважається підтвердженим за показника РБТЛ не більше 35 %. Якщо він вищий, то постановку реакції повторюють з інтервалом 3 міс.

Тест синцитієутворення ґрунтується на здатності вірусу лейкозу ВРХ утворювати через 4–8 діб синцитії в перещеплюваній культурі клітин BESP або в разі співкультивування лімфоцитів крові інфікованих тварин із клітинами моношарової культури.

Ідентифікацію вірусу, виділеного в різних типах культур клітин, проводять методами ЕМ, РІФ, РІА і у ПЛР.

Оскільки вірус лейкозу ВРХ знаходиться в лімфоцитах крові інфікованих тварин у вигляді провірусної ДНК, її можна виявити за допомогою *ПЛР* уже через 2 тижні після зараження тварин та ідентифікувати одну копію вірусного геному на 100 тисяч лімфоцитів крові (10 копій ДНК в 1 мкг досліджуваної проби).

Диференціальна діагностика: лейкоз ВРХ треба диференціювати від актиномікозу, туберкульозу, паратуберкульозу, бруцельозу та інших захворювань, що супроводжуються подібними клінічними ознаками.

Імунітет та імунопрофілактика. Для лейкозу ВРХ характерна наявність високого титру специфічних антитіл та інтегрованого ДНК-провірусу, що знаходиться в лімфоцитах у репресованому стані. Лейкоз розвивається не у всіх інфікованих тварин. Для розвитку хвороби, крім наявності вірусу, потрібні інші чинники, які входять у поняття резистентності організму.

У тварин, заражених вірусом лейкозу ВРХ, розвивається гуморальна відповідь, спрямована проти поверхневих вірусних антигенів. Проте ці антитіла не захищають організм від розвитку пухлин, оскільки їхній титр постійно зростає безпосередньо до самої загибелі тварин. Ймовірно, що з протипухлинним захистом зв'язані антитіла проти трансплантаційних антигенів на плазмолемі трансформованих клітин, що відрізняються від антигенів вірусу лейкозу ВРХ. Захисні механізми проти пухлин залишаються в основному невідомими.

В інфікованих лімфоцитах вірус захищений від дії антитіл. Тому тварини, заражені в пренатальний або постнатальний періоди в природних умовах чи в експерименті, залишаються інфікованими на все життя, незважаючи на постійну присутність антитіл

Преципітувальні антитіла з'являються через 15–30 діб (за даними деяких авторів – через 1,5–2 міс) після зараження і зберігаються довічно. Наявність антитіл навіть у високих титрах не пригнічує процес злоякісної трансформації клітин і не попереджує розвиток пухлин. Водночас колостральні антитіла, отримані з молозивом інфікованих матерів, захищають молодняк від інфекції впродовж 3–6 міс навіть за підсисного методу вирощування. Більшість телят втрачає пасивний імунітет до 3-місячного віку, і в подальшому вони можуть заразитися вірусом лейкозу ВРХ, який міститься в збірному молоці серопозитивних корів. Потомство від серонегативних корів є чутливим до зараження відразу після народження.

З метою імунопрофілактики лейкозу ВРХ за кордоном і в Україні в ролі протилейкозних вакцин випробовувані цільновіріонні імуногени, глікопротеїнові й протеїнові вірусні антигени, пухлинні й лейкозні лізати, різні рекомбінанти. Зокрема, в Україні розроблено кілька варіантів інактивованої протилейкозної вакцини на основі лізатів короткостроково культивованих лейкоцитів хворої ВРХ та інфікованих овець, а також та на основі нативних лейкоцитів хворої ВРХ. У РФ сконструйована рекомбінантна вакцина з використанням векторного вірусу вісповакцини. Позитивний ефект застосування вакцинних препаратів спостерігається за умови чіткого моніторингу вірусу лейкозу ВРХ у неблагополучному стаді, вилучення інфікованих тварин і суворого дотримання ветеринарно-санітарних правил.

5.2.9. Родина *Reoviridae* (реовіруси)

Назва родини *Reoviridae* походить від англ. respiratory, enteric, orphan (сирота), що вказує на джерело виділення вірусів і певну невизначеність щодо спричинюваних ними захворювань.

Згідно з інформацією МКТВ (2020 р.), родина *Reoviridae* поділяється на 2 підродини, 6 родів та об'єднує 55 видів вірусів хребетних.

I. Підродина *Sedoreovirinae* (3 роди): **1.** Рід *Orbivirus* (22 види): віруси блутанга*, африканської чуми коней, перуанської чуми коней, енцефалозу коней, епізоотичної геморагічної хвороби, Чангвінола, Ченуда, ущелини

* Типовий вид.

Чобар, Корріпарта, Евбенандже, Великого Острова, Ієрі, Лебомбо, Орунго, Пальям, річки Санкт Круа, Уматілла, Вад Медані, Валлал, Варрего, Вонгорр, орбівірус Юньнань. **2.** Рід *Rotavirus* (9 видів): ротавіруси A*, B, C, D, E, F, G, H, I. **3.** Рід *Seadornavirus* (3 види): віруси Банна*, Кадіпіро, Ляонін.

II. Підродина *Spinareovirinae* (3 роди): **1.** Рід *Aquareovirus* (7 видів): аквареовіруси A*, B, C, D, E, F, G. **2.** Рід *Coltivirus* (5 видів): колтівіруси колорадської кліщової гарячки*, Еяч, Кундаль, лісу Тай, Тарумідзу. **3.** Рід *Orthoreovirus* (9 видів): ортореовіруси ссавців*, бабуїнів, Бухти Нельсона, птахів, риб, Брума, черепах, рептилій, новий ортореовірус птахів.

Основні ознаки. Віріони сферичної форми, діаметром 60–80 нм (рис. 5.14). *Структура віріона:* 1) два ікосаедральні капсиди; 2) дволанцюгова фрагментована РНК (10–12 фрагментів) із мол. масою 12–20 МДа, яка разом із внутрішнім капсидом утворює серцевину; 3) 6–10 структурних протеїнів, у тому числі РНК-залежна РНК-полімераза (транскриптаза). *Хімічний склад:* РНК – 15–20 %, протеїни – 80–85 %.

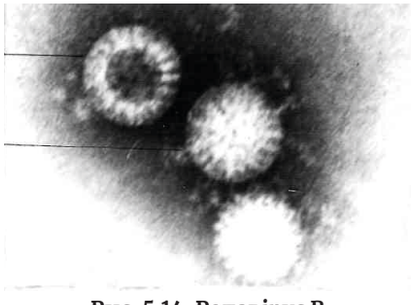


Рис. 5.14. Ротавірус В
(Скибіцький В.Г., 1994)

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом рецепторного ендоцитозу. У цитоплазмі відбувається транскрипція та реплікація вірусного геному (за участю вірусної транскриптази, що функціонує як і репліказа) і складання віріонів. Вихід віріонів із клітини здійснюється внаслідок її деструкції. Цикл репродукції триває 8–10 год.

Ротавіруси А, В і С *(Rotaviruses A, B, C)*

Ротавіруси А, В і С є збудниками ***ротавірусної інфекції ВРХ.*** Це контагіозне захворювання новонароджених телят із гострим перебігом, яке характеризується катаральним або катарально-геморагічним

некротизувальним ентеритом, дегідратацією та інтоксикацією організму і високою летальністю.

Уперше ротавірус був виділений у 1969 р. у США з калу телят із симптомокомплексом діареї. Нині ротавірусна інфекція ВРХ поширена в більшості країн світу, в тому числі і в Україні, і є актуальною проблемою у зв'язку з високою захворюваністю (40–100 %) і летальністю (15–40 %) телят. У 75–80 % господарств ротавірусна інфекція протікає в асоціації з іншими вірусами і бактеріями, зокрема з коронавірусною інфекцією ВРХ та ешерихіозом, що треба враховувати за постановки діагнозу і розробки засобів імунопрофілактики.

Характеристика вірусів. Ротавіруси А, В і С належать до роду *Rotavirus* підродини *Sedoreovirinae.* В електронному мікроскопі віріони ротавірусів нагадують колесо з короткими спицями й ободом, звідси і походить назва вірусів (від лат. rota – колесо). Усі ротавіруси мають спільний групоспецифічний антиген, зв'язаний із внутрішнім капсидом. Антигени зовнішнього капсиду VP4 і VP7 є типоспецифічними. Встановлено 13 серотипів за антигеном VP4 і 12 серотипів за антигеном VP7. Віруси аглютинують еритроцити мурчака і людини (0 групи крові) і проявляють тропізм до епітеліальних клітин слизової оболонки тонкого кишечнику.

Культивування. Ротавіруси А, В і С важко культивуються *in vitro*. Їх вдається адаптувати до первинних культур клітин нирок, легень і трахеї ембріона корови, нирок африканських зелених мавп, макак-резусів, овець, одноденних поросят, а також до перещеплюваних ліній МА-104, МДВК, ВНК-21, Vero, L. ЦПД з'являється через 24 год і характеризується вакуолізацією цитоплазми, округленням і фрагментацією клітин, утворенням серпоподібних клітин і цитоплазматичних тілець-включень. ЦПД проявляється тільки за високої концентрації вірусу, а за низької – нагадує спонтанну дегенерацію клітин. У перших пасажах неадаптовані штами обумовлюють деструкцію 30–40 % моношару, а після 5–10 пасажів – 60–100 %.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Ротавіруси А, В і С досить стійкі в зовнішньому середовищі. У калі за кімнатної температури віруси зберігаються до 7 міс, при –60 °С – упродовж кількох місяців, при 4 °С – до 1 міс. Прогрівання при 45–50 °С інактивує віруси за 3 год, а при 56–60 °С – за 30 хв. Стійкі до хлороформу, ефіру, pH 3,0. Дезінфікуючі розчини формаліну (10 %-й), лізолу (5 %-й) інактивують віруси за 2 год.

Патогенність і шляхи передачі збудників інфекції. Ротавіруси А, В і С мають широкий спектр патогенної активності, особливо ротавірус А, який уражає

людей і різні види тварин. Ротавіруси B і C, окрім людини, уражають ВРХ і свиней. Основне значення у виникненні діареї має ротавірус A.

У природних умовах хворіють телята у перші 2 тижні життя. Найбільша кількість захворілих і загиблих тварин припадає на 2-гу – 3-тю добу життя.

Джерелом збудника інфекції є хворі телята, які виділяють велику кількість вірусу з калом (10^{10}–19^{12} віріонів на 1 г) упродовж 1–2 тижнів і навіть до 20-денного віку, а також тварини-вірусоносії. Зараження телят відбувається фекально-оральним шляхом у перші години після народження. Передача вірусу здійснюється шляхом прямого контакту, а також через інфіковані предмети догляду.

Найчастіше хворобу реєструють пізньою зимою або ранньою весною. Сприяючими факторами для початку захворювання є висока щільність новонароджених телят та значні коливання температури в денний і нічний час.

Важливе епізоотологічне значення надається фактам виявлення ротавірусів A, B, C у калі клінічно здорових телят, а також здатності їх уражати не лише телят, а й інші види тварин (зокрема поросят). У поширенні збудників істотну роль можуть відігравати собаки і коти. У персистенції ротавірусів у стаді важливе значення має повторне інфікування дорослих тварин від телят.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Віруси проникають в організм через травний тракт та уражають циліндричні епітеліальні клітини ворсинок тонкого кишечнику, що призводить до їхньої загибелі й десквамації. Десквамовані клітини заміщуються незрілими (кубічними) епітеліальними клітинами, внаслідок чого порушуються процеси травлення і всмоктування, розвивається діарея, зневоднення і загибель. Слід відмітити, що ротавірус розмножується в кишечнику заражених тварин в асоціації з патогенними та умовно патогенними мікроорганізмами, зумовлюючи діарейний синдром.

Клінічні ознаки. Інкубаційний період короткий, здебільшого тривалість його не перевищує 24 год. Основними ознаками хвороби є пронос, дегідратація тканин і виражена інтоксикація. Клінічні ознаки хвороби виявляються переважно у телят до 20-добового віку. Утелят старших вікових груп і дорослих тварин реєструється латентний перебіг хвороби.

Температура тіла зазвичай не підвищується, лише в окремих тварин іноді піднімається до 41°C. Діарея виникає раптово. Телята лежать, відмовляються від молозива (молока). Кал водянистий, часто містить слиз, інколи – кров і фрагменти пошкодженої слизової оболонки кишечника.

Якщо тварин не лікувати, швидко з'являються ознаки дегідратації, інтоксикації, і вони гинуть упродовж тижня.

Нерідко спостерігається двофазний перебіг хвороби: спочатку – незначний розлад травлення у вигляді проносу, потім через 2–3 доби – ознаки інтоксикації, глибокого ураження системи травлення. Телята пригнічені, відмовляються від води, у них відмічають атаксію й депресію. За розвитку хвороби кал набуває брудно-жовтого кольору, інколи містить домішки крові. Відмічають западання очей, дегідратацію організму, фібриляцію м'язів кінцівок, витікання в'язкої слини, тахікардію, коматозний стан. Хвороба триває від 2 до 5 діб і закінчується загибеллю.

Патоморфологічні зміни. У загиблих телят виявляють ознаки дегідратації, западіння очей, суху скуйовджену шерсть, забруднення калом задньої частини тулуба і кінцівок. У тонкому кишечнику вміст рідкий із неперетравленими залишками молока. За гістологічного дослідження зрізів кишечника виявляють атрофію кишкових ворсинок аж до повного зникнення епітелію на деяких ділянках, заміщення циліндричного епітелію кубічним.

Лабораторна діагностика. Діагноз на ротавірусну інфекцію ВРХ ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патоморфологічних змін і результатів лабораторних досліджень. За постановки діагнозу слід враховувати, що ротавірусна інфекція ВРХ може протікати в асоціації з коронавірусною інфекцією ВРХ та ешерихіозом.

У лабораторію направляють не менше 10 проб рідкого калу, відібраних від 2–15-денних телят із клінічними ознаками діареї на 1-шу – 3-тю добу захворювання, а від трупів – тонкий кишечник із вмістом. Для серологічного дослідження беруть парні сироватки крові перехворілих тварин, а також сироватки крові корів і проби молозива.

Лабораторна діагностика базується на експресних, вірусологічних і ретроспективних методах. *Експрес-методи:* вірусний антиген ідентифікують у РІФ, РЗК, РДП, ЗІЕФ, РАЛ та ІЕА, вірусний геном – у ПЛР, а віріони вірусів – методами ЕМ та ІЕМ. *Вірусологічні методи.* За наявності в лабораторії відповідних умов ізоляцію вірусу проводять у первинній культурі клітин нирок ембріона корови або перещеплюваній клітинній лінії Vero. Через 24 год з'являється ЦПД: округлення і фрагментація клітин, утворення серпоподібних клітин і цитоплазматичних тілець-включень. Треба мати на увазі, що ЦПД проявляється за високої концентрації вірусу, а за низької – нагадує спонтанну дегенерацію клітин. Ідентифікацію виділеного вірусу здійснюють у РІФ, РЗК, РДП, ЗІЕФ та ІЕА. *Ретроспективні методи:* для виявлення антитіл використовують РЗК, РНІФ, РЗГА, РН, ІЕА. За *диференціальної*

діагностики треба виключити коронавірусну і парвовірусну інфекції ВРХ, вірусну діарею ВРХ, ешерихіоз, псевдомоноз, сальмонельоз, а також діареї неінфекційного характеру.

Імунітет та імунопрофілактика. В імунітеті проти ротавірусної інфекції ВРХ провідна роль належить молозивним антитілам, які циркулюють у просвіті кишечника новонароджених телят (до адсорбції їх у кров). Механізм протективної дії колостральних антитіл полягає в тому, що вони подібно захисній плівці блокують здатність вірусів прикріплюватися і репродукуватися в епітеліальних клітинах кишечника.

Крім молозивних антитіл, важливе значення мають також секреторні антитіла класу IgA слизової оболонки тонкого кишечника, які блокують збудників у місці проникнення і репродукції. Гуморальні антитіла, отримані з молозивом матері, слабо захищають телят від зараження ротавірусами. За даними багатьох фахівців, не відмічено істотної різниці в інтенсивності прояву клінічних ознак і тяжкості перебігу хвороби в серопозитивних та серонегативних телят.

В основі імунопрофілактики ротавірусної інфекцій ВРХ лежить вакцинація тільних корів і випоювання телятам молозива з високим вмістом антитіл. Нині запропоновано цілу низку живих та інактивованих вакцин, більшість з яких не вийшла за межі виробничого випробування. Оскільки ротавірусна інфекція ВРХ частіше протікає в асоціації з іншими патогенами, раціональним є конструювання комбінованих препаратів. В Україні запропоновано кілька вакцин, зокрема інактивована вакцина «Рокоген» проти рота- і коронавірусної інфекцій ВРХ, а також полівалентна сироватка проти ІРТ, ПГ-3, ВД ровірусної та коронавірусної інфекцій ВРХ. У РФ розроблена інактивована вакцина Комбовак-А проти ІРТ, ПГ-3, ВД, РС, рота-, корона- та аденовірусної инфекцій ВРХ.

5.2.10. Родина *Birnaviridae* (бірнавіруси)

Назва родини *Birnaviridae* пов'язана з тим, що вірусний геном являє собою дволанцюгову РНК, сегментовану на два фрагменти (лат. bi – два, англ. rna – РНК).

Згідно з інформацією МКТВ (2020), родина *Birnaviridae* об'єднує 3 роди і 5 видів.

1. Рід *Aquabirnavirus* (2 види): віруси інфекційного некрозу підшлункової залози*, асциту жовтохвостів. **2.** Рід *Avibirnavirus* (1 вид): вірус інфекційної

* Типовий вид.

бурсальної хвороби*. **3.** Рід *Blosnavirus* (2 види): вірус плямистих змієголовів*, бірнавірус латесів.

Основні ознаки. Віріони ікосаедральної форми, діаметром 60–70 нм (рис. 5.15). *Структура віріона:* 1) ікосаедральний капсид (132 капсомери); 2) дволанцюгова фрагментована РНК (2 фрагменти) із мол. масою 4,8 МДа; 3) 4 структурні протеїни, у тому числі РНК-залежна РНК-полімераза (транскриптаза). *Хімічний склад:* РНК – 10 %, протеїни – 90 %.

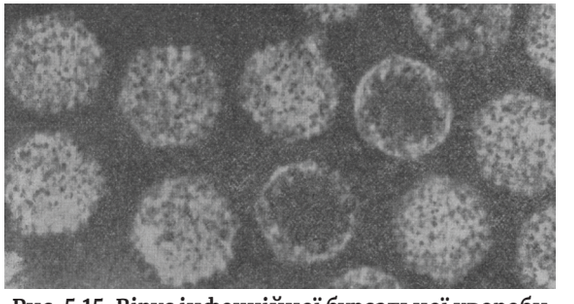


Рис. 5.15. Вірус інфекційної бурсальної хвороби
(Філдс Б. та ін., 1989)

Особливості репродукції. Віріони проникають у клітину шляхом рецепторного ендоцитозу. У цитоплазмі відбувається транскрипція та реплікація вірусного геному (за участю вірусної транскриптази і синтезованої реплікази) і складання віріонів, а вихід із клітини – внаслідок її деструкції. Цикл репродукції триває 6–8 год.

Вірус інфекційної бурсальної хвороби
(Infectious bursal disease virus)

Інфекційна бурсальна хвороба *(інфекційний бурсит курей, хвороба Гамборо, ІБХ)* – це висококонтагіозна хвороба курчат, переважно 3–15-тижневого віку, з гострим перебігом, що характеризується ураженням фабрицієвої сумки, нирок, травного канату і внутрішньом'язовими геморагіями.

Уперше хворобу діагностовано у 1957 р. у США у місті Гамборо, звідки й вона отримала свою первинну назву. Нині ІБХ поширена у більшості країн світу, у тому числі і в Україні.

Економічні збитки від ІБХ обумовлені загибеллю птахів, зниженням м'ясної продуктивності, вимушеним вибраковуванням і витратами на проведення профілактичних та оздоровчих заходів. На тлі вірусіндукованої

імуносупресії розвиваються секундарні інфекції, а птиця не здатна повноцінно реагувати на введення вакцин проти інших інфекційних хвороб.

Характеристика вірусу. Вірус ІБХ належить до роду *Avibirnavirus*. Відомо 2 серотипи вірусу. Штами 1-го серотипу патогенні для курей, а 2-го серотипу – для індиків і качок. Їхня антигенна спорідненість не перевищує 10–30 %, тому перехресний імунітет мінімальний. У природі циркулюють різні сероваріанти 1-го серотипу, які з'явилися, очевидно, внаслідок антигенного дрейфу вірусу і спричинюють імуносупресію без прояву клінічних ознак захворювання в курчат старших вікових груп. Високовірулентні штами вірусу обумовлюють загибель до 80 % поголів'я.

Культивування. Вірус добре репродукується в 10–12-добових курячих ембріонах за різних методів зараження (в алантоїсну порожнину, на ХАО, в жовтковий мішок). Ембріони гинуть на 3-тю – 8-му добу після зараження. За розтину виявляють гіперемію, крововиливи і набряки на тілі зародка, некрози в печінці, селезінці і нирках. На ХАО видимих уражень не знаходять, лише іноді виявляються незначні крововиливи.

Вірус культивують також у первинних культурах клітин нирок або фібробластів курячого ембріона. Через 2–3 доби з'являється ЦПД, яка характеризується округленням клітин й утворенням цитоплазматичних тілець-включень.

Окрім курячих ембріонів і культури клітин, вірус можна культивувати і на SPF-курчатах (вільних від патогенної мікрофлори) віком 21–25 діб.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Вірус стійкий у зовнішньому середовищі. У приміщенні пташників він залишається інфекційним до 4 міс, у кормах, воді й посліді – до 2 міс. Вірус резистентний до ефіру, хлороформу, зміни pH (2.0–11,0) і високих температур. Вірус зберігає активність при 5 °С упродовж 5 год, при 60 °С – 30 хв, а при 30 °С у сухому приміщенні – 6 міс.

Вірус резистентний до формальдегіду в регламенті дезінфекції інкубаційних яєць. У пилу, на стінах та устаткуванні неблагополучних приміщень він може зберігатися понад рік. Вірус стійкий до дії прямого сонячного опромінення. Інактивують його 0,5 %-й розчин хлораміну впродовж 10 хв, препарати йоду – за 2 хв, 1% -й формальдегід – за 3 год.

Патогенність і шляхи передачі збудника інфекції. У природних умовах до вірусу ІБХ сприйнятливі курчата будь-якого віку, однак особливо чутливі бройлери віком 3–11 тижнів і курчата віком молодше 3 тижнів, які не мають материнських антитіл.

Джерелом збудника інфекції є хворі курчата, які виділяють вірус із послідом. Зараження відбувається аліментарно через контаміновані корми

і воду. Факторами передачі вірусу є предмети догляду, обладнання, одяг обслуговуючого персоналу. Можлива передача вірусу через яйця й аерогенно. Гельмінтів і вошей вважають прямими векторами передачі збудника інфекції. Передавати вірус можуть горобці, голуби та інші дикі птахи.

У стаціонарно неблагополучних господарствах ІБХ протікає безсимптомно, з періодичним клінічним проявом серед окремих неімунних груп курчат. Характерним для ІБХ є часті випадки ускладнення хвороби різними секундарними інфекціями.

Патогенез, клінічні прояви хвороби і патологоанатомічні зміни. Провідним у патогенезі захворювання є запально-некротичні ураження фабрицієвої сумки. Вірус проникає в організм в основному через травний тракт, звідки транспортується лімфоїдними клітинами і макрофагами у фабрицієву сумку й інші лімфоїдні органи, де і відбувається його основна репродукція. Вірус у високій концентрації накопичується у фабрицієвій сумці й селезінці, а в подальшому – в мозку, крові, печінці і нирках. Провідне значення в патогенезі захворювання має руйнування імунокомпетентних клітин (лімфоцитів і макрофагів) в основних органах імунітету та імуносупресія, що розвивається на цьому фоні.

Клінічні ознаки. Інкубаційний період – 2–3 доби. ІБХ може протікати в клінічній і субклінічній формах залежно від імунного стану курчат.

Клінічна форма захворювання протікає гостро і проявляється тяжким пригніченням, пострацією, порушенням координації рухів, тремтінням голови і шиї, відмовою від корму, діареєю, що супроводжується виділенням водянистого білувато-жовтого посліду. Пір'я набуває брудно-сірий відтінок, забруднене послідом, ділянка клоаки запалена. Захворюваність і смертність швидко зростають, досягаючи максимуму на 3-тю – 4-ту добу. Тривалість хвороби не перевищує 7–10 діб, проте за ускладнень або асоціації ІБХ з іншими інфекціями зростає до 15–20 діб. Летальність коливається в широких межах – від 5 до 70 %. Перехворілі курчата відстають у рості й розвитку.

Субклінічна форма буває в курчат до 3-тижневого віку і є причиною тяжкої тривалої імуносупресії. Це призводить до зниження ефективності планових вакцинацій, схильності до інфікування умовно патогенними збудниками та ускладнень перебігу інших захворювань, що неминуче тягне за собою зниження рентабельної господарства і призводить до значних економічних втрат.

Патоморфологічні зміни. За розтину загиблих птахів основною патогномонічною ознакою є зміни органу-мішені – фабрицієвої сумки: вона

збільшена в 2–3 рази, набрякла, вишневого кольору, з численними крововиливами. У м'язах грудей, стегна і гомілки виявляють множинні геморагії. Печінка збільшена, на поверхні її проглядаються сліди від ребер. Нирки набряклі, збільшені, від світло-сірого до темно-коричневого кольору, з чітким малюнком заповнених уратами канальців і сечоводів.

У перехворілих курчат виявляють атрофію фабрицієвої сумки за рахунок деструкції фолікулів. Мікроскопічні зміни характеризуються некрозом лімфоїдних і гіперплазією ретикулоендотеліальних клітин, активізацією і проліферацією кортикомедулярного епітелію й утворенням слизу в секреторних залозах.

Лабораторна діагностика. Діагноз на інфекційну бурсальну хворобу ставиться на основі клініко-епізоотологічних даних, патоморфологічних змін і результатів лабораторних досліджень.

У лабораторію направляють клінічно хворих у початковій стадії хвороби птахів, трупи курчат або уражену фабрицієву сумку, печінку, селезінку, нирки. Для серологічного дослідження – парні сироваток крові.

Лабораторна діагностика базується на експресних, вірусологічних і ретроспективних методах. *Експрес-методи:* вірусний антиген ідентифікують у РІФ, РДП, ІЕА, вірусний геном – у ПЛР. *Вірусологічні методи.* Виділення вірусу проводять у курячих ембріонах і культурі клітин. 1) Заражають на ХАО 10–12-добові курячі ембріони, які гинуть через 3–7 діб із характерними змінами: гіперемія, крововиливи і набряки на тілі зародка, некрози в печінці, селезінці, нирках. 2) У первинній культурі клітин нирок або фібробластів курячого ембріона через 2–3 доби виявляють ЦПД: утворення симпластів і цитоплазматичних тілець-включень. 3) Іноді ставлять біопробу на 20–25-добових курчатах. Через 48–120 год у них з'являються клінічні ознаки хвороби: профузна діарея та м'язовий тремор. Ідентифікацію виділеного вірусу проводять у РІФ, РН, РДП, ІЕА або ПЛР. *Ретроспективна діагностика:* антитіла виявляють у РН, РДП, РНГА та ІЕА. За *диференціальної діагностики* необхідно виключити ньюкаслську хворобу, інфекційний бронхіт, хворобу Марека, саркому Рауса, реовірусну інфекцію, кокцидіоз, нефрозо-нефрит, гіповітаміноз Е, токсичну дистрофію та авітаміноз Д.

Імунітет та імунопрофілактика. Отримані трансоваріально материнські антитіла проти вірусу ІБХ у перші тижні життя забезпечують захист курчат від зараження польовим штамом вірусу. Рівень материнських антитіл знижується в 2–4 тижневому віці курчат, і вони стають сприятливі до інфекції.

Для імунопрофілактики ІБХ розроблені живі та інактивовані вакцини. Живі вакцини застосовують з питною водою або аерозольним методом, інактивовані – п/ш чи в/м. Нині широко використовують живі вакцини з природних авірулентних штамів вірусу ІБХ та атенуйованих штамів, отриманих серійним пасажуванням у курячих ембріонах або культурі клітин.

У схемі вакцинації проти ІБХ спочатку застосовують живі вакцини курчатам у віці 1–21 доба, а безпосередньо перед початком яйцекладки – інактивовані вакцини для формування високого, однорідного і тривалого рівня антитіл у потомства.

Імунна відповідь може бути знижена в присутності материнських антитіл, хоча вірулентні штами вірусу здатні долати гуморальний бар'єр. Імунний статус щеплених птахів необхідно періодично контролювати за допомогою ІЕА, і в разі зниження захисних титрів треба проводити ревакцинацію.

Враховуючи антигенну варіабельність циркулювальних у природі штамів вірусу і невисокий рівень перехресного імунітету, науковці здійснюють пошук таких штамів, які б мали широкий спектр антигенної активності та індукували захист від поширених варіантів збудника ІБХ. Важливим напрямом вдосконалення вакцин проти ІБХ є отримання мутантів із бажаною модифікацією антигенних детермінант VP2 як основного протективного антигену. В останні роки розробляються рекомбінантні вакцини, які експресують вірусний протеїн VP2.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Охарактеризуйте таксономію, структуру та особливості репродукції РНК-геномних вірусів родин *Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Picornaviridae, Caliciviridae, Retroviridae, Reoviridae, Birnaviridae.* **2.** Охарактеризуйте збудники вірусних інфекцій тварин, патогенез, клініко-епізоотологічні дані хвороби і патологоанатомічні зміни, методи лабораторної діагностики та засоби імунопрофілактики: 1) парагрип-3 ВРХ; 2) ньюкаслська хвороба; 3) сказ; 4) грип птахів; 5) трансмісивний гастроентерит свиней; 6) класична чума свиней; 7) ящур; 8) тешенська хвороба; 9) вірусна геморагічна хвороба кролів; 10) лейкоз ВРХ; 11) ротавірусна інфекція ВРХ; 12) інфекційна бурсальна хвороба.

ТЕМА 5.3. ПАТОГЕННІ ПРІОНИ

Патогенні пріони є збудниками повільних інфекцій людини і тварин – ***трансмісивних губчасточастоподібних енцефалопатій*** *(спонгіозні, або спонгіформні, енцефалопатії, ТГЕ).* Це особлива група нейродегенеративних захворювань, які супроводжуються характерними ураженнями ЦНС: сильно виражена вакуолізація нейронів, унаслідок чого мозкова тканина набуває вигляду губки (status spongiosus), дистрофія та випадіння нервових клітин, розростання опорної тканини мозку і формування амілоїдних бляшок.

Уперше пріонові захворювання як нову групу особливих хвороб охарактеризував у 1954 р. в Ісландії Б. Сігурдсон. У хворих на скрепі овець він відзначив вкрай тривалий інкубаційний період, неухильно прогресуючий розвиток хвороби і неминуче летальний наслідок.

У 1953 р. подібне неврологічне захворювання куру було виявлено в аборигенів о. Нова Гвінея. У 1957–1966 рр. американець К. Гайдушек провів ґрунтовне дослідження куру, звернув увагу на виняткові властивості можливого збудника і незвичайну епідеміологію захворювання. У 1976 р. К. Гайдушеку присуджено Нобелівську премію за відкриття нових механізмів походження і поширення інфекційних хвороб.

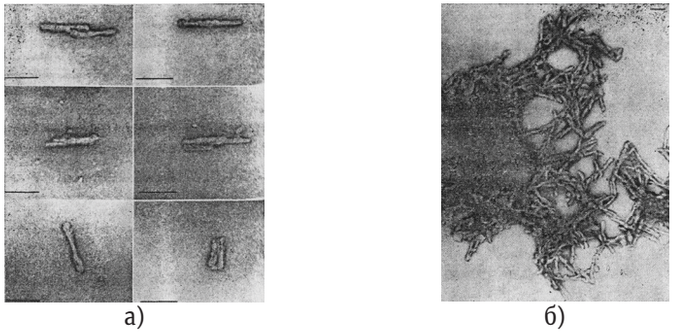
У середині 1990-х рр. в Англії виникла епізоотія губчастоподібної енцефалопатії серед ВРХ (коров'ячий сказ, хвороба скажених корів). Слідом за цим були зафіксовані випадки нового варіанту хвороби Крейтцфельдта-Якоба (нвХКЯ) серед відносно молодих людей. Потенційна небезпека поширення захворювання серед людей стимулювала інтенсивні наукові дослідження в цій галузі. У 1997 р. американець С. Прузінер отримав Нобелівську премію за серію наукових робіт під назвою «Пріони – це новий біологічний тип інфекції».

У людини відомі такі ТГЕ, як хвороба Крейтцфельдта – Якоба, синдром Герстманна – Штройсслера – Шейнкера, куру, фатальне родинне безсоння; у тварин – скрепі овець і кіз, губчастоподібна енцефалопатія ВРХ, трансмісивна енцефалопатія норок, спонгіформна енцефалопатія котячих, хронічна виснажлива хвороба оленів і лосів.

Характеристика пріонів. *Пріони* – протеїнові інфекційні частки (від англ. protein infectious particle). Це паличкоподібні структури завдовжки 100–200 нм і діаметром 10–20 нм, які складаються з глікопротеїну з мол. масою 32–40 кДа. Залежно від виду тварин довжина поліпептидного ланцюга пріона несуттєво коливається, зокрема 253 амінокислотні залишки в людини

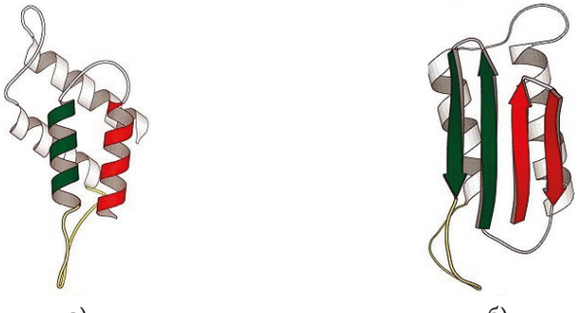
і до 265 – у ВРХ. У головному мозку хворих на ТГЕ людей і тварин виявляють скупчення пріонів – скрепіасоційовані фібрили (САФ) (рис. 5.16).

У складі пріонів не міститься нуклеїнових кислот. Де ж тоді знаходиться генетична інформація? Встановлено, що пріонний протеїн (PrP) існує у *двох ізоформах* (рис. 5.17): 1) нормальна, або клітинна, – PrPc(prion protein cellular); 2) аномальна, або патологічна, інфекційна, – PrPsc (prion protein scrapie), яка здатна утворювати САФ.



а) б)

Рис. 5.16. Пріон скрепі:
а – поодинокі пріони; б – скрепіасоційовані фібрили (САФ)
(Філдс Б. та ін., 1989)



а) б)

Рис. 5.17. Пріонний білок:
а – клітинна ізоформа (PrPc); б – інфекційна ізоформа (PrPsc)
(Конен Ф., 1996)

Ген пріона знаходиться в геномі клітин всіх ссавців, а також також курей, черепах, риб і плодових мушок дрозофіл та детермінує продукцію

нормальної ізоформи пріонного протеїну. PrPc синтезується в основному в клітинах ЦНС, а також лімфоретикулярної тканини. Вінутворюється на мембранах ендоплазматичної сітки і транспортується в секреторних везикулах на поверхню плазмолеми клітини. Під час транспортування відбувається процесинг PrPc.

PrPc має дуже важливе значення для життєдіяльності організму. Він визначає формування циркадних ритмів, регулюючи добові цикли активності та спокою в клітинах, органах і в організмі в цілому. PrPcмає значення в обміні Cu/Zn у ЦНС, нейротрансмісії, регуляції потоків Ca^{2+} через плазматичні мембрани клітин. PrPcмає вплив на антиоксидантні функції, сприяє тривалому виживанню нейронів і контролює процеси старіння.

Обидві ізоформи PrP ідентичні за вмістом і послідовністю амінокислот, а відрізняються лише за просторовою структурою молекул. Так, PrPcмає 43 % α-спіральних і 3 % β-складчастих структур, а PrPsc – відповідно 34 % і 43 %. Конверсія PrPcу PrPsc може відбуватися спонтанно, під впливом екзогенного PrPsc і за мутацій гена Pr P.

Усі ТГЕ людини і тварин є результатом посттрансляційних конформаційних змін PrPc, що лежить в основі розмноження пріонів. Допускають автокаталітичний шлях переходу PrPc у PrPsc, де PrPscвиконує роль матриці. Накопичуючись у головному мозку, PrPsc утворює структури у вигляді амілоїдних бляшок, що складаються з близько тисячі молекул PrPsc.

Механізм конверсії PrPc у PrPsc загалом виглядає так. Формується комплекс PrPc– PrPsc до якого приєднується протеїн-шаперон, який бере участь у перетворенні α-спіралей у β-складчасті структури. Утворений PrPsc у свою чергу з'єднується з наступною молекулою PrPc і перетворює її в інфекційну ізоформу. Оскільки в заражених клітинах синтез PrPc не змінюється, відбувається ланцюгова реакція, накопичується PrPsc, який спричинює дистрофічні зміни і загибель нейронів.

Стійкість до фізико-хімічних чинників. Стійкість PrPsc дуже висока. Він витримує кип'ятіння упродовж 30–60 хв, висушування – до 2 років. Інактивується лише за тиску 2 атм (120 °С) за 1 год. Стійкий до дії детергентів, іонізуючого та УФ опромінення, ультразвуку і більшості дезінфікуючих речовин у загальноприйнятих концентраціях. Обробка протеїназою К призводить до повного руйнування PrPc, тоді як у PrPsc розщеплюється лише N-кінцева частина молекули. Чутливість до протеїнкінази К є маркером за диференціації PrPcі PrPsc.

Патогенез і клінічні прояви. Патогенні пріони потрапляють в організм аліментарним або парентеральним шляхом. Однією з головних

характеристик пріонових захворювань людини і тварин є тривалий інкубаційний період. Він, очевидно, потрібен для репродукції та накопичення пріонів в первинному резервуарі інфекції – лімфоретикулярній системі (ЛРС) до того, як пріони потраплять у ЦНС. Численні дослідження вказують на репродукцію пріонів у лімфоїдних органах, що передує їхньому транспорту в ЦНС, навіть за і/ц зараження. Інфекційність при цьому акумулюється у всіх компонентах ЛРС, включаючи лімфатичні вузли і пейєрові бляшки в тонкому кишечнику, а в разі нвХКЯ – мигдалини. Інший можливий резервуар пріонів – симпатична нервова система (СНС). Ключову роль у репродукції пріонів відіграють антигенопрезентувальні фолікулярні дендритні клітини (ФДК), найбільша концентрація яких знаходиться в зародкових центрах і селезінці. В-лімфоцити безпосередньо не беруть участь у процесі нейроінвазії, але стимулюють дозрівання ФДК. Підвищена концентрація пріонів у ЛРС ініціює їхній доступ до СНС, яка іннервує лімфоїдні органи і відіграє істотну роль у транспорті пріонів у ЦНС.

PrPsc розмножується в грудному відділі спинного мозку, поширюється вздовж вісцеральних симпатичних волокон і досягає головного мозку. Концентрація його в ЦНС у 10–100 разів вища, ніж в інших органах і тканинах. При цьому не спостерігається запальної та імунологічних реакцій з боку організму. PrPsc в уражених клітинах індукує апоптоз, тобто запрограмований процес загибелі клітин. В уражених нейронах спостерігається виразна вакуолізація. Мозок помітно атрофується, набуває губкоподібної консистенції (спонгіозне переродження). За гістологічного дослідження виявляють спонгіформну дегенерацію, атрофію та загибель нейронів, розростання глії (астроцитарний гліоз), загибель волокон білої речовини (лейкоспонгіоз), амілоїдні бляшки (скупчення PrPsc).

Слід зазначити, що залишається низка питань, які важко пояснити в рамках концепції протеїнової природи пріонів. Це насамперед факт існування різних штамів пріонів і випадків, за яких розвиток клінічних симптомів ТГЕ і наявність інфекційності буває за відсутності детектованого PrPsc; деякі спадкові пріонові хвороби людини не вдалося передати лабораторним тваринам; відновлення структури PrPsc після денатурації не повертає йому патогенних властивостей.

Значний інтерес щодо походження ТГЕ становить *гіпотеза молекулярної мімікрії* англійського імунолога А. Ебрінгера (1998). Згідно з даними його досліджень, деякі ТГЕ (зокрема ГЕ ВРХ і нвХКЯ) та розсіяний склероз є автоімунними хворобами, що спричинюються сапрофітними бактеріями роду *Acinetobacter*, які населяють кишечник. Антигени цих бактерій містять

амінокислотні послідовності, що імітують епітопи деяких протеїнів тканини головного мозку, зокрема мієліну, та індукують утворення антитіл. Останні реагують із мієліном, що призводить до загибелі нервових клітин.

ТГЕ людини і тварин поділяються на *інфекційні, генетичні* та *спорадичні* захворювання. Інфекційними агентами, що спричиняють ТГЕ, є патогенні пріони екзогенного походження. Генетичні ТГЕ є наслідком мутації гена, що кодує структуру Pr P. Спорадичні ТГЕ трапляються за відсутності будь-якого контакту хворого з патогенними пріонами і мутацій у гені Pr P. Спорадичні ТГЕ вимагають подальшого ретельного дослідження в плані з'ясування етіологічних чинників.

Усі пріонові інфекції людини і тварин характеризуються наступним: 1) 100 %-ва смертність, 2) прогресуюче порушення поведінки, чутливості та координації рухів, 3) локалізація патологічних змін у ЦНС з утворенням множинних дрібних вакуолей (губчастоподібна структура), 4) тривалий інкубаційний період; 5) здатність пріонів долати видовий бар'єр і зумовлювати захворювання в інших видів.

Основні клінічні симптоми ТГЕ людини і тварин обумовлені повільно прогресуючими розладами ЦНС: порушення чутливості (гіперестезія шкіри, виражена реакція на звуки, рідше на світло), координації рухів (атаксія, спотикання, падіння) і поведінки (нервізм, агресивність, страх), а також облисіння і пігментація.

Хвороба Крейтцфельдта – Якоба (Creutzfeldt – Jakob disease) – це спорадичне захворювання, яке поширене в цілому світі та реєструється щорічно з частотою 1 випадок на 1 млн. населення. Захворюють люди віком від 30 до 70 років. Інкубаційний період триває від 18 міс до 20 років. Хвороба характеризується локомоторними розладами, прогресуючим недоумством, паралічами та абсолютною летальністю через 7–24 міс після прояву клінічних ознак. Близько 10–15 % випадків захворювання становлять родинні вогнища, що генетично детерміновано; 85–90 % випадків виникають спонтанно. І лише в 1–5 % випадків хвороба розвивається як інфекційна внаслідок приникнення в організм екзогенного PrPsc, що може відбутися за споживання м'яса і головного мозку хворої ВРХ. Певну небезпеку становлять фармацевтичні й косметичні препарати, виготовлені з тканин інфікованих тварин. Можливе спонтанне проникнення в організм PrPsc через мікротравми шкіри і слизових оболонок, а також ятрогенним шляхом (1 % випадків) – за трансплантації інфікованих органів (зокрема рогівки ока або твердої мозкової оболонки), за хірургічних операцій із використанням контамінованих інструментів або електродів,

за гормонотерапії (ін'єкції людського гормону росту, отриманого з гіпофізу померлих).

Куру (Kuru disease) – рідкісна ендемічна хвороба, яка трапляється лише серед папуасів племені форе в гірських районах Нової Гвінеї. Механізм виникнення куру пов'язаний із ритуальним канібалізмом під час погребального обряду як прояв поваги до померлих. Зараження відбувалося аліментарно, а також через пошкоджену шкіру, слизову оболонку носа, кон'юнктиву. Інкубаційний період триває 25–30 років і навіть довше. Хвороба характеризується ейфорією, прогресуючим порушенням координації рухів, паралічами і неминучою смертю через 6–24 міс. У період з 1957 по 1982 рр. від куру померли понад 2500 людей. Нині в результаті заборони ритуального канібалізму захворюваність різко знизилася, і діагностують лише поодинокі випадки куру, що дає змогу припустити повне зникнення куру в найближчий час.

Чому на земній кулі існує єдине ендемічне вогнище куру? Можливо, спорадичний випадок хвороби Крейтцфельдта – Якоба, яка поширена в цілому світі, в умовах незвичайних етнічних традицій Нової Гвінеї дав початок унікальній епідемії. Серійні пасажі мозкової тканини в людей могли призвести до зміни клінічної картини хвороби, а також вірулентності вихідного агента. Крім того, не виключається роль генетичного фактора.

Синдром Герстманна – Штройсслера – Шейнкера (Gerstmann – Sträussler – Scheinker syndrome) – рідкісна спадкова хвороба (1 випадок на 10 млн. людей). Хвороба зареєстрована в США, Швеції, Німеччині, Великій Британії, Італії, Японії та має виключно сімейний характер. Захворюють люди віком від 20 до 60 років. За клінічним проявом захворювання подібне до описаних вище куру і хвороби Крейтцфельдта – Якоба. Інкубаційний період триває 5–30 років. Далі спостерігаються прогресуюча атаксія, недоумство. Смерть настає через 4–5 років. PrPsc з'являється у цих хворих унаслідок мутації гена Pr P.

Фатальне родинне безсоння (Fatal familial insomnia) – спадкове захворювання, яке уражає членів однієї родини і супроводжується стійким порушенням сну, яке не корегується жодними снодійними препаратами. Хворіють люди від 25 до 75 років. Хвороба триває від 6–13 міс до 2–4 років і неминуче закінчується смертю.

Скрепі овець і кіз (Scrapie sheep and goats) вперше описана Англії в 1732 р. і реєструється в багатьох країнах світу. Хворіють вівці й рідко кози. Чутливість овець коливається від 5 до 78 % залежно від породи, а кози мають 100 %-ву сприйнятливість. Зараження відбувається за прямого контакту

з хворими тваринами, на пасовищах, заражених плідними водами, а також внутрішньоутробно. Існує генетична схильність до захворювання. Скрепі характеризується тривалим інкубаційним періодом (до 5 років), порушенням координації рухів, свербінням, паралічами. Тварини гинуть протягом кількох місяців із моменту прояву хвороби.

Трансмісивна енцефалопатія норок (Transmissible mink encephalopathy, ТЕН) уперше зареєстрована у США в 1947 р. Тварини заразилися після поїдання непроварених нутрощів і голів овець, інфікованих збудником скрепі. Хворі норки виділяють збудник із калом, контамінуючи ним корм. Норки можуть заразитися також за укусів і канібалізму. Інкубаційний період триває від 5 міс до року. Клінічні ознаки ТЕН дуже подібні до скрепі: сильна збудливість, порушення координації рухів, самопогризання і неминуча загибель через кілька тижнів. Обов'язковим профілактичним заходом за ТЕН є ретельне проварювання субпродуктів овець у разі згодовування норкам.

У 1978 р. у США в стадах оленів і лосів спостерігали захворювання, подібне до скрепі, – *хронічна виснажлива хвороба*. Ймовірно, тварини заразилися на пасовищах, контамінованих збудником скрепі.

Губчастоподібна енцефалопатія ВРХ (Bovine spongiform encephalopathy, хвороба скажених корів, ГЕ ВРХ) зареєстрована вперше в 1986 р. у Великій Британії, де набула епізоотичного поширення. До кінця 1997 р. 60 % молочних і 16 % м'ясних стад виявилися неблагополучними, а до грудня 2000 р. було утилізовано близько 179 тис. корів. Поодинокі випадки захворювання зареєстровані в 15 країнах світу. ГЕ ВРХ визнана як особливо небезпечна інфекція. Виникнення хвороби пов'язують із використанням у раціоні ВРХ м'ясокісткового борошна, виготовленого з туш хворих на скрепі овець. Інкубаційний період за ГЕ ВРХ триває від 2,5 до 8 років. Клінічні ознаки дуже подібні до інших ТГЕ: локомоторні порушення, боязливість, агресивність, гіперестезія, неадекватна реакція на звук і загибель упродовж 4 міс.

ГЕ описана в різних видів антилоп та оленів, які утримувалися в зоопарках і не контактували з великою й дрібною рогатою худобою. У раціон їм теж додавали м'ясо-кісткове борошно.

Збудник ГЕ ВРХ здатний проходити видовий бар'єр. Описані випадки *спонгіформної енцефалопатії котячих* у домашніх і диких котів, пум, гепардів, оцелотів, тигрів та левів після вживання консервів або сирого м'яса хворої ВРХ.

Лабораторна діагностика. Пріонові інфекції діагностують на основі клініко-епізоотологічних даних і результатів лабораторних досліджень.

Зажиттєві методи лабораторної діагности поки що не розроблені у зв'язку з низкою обставин. Зокрема, в організмі хворих тварин не виявляються специфічні антитіла, збудник локалізується переважно у головному і спинному мозку і не виділяється з сечею, молоком, калом та іншими секретами й екскретами. Біопроба практичного значення не має у зв'язку з надзвичайно тривалим інкубаційним періодом.

Посмертна діагностика пріонових інфекцій основана на виявленні PrPsc або обумовлених ним патологічних змін у головному мозку. З *методів посмертної діагностики* використовують гістопатологічний, електронно-мікроскопічний метод виявлення САФ, гістохімічний метод ІЕА, метод твердофазного ІЕА та імуноблотинг.

Найчастіше використовують адаптований до практичних лабораторій *гістопатологічний метод.* Для дослідження відбирають стовбурову частину головного мозку (довгастий і середній мозок). За гістологічного аналізу зрізів виявляються дистрофічні зміни нейронів (вакуолізація цитоплазми).

Інколи виявити специфічні гістопатологічні зміни в мозку тварин, що загинули від пріонової інфекції, неможливо. Це буває, зокрема, в разі автолізу мозкової тканини після її проморожування. У такій ситуації можна скористатися одним з імунологічних методів, зокрема *ІЕА* в різних модифікаціях.

Оскільки в організмі хворих не виробляються пріон-специфічні антитіла, то діагностичні системи, що нині конструюються, основані на імунохімічному виявленні PrPsc. Для цього застосовують імунопероксидазні кон'югати полі- або моноклональних антитіл. PrPsc виявляють безпосередньо в гістозрізах головного мозку або екстрактах його гомогенатів *(гістохімічний метод ІЕА).*

Чутливим виявився *метод імуноблотингу* із застосуванням названих вище реагентів. Для аналізу за цим методом достатньо 20–100 мг зразка матеріалу. Високочутливими виявилися також модифікації на основі класичного *твердофазного ІЕА* з колориметричним, люмінесцентним або хемілюмінесцентним варіантами виявлення продукту ензимної реакції.

Нині розроблені набори для діагностики пріонових інфекцій на основі ІЕА. У країнах ЄС впроваджено в широку практику імуноензимні набори «Prionics-Check» (Prionics AG, Швейцарія), «Enfer BSE Testing Sistem» (Ірландія), «Platelia BSE» (Франція) і набір на основі технології DELFIA (Велика Британія). У разі використання зазначених тест-систем застосовується методика диференціювання PrPsc від PrPc, яка основана на нечутливості PrPsc до протеолітичних ферментів (досліджуваний матеріал

попередньо обробляється протеїназою К). Висока чутливість запропонованих діагностичних систем поєднується з відповідною експресністю – кінцевий результат отримується впродовж 4–24 год залежно від використаної тест-системи. Найбільш оперативною в цьому відношенні виявилася французька тест-система.

Удосконалення діагностики пріонових інфекцій зорієнтовано на розробку надчутливих імунологічних тестів, зокрема на базі капілярного імуноелектрофорезу із використанням флуоресцентного лазерного детектора, методу поляризаційної імунофлуоресценції та ін. Розробка зажиттєвих діагностичних методів дасть змогу діагностувати пріонові інфекції ще в інкубаційному періоді, до того, як збудник проникне у ЦНС та обумовить тяжкий патологічний процес. Зажиттєва діагностика суттєво поліпшить контроль за пріоновими інфекціями людини і тварин та відкриє реальні перспективи для повної ліквідації їх.

Диференціальна діагностика. Пріонові інфекції треба диференціювати від хвороб, що супроводжуються ураженням ЦНС:

- скрепі овець і кіз – від вісна – меді, лістеріозу, сказу, хвороби Ауєскі, отруєнь різноманітними речовинами, а за наявності сверблячки – від трихофітії, стрептотріхозу, демодекозу, чесотки;
- губчастоподібну енцефалопатію ВРХ – від сказу, лістеріозу, хвороби Ауєскі, різноманітних отруєнь ендогенного й екзогенного походження;
- трансмісивну енцефалопатію норок – від алеутської хвороби і сказу.

Профілактика. Специфічні засоби профілактики пріонових інфекцій не розроблені, а здійснюються лише загальні протиепідемічні та протиепізоотичні заходи. Профілактичні заходи щодо пріонових інфекцій координують відповідні міжнародні організації. З 1994 р. у країнах ЄС забороняється згодовувати жуйним тваринам м'ясокісткове борошно, отримане з матеріалів від жуйних тварин. Науковий ветеринарний комітет ЄС рекомендував всі протеїнові відходи жуйних обробляти за температури 133 °С і тиску 3 бар упродовж 20 хв.

В Україні заходи щодо профілактики пріонових інфекцій реалізуються згідно з Методичними рекомендаціями Державного департаменту ветеринарної медицини МАП України (1999 р.). Зокрема, прикордонна ветеринарна служба не повинна допускати на територію України туші жуйних, тварин, у яких не вилучені головний і спинний мозок, очі, селезінка, тимус, мигдалики. Забороняється імпорт м'ясокісткового і кісткового борошна та кормових добавок, що їх містять, а також м'ясні продукти, тварин, ембріони, спермопродукцію та інше з країн, неблагополучних щодо ГЕ ВРХ.

У системі профілактики ГЕ ВРХ в Україні особливе значення надається діагностиці. Запроваджені в практику методи спрямовані на виявлення PrPsc (пріон-тести, імуногістохімія) і характерних губчастоподібних змін у головному мозку (гістологія). Обов'язковому лабораторному дослідженню піддають довгастий мозок від тварин групи ризику і підозрілих у захворюванні на ГЕ ВРХ. До групи ризику належать трупи тварин старше 24-місячного віку, в яких перед смертю чи забоєм реєстрували симптоми ураження ЦНС; трупи і вимушено забиті тварини старше 24-місячного віку; імпортовані тварини незалежно від того, з якої країни вони завезені (з незначними контрольованим чи невизначеним ризиком), та приплід від імпортованих тварин у разі їхнього забою або загибелі у віці старше 24 міс.

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Охарактеризуйте природу, структуру і механізм репродукції пріонів. **2.** Які ви знаєте пріонові інфекції людини і тварин? **3.** Опишіть патогенез і клінічні прояви пріонових інфекцій: 1) хвороба Крейтцфельдта – Якоба; 2) куру; 3) синдром Герстманна – Штройсслера – Шейнкера; 4) фатальне родинне безсоння; 5) скрепі овець і кіз; 6) трансмісивна енцефалопатія норок; 7) губчастоподібна енцефалопатія ВРХ. **4.** Охарактеризуйте методи лабораторної діагностики пріонових інфекцій тварин.

ТЕМА 5.4. КЛІНІЧНІ ПРОЯВИ ВІРУСНИХ І ПРІОНОВИХ ІНФЕКЦІЙ ТВАРИН

Рис. 5.18. Ящур
(http://www.thecattlesite.com/articles/1093/clinical-signs-of-foot-and-mouth-disease/)

Рис. 5.19. Нодулярний дерматит

(http://roganska.gromada.org.ua/news/1557330779/)

Рис. 5.20. Інфекційний ринотрахеїт ВРХ

(https://present5.com/osnovy-veterinarii-infekcionnye-bolezni-krs-i-svinej/)

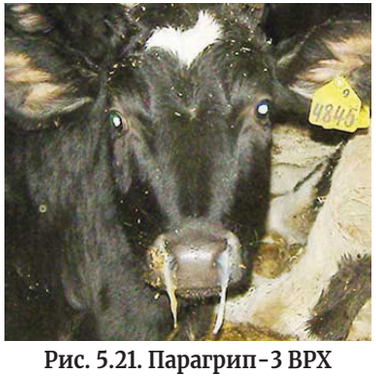


Рис. 5.21. Парагрип-3 ВРХ

(https://www.omedvet.ru/about-animals/cattle-ca/cows/diseases-of-cattle/paragripp-krupnogo-rogatogo-skota.html)

Рис. 5.22. Лейкоз ВРХ

(https://en.ppt-online.org/242629)

Рис. 5.23. Ринопневмонія коней

(https://loshadi.info/bolezni/rinopnevmoniya-loshadej)

Рис. 5.24. Хвороба Ауєскі

(https://fermer.blog/bok/zhivotnye/svini/bolezni-sviney/3725-bolezn-aueski-u-sviney-opisanie-bolezni-i-)ee-lechenie.html)

Рис. 5.25. Тешенська хвороба

(https://vettorg.info/spravochnik-boleznej/jenzooticheskij-jencefalomielit-svinej-bolezn-teshena-)

Рис. 5.26. Класична чума свиней

(http://marphavet.com/en/news/Disease-Treatment/Classical-swine-Fever-Hog-Cholera-76/)

Рис. 5.27. Африканська чума свиней

(https://agronomam.com/zhivotnovodstvo/svini/zabolevaniya-01/afrikanskaya-chuma-u-svinej.html)

Рис. 5.28. Сказ

(https://artemida33.ru/stati/sovety-specialistov/beshenstvo-opasno-dlya-cheloveka/)

Рис. 5.29. Алеутська хвороба норок

(https://allvetdrugs.ru/bolezni/aleutskaya-bolezn-norok/)

Рис. 5.30. Міксоматоз кролів

(https://agrarii.com/miksomatoz-u-krolikov/)

Рис. 5.31. Вірусна геморагічна хвороба кролів

(https://www.omedvet.ru/about-animals/rabbits/diseases-rabbits/vgbk.html)

Рис. 5.32. Хвороба Марека

(http://www.pocketfarm.co.uk/poultry-health-mareks-disease/)

Рис. 5.33. Інфекційна бурсальна хвороба

(http://atmagro.ru/2016/10/10/bolezn-gamboro-u-kur-bursalnaya-bolezn/)

Рис. 5.34. Грип курей

(http://www.fao.org/3/a0632mk/a0632mk.pdf)

Рис. 5.35. Ньюкаслська хвороба

(https://vetmarket.ltd/info/disease/khvoroba_nyukasla/)

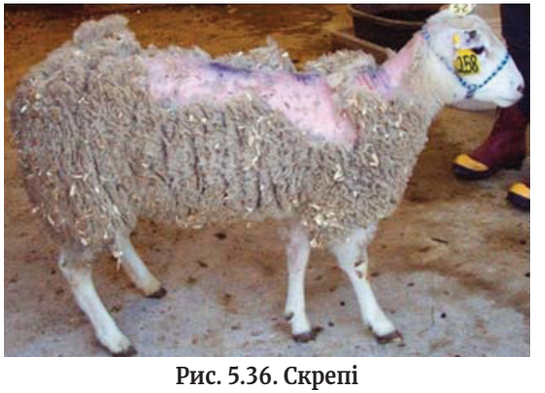


Рис. 5.36. Скрепі

(https://fermer.ru/forum/veterinariya-ovets/66911)

Рис. 5.37. Губчастоподібна енцефалопатія ВРХ
(https://allvetdrugs.ru/bolezni/gubchataya-entsefalopatiya/)

Питання для обговорення та самоперевірки

1. Опишіть клінічні прояви вірусних інфекцій тварин, зображених на рисунках: 1) ящур; 2) нодулярний дерматит; 3) інфекційний ринотрахеїт ВРХ; 4) парагрип-3 ВРХ; 5) лейкоз ВРХ; 6) ринопневмонія коней; 7) хвороба Ауєскі; 8) тешенська хвороба; 9) класична чума свиней; 10) африканська чума свиней; 11) сказ; 12) алеутська хвороба норок; 13) міксоматоз кролів; 14) вірусна геморагічна хвороба кролів; 15) грип курей; 16) ньюкаслська хвороба; 17) хвороба Марека; 18) інфекційна бурсальна хвороба. **2.** Опишіть клінічні прояви пріонових інфекцій тварин, зображених на рисунках: 1) скрепі; 2) губчастоподібна енцефалопатія ВРХ.

Висновки

1. Основне завдання спеціальної вірусології – вивчення етіології та методів лабораторної діагностики вірусних інфекцій тварин із метою встановлення діагнозу і застосування відповідних засобів імунопрофілактики.

2. Діагноз на вірусні інфекції тварин ставиться комплексно, із врахуванням клініко-епізоотологічних даних, патологоанатомічних змін та головне –результатів лабораторного дослідження патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин.

3. Лабораторна діагностика вірусних інфекцій тварин ґрунтується на трьох групах методів, а саме: 1) експрес-методи – виявлення безпосередньо в патологічному матеріалі вірусних антигенів у серологічних реакціях та вірусних геномів методом ДНК-зондів і у ПЛР; іноді використовують ЕМ

та ІЕМ; 2) вірусологічні методи – виділення вірусів із патологічного матеріалу шляхом зараження чутливих біологічних об'єктів (лабораторних тварин, курячих ембріонів, культур клітин) із наступною серологічною ідентифікацію ізолятів; 3) серологічні (ретроспективні) методи – дослідження парних сироваток крові перехворілих тварин на зростання титру антитіл у серологічних реакціях.

4. Диференціальна діагностика вірусних інфекцій тварин, подібних за клініко-епізоотологічними даними і патологоанатомічними змінами, проводиться на основі результатів вірусологічного дослідження патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин та серологічної (ретроспективної) діагностики.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Белоусова Р.В. Ветеринарная вирусология : Учебник для вузов / Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская, И.В. Третьякова ; Под ред. проф. Р.В. Белоусовой. – М. : КолосС, 2007. – 424 с. : ил. – ISBN 978-5-9532-0416.
2. Бизунок Н.А. Противовирусные средства : учеб.-метод. пособие / Н.А. Бизунок, А.В. Гайдук. – Минск : БГМУ, 2016. – 52 с. – ISBN 978-985-567-556-4.
3. Вирусология: учебник / А.В. Пиневич, А.К. Сироткин, А.В. Гаврилова, А.А. Потехин. – СПб : Изд-во С.-Петерб. ун-та, 2012. – 432 с. – ISBN 978-5-288-05328-3.
4. Гудзь С.П. Вірусологія: підручник: [для студ. закл. вищ. осв.] / С.П. Гудзь, Т.Б. Перетятко, А.А. Галушка. – Львів : ЛНУ імені Івана Франка, 2018. – 526 с. – (Серія «Біологічні Студії»). – ISBN 978-966-613-752-7 (серія), ISBN 978-617-10-0472-6.
5. Емерджентні і ре-емерджентні вірусні інфекції: глобальна проблема XXI століття / Л.О. Панченко, С.І. Васіна, І.Н. Звягольська [та ін.]. – Інфекційні хвороби, 2015. – 4(82). – С. 59–66.
6. Інфекціологія вірозів тварин : Навчальний посібник / В.Г. Скибіцький, С.Г. Ташута, Г.В. Козловська, О.С. Калініна. – К. : «ФОП Нагорна І.Л.», 2014. – 378 с. – ISBN 978-617-7014-00-2.
7. Калініна О.С. Ветеринарна вірусологія: Підручник / О.С. Калініна, І.І. Панікар, В.Г. Скибіцький. – К. : Вища освіта, 2004. – 432 с. : іл. – ISBN 966-8081-26-9.
8. Калініна О.С. Ветеринарна вірусологія: Підручник. 2-ге вид., перероб. і доп. / О.С. Калініна, І.І. Панікар, В.Г. Скибіцький. – К. : Нічлава, 2015. – 262 с. – ISBN 966-8081-26-9.
9. Медична мікробіологія, вірусологія та імунологія: підручник для студ. вищ. мед. навч. заклад. / За ред. В.П. Широкобокова / Видання 2-ге. – Вінниця : Нова книга, 2011. – 952 с. : іл. – ISBN 978-966-382-325-6.
10. Методичні вказівки «Санітарно-вірусологічний контроль водних об'єктів» Затверджено наказом Міністерства охорони здоров'я України 30.05.2007 № 284. 33 с. Електронний ресурс http://mozdocs.kiev.ua/view.php?id=7022.
11. Посібник з медичної вірусології / В.М. Гирін, В.Г. Порохницький, С.Г. Вороненко [та ін.] ; За ред. В.М. Гиріна. – К. : Здоров'я, 1995. – 368 с. – ISBN 5-311-00855-5.
12. Практикум з ветеринарної вірусології: Навчальний посібник / В.Г. Скибіцький, І.І. Панікар, О.А. Ткаченко [та ін.] – К. : Вища освіта, 2005. – 208 с. : – ISBN 966-8081-47-1.
13. Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / Под ред. академика РАН Д. К. Львова. – М. : ООО «Издательство «Медицинское информационное агентство», 2013. – 1200 с. : ил. – ISBN 978-5-9986-0145-3.

14. Санитарная микробиология и вирусология: учебное пособие для вузов / З.Н. Кочемасова, С.А. Ефремова, А.М. Рыбакова. – М. : Альянс, 2016. – 352 с. – ISBN 978-5-00106-042-0.
15. Сергеев В.А. Вирусы и вирусные вакцины / В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер. – М. : Библионика, 2007. – 524 с. – ISBN 5-98685-012-2.
16. Скибіцький В.Г. Ротавірусна інфекція великої рогатої худоби: Навчальний посібник –К. : Урожай, 1994. – 165 с. ISBN 5-337-01540-0.
17. Скибіцький В.Г. Спеціальна ветеринарна вірусологія: Навчальний посібник / В.Г. Скибіцький, О.С. Калініна, Г.В. Козловська. – К. : ЦП Компринт, 2017. – 451 с. – ISBN 978-966-929-617-7.
18. Скибіцький В.Г., Козловська Г.В. Реовірусні інфекції тварин: Навчальний посібник –К.: ЦП Компринт, 2016. – 225 с. – ISBN 978-966-929-2.
19. Скроцька О.І. Віруси у продуктах харчування / О.І. Скроцька, І.М. Волошина, Т.С. Кістенюк // Харчова промисловість, 2014. – № 16. – С. 56–60.
20. Virus Taxonomy: 2019 Release International Committee on Taxonomy of Viruses [Electronic resourse]. – Mode of access: https://talk.ictvonline.org/taxonomy.

ПРЕДМЕТНИЙ ПОКАЖЧИК

IgG 127
IgA 127
IgM 127
Абортивна інфекція 96
Автономна інфекція 94
Актин 48
Антиген 122
Антигенний дрейф 83
Антигенний шифт 117
Антитіло 127
Антропоноз 109
Варіант 81
Віріон 23, 37
Віроїд 27
Вірус саркоми Рауса 19, 122, 197
Віруси 23
Вірусна інфекція 94
Вірусна популяція 80
Вірусні вакцини 139
Вірусні ДНК 34
Вірусні РНК 34
Вірусоскопія 158
Вогнищева інфекція 104
Г. Цур Гаузен 22
Генералізована інфекція 104
Генетична реактивація 87
Гостра інфекція 104
Д.Й. Івановський 18
Депротеїнізація 62
Дефектні віруси 26
Диз'юнктивна репродукція 58
ДНК-геномні віруси 25
ДНК-полімераза 68
$ЕД_{50}$ 202
Екологія вірусів 107
Електронна мікроскопія 160
Зворотна транскриптаза 65
Зворотна транскрипція 65
Зооантропоноз 109
Зооноз 109
Ікосаедральний тип симетрії 38
Імунітет 119
Імунна система 122
Імуноелектронна мікроскопія 163
Імунопатологічні реакції 133
Інапарантна інфекція 104
Інгібітори 129
Інтеграційна інфекція 95
Інтерференція 88
Інтерферони 131
Капсидні протеїни 44
Капсомер 37
Клітинні протеази 63
Клон 81
Комплемент 130
Комплементація 88
Культура клітин 13, 20, 188, 202, 345
Латентна інфекція 105
Літична інфекція 97
М. Бейерінк 19
Метод ДНК-зондів 166
Метод культури клітин 20
Методи зараження курячих ембріонів 178
Механізм передавання збудника 110
Мутант 81
Мутації 82
Неструктурні вірусні протеїни 46

Нуклеоїд 38
Онкогенні віруси 18, 22
П. Берг 21
Пепломери 37
Пеплос 37
Плазміда 27
Повільна інфекція 106
Полімераза 58
Полімеразна ланцюгова реакція 167
Потік генів 86
Прикріплювальні протеїни 60
Пріони 27, 28, 30, 116, 392
Провірус 35
Продуктивна інфекція 96
Противірусні препарати 144
Процес самоскладання 74
Р. Галло 22
Р. Дульбекко 22
Реакція затримки гемаглютинації 213
Реакція нейтралізації 211
Реверсія 84
Резервуар збудника інфекції 110
Рекомбінації 85
Репліказа 68
Репродукція вірусів 58
РНК-геномні ретровіруси 26
Серотип 81
Спіральний тип симетрії 38
Структурні протеїни 44
Суперкапсид 37
Суперкапсидні протеїни 45
Типи будови капсидів 38
Тільця-включення 98
Тропізм 102
Ф. Бернет 23, 28
Ф. д'Ерелль 19
Фактор передавання збудника 110
Фенотипове змішуванн 88
Хронічна інфекція 97
Цитопатичний ефект 97
Цитопатогенна дія вірусу 97
Штам 81

НОТАТКИ

НОТАТКИ

Навчальне видання

Скибіцький Володимир Гурійович
Калініна Ольга Сергіївна
Козловська Ганна Володимирівна

ВЕТЕРИНАРНО-САНІТАРНА ВІРУСОЛОГІЯ

Підручник

Верстка — І. Стратій

Підписано до друку 21.07.2020 р. Формат 60х90/16.
Папір офсетний. Гарнітура Merriweather. Цифровий друк.
Ум. друк. арк. 24,18. Наклад 300. Замовлення № 0311-204.
Ціна договірна. Віддруковано з готового оригінал-макета.

Видавництво та друк: «ОЛДІ-ПЛЮС»
вул. Паровозна, 46-А, м. Херсон, 73034
Свідоцтво ДК № 6532 від 13.12.2018 р.

Тел.: +38 (0552) 399-580, +38 (098) 559-45-45,
+38 (095) 559-45-45, +38 (093) 559-45-45
Для листування: а/с 20, м. Херсон, Україна, 73021
E-mail: office@oldiplus.ua