

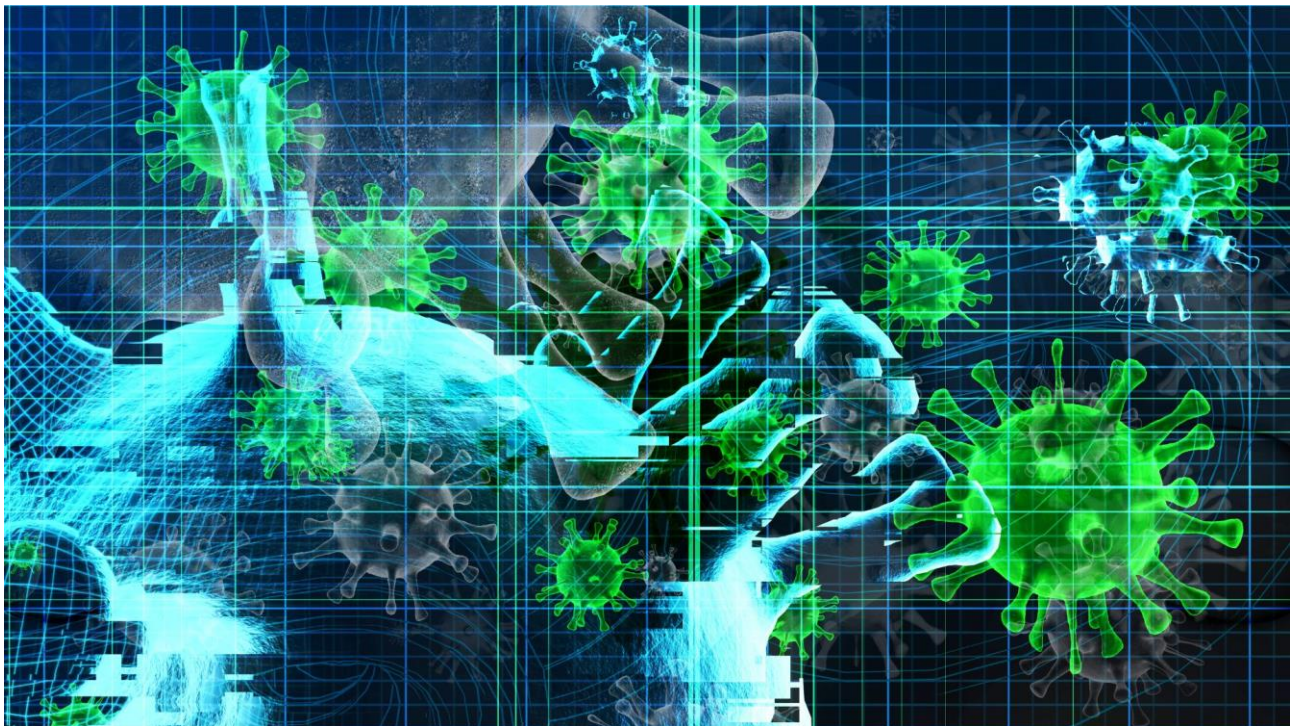
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

*Львівський національний університет ветеринарної медицини та
біотехнологій імені С. З. Гжицького*

Кафедра біотехнології та радіології

ВИКОРИСТАННЯ ВІРУСІВ У БІОТЕХНОЛОГІЧНИХ ВИРОБНИЦТВАХ

**Методичні вказівки до практичних робіт для здобувачів
першого (бакалаврського) рівня вищої освіти
спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія
ОП «Біотехнології та біоінженерія»**



Використання вірусів у біотехнологічних виробництвах: методичні вказівки до практичних робіт для здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 162 Біотехнології та біоінженерія ОП «Біотехнології та біоінженерія» / [уклад. Малишева Х. В.] Львів: Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, 2025. 91 с.

Рецензент — Ольга Яремко, доцент кафедри мікробіології та вірусології, Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С. З. Гжицького, к.с.-г.н.

Рекомендовано навчально-методичною радою факультету харчових технологій та біотехнології, протокол №25 від 3.03.2025 р.

ЗМІСТ

ВСТУП	6
ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ТА ЗАХИСТУ ПРАКТИЧНОЇ РОБОТИ	8
ПРАКТИКУМ	9
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №1. Організація вірусологічних лабораторій	9
Теоретичні відомості	9
Практична частина.....	11
Контрольні запитання.....	12
ЧАСТИНА 1. МЕТОДИ КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ	13
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №2. Використання лабораторних тварин у вірусологічних дослідженнях.....	14
Теоретичні відомості	14
Практична частина.....	16
Контрольні запитання.....	18
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №3. Використання курячих ембріонів у вірусологічних дослідженнях.....	18
Теоретичні відомості	18
Практична частина.....	21
Контрольні запитання.....	23
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №4. Використання клітинних культур у вірусологічних дослідженнях.....	23
Теоретичні відомості	24
Практична частина.....	28
Контрольні запитання.....	30
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №5. Способи зберігання і транспортування вірусів.....	31
Теоретичні відомості	31
Практична частина.....	33
Контрольні запитання.....	35
ЧАСТИНА 2. МЕТОДИ ІНДИКАЦІЇ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСІВ	36
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №6. Огляд основних методів індикації та ідентифікації вірусів..	36
Теоретичні відомості	37
Практична частина.....	41
Контрольні запитання.....	42
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №7. Використання електронної мікроскопії у вірусологічних дослідженнях.....	43
Теоретичні відомості	43
Практична частина.....	46

Контрольні запитання.....	48
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №8. Використання реакції імунофлуоресценції у вірусологічних дослідженнях.....	48
Теоретичні відомості	48
Практична частина.....	51
Контрольні запитання.....	52
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №9. Використання методів ампліфікації нуклеїнових кислот у вірусологічних дослідженнях.....	53
Теоретичні відомості	53
Практична частина.....	55
Контрольні запитання.....	57
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №10. Кількісне визначення вірусів	57
Теоретичні відомості	58
Практична частина.....	60
Контрольні запитання.....	61
ЧАСТИНА 3. ОТРИМАННЯ ВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ	62
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №11. Культивування, титрування і препаративне отримання бактеріофагів.....	62
Теоретичні відомості	62
Практична частина.....	64
Контрольні запитання.....	66
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №12. Виділення, очистка та концентрування вірусів рослин	66
Теоретичні відомості	67
Практична частина.....	70
Контрольні запитання.....	71
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №13. Лабораторні техніки та методики, що використовуються для вивчення вірусів на молекулярному рівні	72
Теоретичні відомості	72
Практична частина.....	75
Контрольні запитання.....	76
ЧАСТИНА 4. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ НА ОСНОВІ ВІРУСІВ.....	77
ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №14. Технологія фагового дисплею	77
Теоретичні відомості	78
Практична частина.....	79
Контрольні запитання.....	81
ЧАСТИНА 4. БІОБЕЗПЕКА І БІОТЕРОРИЗМ.....	81

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №15. Визначення біоризиків і біозагроз при роботі з вірусологічними об'єктами.....	82
Теоретичні відомості	82
Практична частина.....	85
Контрольні запитання.....	87
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ	87
РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА.....	88
ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ.....	90

ВСТУП

Навчальна дисципліна «Використання вірусів у біотехнологічних виробництвах» є фундаментальною складовою фахової підготовки здобувачів першого (бакалаврського) рівня вищої освіти спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія» за освітньою програмою «Біотехнології та біоінженерія». Її метою є формування теоретичних знань і практичних навичок, необхідних для безпечної роботи з вірусами в біотехнологічній та дослідницькій діяльності, а також для ефективного застосування вірусів у медичних, фармацевтичних, сільськогосподарських та промислових біотехнологіях.

Дисципліна охоплює широкий спектр тем, які розкривають роль вірусів як інструментів і об'єктів біотехнологічного виробництва. Особлива увага приділяється принципам організації вірусологічних лабораторій, методам культивування та зберігання вірусів, індикації та ідентифікації вірусних агентів, отриманню вірусних препаратів, а також питанням біобезпеки та біоетики. Значне місце займає вивчення сучасних молекулярних та біоінформатичних методів дослідження вірусів, включаючи технології ампліфікації нуклеїнових кислот, імунофлуоресценції, електронної мікроскопії, фагового дисплею та *in silico*-аналізу.

Завдання дисципліни включають:

- формування базових знань з організації роботи вірусологічних лабораторій різного рівня біологічної безпеки;
- ознайомлення з методами культивування вірусів у курячих ембріонах, клітинних культурах і на лабораторних тваринах;
- вивчення способів транспортування, зберігання та обліку вірусів і вірусних ізолятів;
- опанування методів індикації та ідентифікації вірусів (цитопатична дія, гемадсорбція, імуноферментний аналіз, ПЛР, електронна мікроскопія, імунофлуоресценція);
- набуття практичних навичок визначення вірусного титру, обробки зображень вірусів та аналізу вірусної реплікації;
- засвоєння сучасних підходів до отримання вірусних препаратів, зокрема бактеріофагів і вірусів рослин, їх очистки, концентрування та дослідження генетичних змін;
- розуміння принципів біобезпеки та біозахисту, оцінки біоризиків та розробки дій у випадку біоінцидентів.

У результаті вивчення дисципліни здобувачі вищої освіти повинні вміти:

- орієнтуватися в класифікації вірусів за ступенем патогенності, знати принципи роботи лабораторій BSL-1–BSL-4;
- використовувати віруси для моделювання інфекційного процесу в лабораторних системах;
- працювати з клітинними культурами, курячими ембріонами, лабораторними тваринами для культивування вірусів;
- аналізувати результати методів ідентифікації вірусів і обирати найдоцільніші з них залежно від ситуації;
- проводити кількісне визначення вірусів та обробку отриманих даних за допомогою сучасних цифрових та біоінформатичних інструментів;

- використовувати методи фагового дисплею для селекції білкових молекул, зокрема антитіл;
- дотримуватись вимог біоетики та біобезпеки при роботі з вірусними агентами.

Ці методичні вказівки укладено з метою забезпечення практичного засвоєння матеріалу дисципліни. Кожне практичне заняття містить теоретичний огляд, покроковий план виконання, інструкції з використання обладнання та програмного забезпечення, а також рекомендації щодо аналізу результатів. У практичних роботах здобувачі зможуть опанувати техніки інфікування, методи збирання і збереження вірусного матеріалу, електронномікроскопічного й флуоресцентного аналізу, ампліфікації нуклеїнових кислот, а також моделювання біотехнологічних процесів за участі вірусів.

Вивчення дисципліни «Використання вірусів у біотехнологічних виробництвах» сприятиме формуванню професійних компетентностей, необхідних для роботи у вірусологічних та біотехнологічних лабораторіях, науково-дослідних центрах, установах охорони здоров'я, а також для участі в розробці сучасних вірусних препаратів, діагностичних систем і вакцин.

ВИМОГИ ДО ОФОРМЛЕННЯ ТА ЗАХИСТУ ПРАКТИЧНОЇ РОБОТИ

Всі лабораторні роботи практикуму з дисципліни «Використання вірусів у біотехнологічних виробництвах» оформлюються в окремому робочому зошиті, який ведеться здобувачем освіти протягом всього семестру. Зошит є обов'язковим для ведення обліку виконаних завдань і здається викладачеві на перевірку після кожного заняття.

Підготовка до лабораторної роботи. Перед виконанням кожної лабораторної роботи здобувач зобов'язаний:

- опрацювати теоретичну частину, що стосується теми заняття (організація вірусологічної лабораторії, культивування вірусів у тваринах, ембріонах, клітинах; методи індикації, ідентифікації, ампліфікації; фаговий дисплей, електронна мікроскопія, тощо);
- ознайомитися з методикою роботи, вимогами до техніки безпеки, біобезпеки та біоетики.

Перед початком лабораторного заняття здобувач повинен:

✓ **Представити план роботи**, у якому чітко виділено всі етапи досліджу (наприклад, інфікування курячого ембріона, підготовка клітинної культури, підрахунок бляшок, підготовка до електронної мікроскопії), відповідно до інструкції, і записати його в робочому журналі;

✓ **Обґрунтувати всі розрахунки**, які стосуються: підготовки вірусного матеріалу до інокуляції; вибору об'ємів поживних середовищ; приготування розведень для визначення вірусного титру; підготовки проб до ПЛР або вестерн-блоту;

✓ **Пояснити хімізм або біологічну суть процесів**, що лежать в основі: вірусної реплікації у системах *in vivo* та *in vitro*; взаємодії вірусу з клітиною; імунофлюоресцентної мітки; принципу ПЛР, NEAR, LAMP, CRISPR; утворення вірусних бляшок; очищення бактеріофагів чи вірусів рослин; використання фагового дисплею тощо.

Вимоги до оформлення звіту. У звіті мають бути відображені: назва теми, дата, ПІБ здобувача; мета роботи; теоретичні основи; матеріали та методи (використане обладнання, проби, програмне забезпечення); хід роботи (поетапно, включаючи особливості роботи з вірусами, етапи зараження, індикації, аналізу); проміжні та кінцеві результати (наприклад, визначений вірусний титр, виявлені цитопатичні ефекти, отримані зображення за допомогою ImageJ або ПЛР-аналізи); аналіз результатів із посиланням на літературні джерела або нормативні документи (особливо у темах з біобезпеки); висновки; список використаної літератури.

Захист практичної роботи. Під час захисту практичної роботи здобувач повинен: стисло та чітко викласти суть методу та експерименту; представити отримані результати та їхній аналіз; обґрунтувати вибір методу (наприклад, чому обрано саме ПЛР або флуоресценцію для ідентифікації вірусу); надати вичерпні відповіді на запитання викладача щодо етапів роботи, ризиків, дотримання біозахисту, особливостей біоетики; за необхідності — продемонструвати результати аналізу з використанням програмного забезпечення (ImageJ, BioEdit, Venny, тощо).

ПРАКТИКУМ

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №1. Організація вірусологічних лабораторій

Мета: ознайомитися з основами організації вірусологічних лабораторій різного рівня біологічної безпеки, їхньою структурою, функціональними завданнями та матеріально-технічним забезпеченням; сформулювати розуміння класифікації вірусів за ступенем біологічної небезпеки та відповідності цій класифікації лабораторних рівнів (BSL-1–BSL-4); забезпечити практичне засвоєння правил роботи у базових вірусологічних лабораторіях, ознайомитися з особливостями функціонування лабораторій особливого режиму, а також навчитися основам управління біологічними відходами, дезінфекції, стерилізації й запобігання інфікуванню персоналу.

Теоретичні відомості

1. Класифікація вірусів за ступенем біологічної небезпеки.
2. Типи вірусологічних лабораторій.
3. Принципи організації та завдання вірусологічних лабораторій.
4. Обладнання вірусологічних лабораторій.
5. Дезінфекція та стерилізація у вірусологічних лабораторіях.
6. Джерела, причини та шляхи зараження персоналу вірусологічних лабораторій.

Класифікація вірусів за ступенем біологічної небезпеки

Залежно від здатності вірусів викликати інфекційні захворювання, їх поділяють на чотири групи патогенності (ризик), відповідно до класифікацій ВООЗ, CDC та законодавства України:

- **I група патогенності** — віруси, які зазвичай не спричиняють хвороб у людини (напр., бактеріофаги); роботи з ними не вимагають спеціальних умов біобезпеки.
- **II група** — потенційно небезпечні патогени, здатні викликати захворювання середньої тяжкості (вірус грипу, герпесвіруси); робота дозволена в лабораторіях BSL-2.
- **III група** — патогени, які можуть викликати тяжкі захворювання, але лікування або профілактика зазвичай доступні (наприклад, вірус гепатиту В, ВІЛ); потребують умов BSL-3.
- **IV група** — особливо небезпечні віруси, що спричиняють високу смертність і для яких відсутні ефективні методи лікування або профілактики (віруси Ебола, Марбург, натуральної віспи); робота дозволена лише у лабораторіях BSL-4 з максимальним рівнем біозахисту.

Типи вірусологічних лабораторій

Вірусологічні лабораторії класифікують за рівнем біологічної безпеки (BSL – biosafety level):

- **BSL-1** — базовий рівень. Роботи з не патогенними для людини вірусами. Мінімальні вимоги до приміщень і засобів індивідуального захисту.

- **BSL-2** — середній рівень. Роботи з помірно небезпечними патогенами. Обов'язкове використання біобезпекових шаф, контроль доступу.
- **BSL-3** — високий рівень. Роботи з патогенами, що передаються повітряно-крапельним шляхом. Вентиляція з негативним тиском, повне використання ЗІЗ, обов'язкове навчання персоналу.
- **BSL-4** — найвищий рівень. Робота з надзвичайно небезпечними вірусами. Повна ізоляція, використання скафандрів із позитивним тиском, автономна система очищення повітря, подвійні шлюзи.

Принципи організації та завдання вірусологічних лабораторій

Принципи організації вірусологічних лабораторій ґрунтуються на суворому дотриманні правил біологічної безпеки, чіткій структуризації лабораторного простору та раціональному розподілі функціональних зон. Вірусологічна лабораторія має бути оснащена відповідно до рівня патогенності вірусів, з якими вона працює, та забезпечувати захист як персоналу, так і навколишнього середовища. Основними завданнями таких лабораторій є виявлення, ідентифікація, культивування, вивчення властивостей вірусів, розробка методів діагностики, а також оцінка ефективності противірусних препаратів і вакцин. Особлива увага приділяється попередженню поширення вірусних інфекцій за межі лабораторії.

Обладнання вірусологічних лабораторій

Обладнання вірусологічної лабораторії повинно відповідати міжнародним стандартам біобезпеки. До основного оснащення входять ламінарні шафи біологічної безпеки II або III класу, центрифуги із біозахисними роторами, інкубатори для культивування клітин, автоклави для стерилізації, термостати, мікроскопи (світлові, флуоресцентні, інвертовані), холодильники та морозильники для зберігання зразків, дозатори, стерильні бокси та контейнери для біологічних відходів. Для роботи з високопатогенними вірусами обов'язковим є використання закритих систем, фільтрів HEPA, систем моніторингу повітря та приміщень з перепадом тиску.

Дезінфекція та стерилізація у вірусологічних лабораторіях

Дезінфекція та стерилізація у вірусологічній лабораторії є критично важливими для запобігання контамінації зразків та інфікування персоналу. Дезінфекція полягає в обробці поверхонь, інструментів і середовища хімічними агентами, що знищують більшість патогенів, зокрема хлорвмісними розчинами, спиртами, перекисом водню. Стерилізація, яка забезпечує повне знищення усіх форм мікроорганізмів, проводиться зазвичай за допомогою автоклавування, сухожарової обробки, газової стерилізації або фільтрації. Регулярне виконання процедур очищення та знешкодження є обов'язковим елементом роботи лабораторії.

Джерела, причини та шляхи зараження персоналу вірусологічних лабораторій

Джерелами зараження персоналу вірусологічних лабораторій можуть бути інфіковані зразки біологічного походження (кров, культуральна рідина,

тканини), аерозолі, які утворюються під час маніпуляцій, інструменти та поверхні, що не були належним чином оброблені. Основними шляхами проникнення вірусів до організму є інгаляційний, контактний, трансдермальний (через мікротравми шкіри) та оральний. Причинами інфікування найчастіше є порушення техніки безпеки, недотримання правил використання засобів індивідуального захисту, несправність обладнання або людський фактор, зокрема неухважність чи недосвідченість персоналу.

Практична частина

Тема. Оцінка рівня біологічної небезпеки вірусів і вибір заходів біобезпеки для роботи з ними у лабораторних умовах

Матеріали: інформаційні матеріали про класифікацію вірусів за ступенем патогенності; опис рівнів біологічної безпеки (BSL-1 – BSL-4); нормативні документи ВООЗ, CDC, МОЗ України щодо біобезпеки; картки з описом вірусів для практичної роботи (індивідуально або в парах); доступ до мережі Інтернет для поглибленого дослідження характеристик вірусів; шаблон для заповнення параметрів (передача, патогенність, летальність, рівень BSL, заходи безпеки); презентаційні матеріали (плакати, фліпчарти, ноутбук, проектор).

Обладнання: зошити або ноутбуки для фіксації результатів, маркери для групової роботи, засоби для презентації (фліпчарти, слайди), модельні інструкції з біобезпеки, перелік лабораторного обладнання для різних рівнів BSL, шаблони карт дезінфекції, постери щодо користування ЗІЗ, перелік ситуацій для аналізу біологічних ризиків.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Вибір та характеристика вірусу.

1. Оберіть один із запропонованих вірусів для аналізу (наприклад: вірус кору, SARS-CoV-2, ВІЛ, вірус Ебола, CMV, тощо).
2. Вивчіть наукову літературу, використовуючи джерела (WHO, CDC, PubMed, NCBI Virus) для збору достовірної інформації.
3. Сформулюйте коротку характеристику вірусу за ключовими біологічними параметрами.
4. Заповніть таблицю нижче.

Назва вірусу	Шлях(и) передачі	Патогенність*	Вірулентність**	Летальність*** (%)	Коментар / приклад захворювання

*Патогенність – здатність викликати захворювання.

**Вірулентність – ступінь вираженості патологічного ефекту.

***Летальність – частка летальних випадків серед інфікованих.

Завдання 2. Визначення рівня біологічної безпеки.

1. На основі характеристик обраного вірусу визначте, до якого рівня BSL належить робота з ним (від BSL-1 до BSL-4).

2. Обґрунтуйте вибір рівня біобезпеки відповідно до міжнародних та національних норм.

3. Вкажіть вимоги до приміщення, систем вентиляції, доступу, а також підготовки персоналу.

Завдання 3. Розробка заходів біобезпеки.

1. Опишіть заходи безпеки для роботи з вірусом у лабораторії відповідного рівня:

- використання ламінарної шафи або біобезпекової камери;
- перелік ЗІЗ (рукавички, халати, маски, респіратори, скафандри);
- контроль доступу до лабораторії;
- журналізація роботи.

2. Розробіть алгоритм дезінфекції та стерилізації після завершення експерименту.

3. Визначте перелік необхідного обладнання для виконання досліджень, включаючи засоби стерилізації, засоби вимірювання, контейнери для біовідходів.

Завдання 4. Аналіз ризиків для персоналу.

1. Проаналізуйте можливі шляхи зараження персоналу під час роботи з вірусом:

- інгаляційний шлях;
- контакт із зараженими матеріалами;
- випадкові порізи або аерозолі;
- недотримання правил роботи.

2. Розробіть заходи для зменшення ризиків:

- посилення контролю за ЗІЗ;
- навчання персоналу;
- використання ізоляційних засобів;
- чіткий алгоритм дій у разі аварійної ситуації.

Завдання 5. Презентація результатів.

1. Підготуйте коротку доповідь-презентацію (слайди, плакат або інфографіка) з описом:

- характеристик вірусу;
- рівня біологічної безпеки;
- ключових заходів безпеки;
- запропонованих рішень для мінімізації ризиків.

2. Візьміть участь у груповій дискусії:

- порівняйте обрані віруси за рівнем небезпеки;
- обговоріть можливість заміни роботи з вірусами на безпечніші моделі (наприклад, клітинні культури, вірусоподібні частинки, *in silico* моделювання);
- розгляньте, як недотримання правил BSL може призвести до біоінцидентів.

Контрольні запитання

1. У чому полягає принцип класифікації вірусів за ступенем біологічної небезпеки відповідно до міжнародних стандартів (BOO3, CDC, Україна)?

2. Які характеристики визначають належність вірусу до I, II, III або IV групи патогенності?
3. Наведіть приклади вірусів, що належать до кожної з чотирьох груп патогенності, та обґрунтуйте їхнє віднесення до відповідної групи.
4. Що таке рівень біологічної безпеки лабораторій (BSL) і як він співвідноситься з групами патогенності вірусів?
5. Які інженерні та організаційні заходи впроваджуються у лабораторіях BSL-3 та BSL-4 для забезпечення захисту персоналу та довкілля?
6. Якими критеріями керуються при визначенні вимог до лабораторного обладнання для кожного рівня BSL?
7. Як забезпечується безпечне поводження з вірусами II групи патогенності у лабораторіях BSL-2?
8. Які завдання виконує вірусологічна лабораторія в контексті роботи з вірусами високої патогенності?
9. Які хімічні та фізичні методи використовуються для дезінфекції та стерилізації у вірусологічних лабораторіях?
10. Назвіть основні шляхи зараження персоналу вірусологічних лабораторій та поясніть, як їх можна запобігти у рамках системи біобезпеки.

ЧАСТИНА 1. МЕТОДИ КУЛЬТИВУВАННЯ ВІРУСІВ

Культивування вірусів є фундаментальним етапом у вірусологічних дослідженнях, біотехнологічному виробництві, діагностиці вірусних інфекцій та розробці вакцин і антивірусних препаратів. На відміну від прокаріотичних та еукаріотичних клітин, віруси є облігатними внутрішньоклітинними паразитами, що не здатні до автономного росту та розмноження поза межами живої клітини-господаря. Саме тому їх культивування потребує використання спеціалізованих біологічних систем, до яких належать лабораторні тварини, курячі ембріони та культури клітин.

Вивчення методів культивування вірусів дозволяє здобувачам вищої освіти оволодіти базовими підходами до роботи з вірусними культурами, включаючи планування досліду, вибір відповідної модельної системи, визначення оптимальних умов реплікації вірусів, оцінку цитопатичних ефектів та методів збору і зберігання вірусного матеріалу. У межах практичних занять розглядаються переваги і недоліки різних систем культивування: застосування лабораторних тварин забезпечує можливість вивчення патогенезу вірусної інфекції на рівні цілого організму; курячі ембріони широко використовуються для виробництва вакцин; клітинні культури є високоспецифічною та контрольованою моделлю для оцінки вірусної реплікації *in vitro*.

Окрема увага приділяється питанням біобезпеки, етичним аспектам експериментів із тваринами (зокрема принципам 3R), а також технологіям зберігання і транспортування вірусних ізолятів, що є необхідними для забезпечення стабільності зразків і запобігання інфікуванню персоналу та контамінації середовища.

Практичне опанування сучасних методів культивування вірусів формує у здобувачів необхідні компетентності для подальшої роботи в галузях вірусології, біотехнології, фармації та лабораторної медицини.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №2. Використання лабораторних тварин у вірусологічних дослідженнях

Мета: ознайомитися з основними принципами використання лабораторних тварин у вірусологічних дослідженнях; дослідити переваги та обмеження застосування різних видів лабораторних тварин як моделей вірусної інфекції; проаналізувати етапи вірусологічного експерименту з тваринами, включаючи методи зараження та правила утримання; сформувані уявлення про етичні вимоги та заходи біобезпеки під час роботи з інфікованими лабораторними тваринами.

Теоретичні відомості

1. Цілі використання лабораторних тварин у вірусології.
2. Переваги та недоліки застосування лабораторних тварин.
3. Види лабораторних тварин.
4. Загальні етичні вимоги до використання хребетних тварин (концепція 3R).
5. Основні правила утримання тварин та догляду за ними.
6. Етапи роботи з тваринами при виконанні вірусологічного експерименту.
7. Способи зараження тварин вірусом.
8. Застережні заходи при роботі з інфікованими лабораторними тваринами.

Цілі використання лабораторних тварин у вірусології

Лабораторні тварини відіграють важливу роль у фундаментальних і прикладних дослідженнях у вірусології. Їхнє застосування дозволяє вивчати особливості патогенезу вірусних інфекцій, тестувати нові діагностичні методики, оцінювати ефективність противірусних засобів та вакцин, а також проводити дослідження з вірусної імунології. В умовах *in vivo* дослідник має змогу спостерігати взаємодію вірусу з організмом у цілому, включно з відповіддю імунної системи, особливостями розповсюдження вірусу в тканинах, розвитком патологічних змін та клінічними проявами.

Цілі використання лабораторних тварин у вірусології включають:

- відтворення природного циклу вірусної інфекції;
- вивчення механізмів вірусної патогенності;
- дослідження імунної відповіді на вірусну інфекцію;
- перевірку профілактичних і лікувальних заходів (вакцини, противірусні препарати);
- моделювання вірусних захворювань людини.

Переваги та недоліки застосування лабораторних тварин

До основних переваг відноситься можливість моделювання цілісної інфекції, аналізу взаємодії вірусу з організмом на різних рівнях, а також тестування терапевтичних втручань у реальних фізіологічних умовах. Однак застосування тварин пов'язане з низкою обмежень, зокрема етичного характеру, потребою у спеціальних умовах утримання, значними витратами, а також ризиком, що результати не завжди можна екстраполювати на людину через міжвидові відмінності.

Види лабораторних тварин

Найпоширенішими моделями у вірусології є миші (включно з трансгенними та імунодефіцитними лініями), щури, хом'яки, морські свинки, кролі, курячі ембріони, а також примати, які використовуються у дослідженнях вірусів високого ступеня біологічної небезпеки. Останніми роками також застосовують зебрарібок (*Danio rerio*) як модель для досліджень вірусної патогенності та імунної відповіді.

Загальні етичні вимоги до використання хребетних тварин (концепція 3R)

Міжнародна концепція 3R передбачає: **Replacement** (заміну тварин альтернативними методами, якщо це можливо), **Reduction** (мінімізацію кількості тварин при збереженні наукової цінності дослідження) та **Refinement** (оптимізацію методик з метою зменшення болю та стресу у тварин). Етичне використання тварин є невід'ємною частиною сучасної вірусологічної практики та регулюється нормативно-правовими актами.

Основні правила утримання тварин та догляду за ними

Утримання лабораторних тварин має відповідати стандартам добробуту: належний температурний та світловий режим, вентиляція, достатній простір, повноцінне харчування, ветеринарний контроль. Персонал повинен бути навчений правилам поводження з тваринами та техніці безпеки. Умови утримання значною мірою впливають на достовірність результатів експерименту, тому контроль за санітарією та поведінковими реакціями є обов'язковим.

Етапи роботи з тваринами при виконанні вірусологічного експерименту

Робота з тваринами включає кілька послідовних етапів: підбір моделі згідно з метою дослідження; підготовку (огляд, адаптація, маркування); інфікування вірусом; спостереження за клінічним перебігом хвороби; збір біоматеріалу (кров, тканини); при потребі — евтаназію згідно з етичними вимогами. Усі маніпуляції мають проводитися з мінімальним дискомфортом для тварини.

Способи зараження тварин вірусом

Метод інфікування залежить від біології вірусу та цілей дослідження. Найчастіше використовують: інтраназальний (для респіраторних вірусів), внутрішньочеревний, підшкірний, внутрішньовенний, внутрішньом'язовий або пероральний способи. Зараження може здійснюватися також через укуси комах (трансмісивно) або шляхом контактного інфікування. Вибір методу має бути обґрунтований та відповідати моделі інфекції.

Застережні заходи при роботі з інфікованими лабораторними тваринами

При роботі з інфікованими тваринами необхідно суворо дотримуватися правил біобезпеки. Обов'язковим є використання засобів індивідуального

захисту (рукавички, халати, маски), робота в біобезпекових боксах, дезінфекція інструментів та поверхонь, контроль за утилізацією біологічних відходів. Усі процедури мають бути стандартизовані та узгоджені з протоколами BSL-рівня, відповідно до патогенності вірусу. Навчання персоналу та регулярний контроль за дотриманням біобезпеки є ключовими факторами для запобігання лабораторному інфікуванню.

Практична частина

Тема. Моделювання вірусних інфекцій на лабораторних тваринах: біологічні, імунологічні та етичні аспекти експериментальних моделей

Матеріали: наукові джерела (статті, огляди, бази даних PubMed, NCBI), біомедичні атласи, аналітичні таблиці для оцінки сприйнятливості тварин до вірусів, комп'ютер або планшет з доступом до Інтернету, презентаційне ПЗ (PowerPoint, Canva, Google Slides).

Обладнання: комп'ютер або ноутбук, проектор або інтерактивна панель, ноутбук для нотаток, шаблони для заповнення таблиць, матеріали для створення інфографіки або презентації.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Виберіть вид лабораторних тварин для моделювання вірусних інфекцій.

Примітка. Обґрунтований вибір тваринної моделі базується на знаннях про імунну систему, генетичну подібність до людини, природну або штучно створену чутливість до конкретних вірусів.

Хід роботи

1. Оберіть вид лабораторних тварин (наприклад, миші, кролики, примати, сирійські хом'яки тощо).
2. Вкажіть латинську назву виду.
3. Поясніть мотивацію вибору саме цього виду для моделювання вірусних інфекцій.

Завдання 2. Вивчіть біологічний статус і сприйнятливість обраного виду тварин до вірусів.

Примітка. Аналіз фізіологічних, імунологічних та генетичних характеристик виду дозволяє оцінити його придатність до дослідження певних вірусів.

Хід роботи

1. Опишіть імунологічні особливості виду.
2. Визначте наявність природної або штучної (трансгенної) сприйнятливості до вірусів.
3. Вкажіть віруси, до яких цей вид є чутливим, з короткою характеристикою.

Завдання 3. Опишіть можливості моделювання вірусних інфекцій на обраному виді тварин.

Примітка. Зіставлення патогенезу у тварин із перебігом захворювання у людини дозволяє оцінити релевантність тваринної моделі.

Хід роботи

1. Перелічіть приклади вірусів, які моделюють на цьому виді тварин.
2. Опишіть, які саме аспекти інфекцій вивчаються: імунна відповідь, патогенез, тестування вакцин або противірусних препаратів.
3. За можливості вкажіть конкретні наукові моделі (наприклад, K18-hACE2 миші для SARS-CoV-2).

Завдання 4. Проаналізуйте ефективність тваринної моделі.

Примітка. Вибір ефективної моделі базується на подібності до людини, простоті утримання та можливості отримання репрезентативних даних.

Хід роботи

1. Оцініть переваги: доступність, генетична однорідність, наявність нокаут-ліній, вартість утримання, швидкість розмноження.
2. Назвіть недоліки: відмінності у перебігу захворювання, імунологічні відмінності від людини, труднощі у масштабуванні результатів.
3. Обґрунтуйте ефективність моделі для дослідження конкретного вірусу (приклад: чому миші – ефективна модель для грипу, але не для ВІЛ).

Завдання 5. Оцініть етичні аспекти використання тварин у вірусології.

Примітка. Дотримання етичних норм у дослідженнях на тваринах регламентується концепцією 3R: Replacement (заміна), Reduction (зменшення), Refinement (удосконалення).

Хід роботи

1. Оцініть можливість заміни тварин на альтернативні моделі (клітинні культури, органоїди).
2. Запропонуйте шляхи зменшення кількості тварин в експериментах.
3. Опишіть способи забезпечення добробуту тварин під час дослідження (анестезія, знеболення, гуманна евтаназія).
4. Зазначте законодавчі акти або міжнародні норми, які регулюють використання тварин у біомедичних дослідженнях.

Завдання 6. Сформулюйте висновки.

Примітка. Узагальнення отриманих даних дозволяє зробити обґрунтований висновок про доцільність використання обраної тваринної моделі.

Хід роботи

1. Оцініть загальну ефективність обраного виду лабораторних тварин для дослідження вірусних інфекцій.
2. Визначте умови, за яких використання цього виду є доцільним, та можливі обмеження.
3. Наведіть приклад, як результати, отримані на цій моделі, можуть бути екстрапольовані на людину.

Контрольні запитання

1. У чому полягає основна наукова доцільність використання лабораторних тварин у вірусологічних дослідженнях?
2. Які ключові цілі передбачає застосування лабораторних тварин у фундаментальній і прикладній вірусології?
3. Які переваги має використання *in vivo* моделей для дослідження патогенезу вірусної інфекції?
4. Назвіть основні обмеження та недоліки, пов'язані із використанням тварин у вірусологічних експериментах.
5. Які види лабораторних тварин найчастіше використовують у вірусології, і чому саме вони?
6. У чому полягає суть етичної концепції 3R щодо використання хребетних тварин у дослідженнях?
7. Які вимоги висуваються до умов утримання та догляду за лабораторними тваринами?
8. Опишіть основні етапи вірусологічного експерименту з використанням лабораторних тварин.
9. Які способи інфікування лабораторних тварин вірусами є найбільш поширеними, і як обирається відповідний метод?
10. Які заходи біобезпеки необхідно вжити під час роботи з інфікованими лабораторними тваринами?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №3. Використання курячих ембріонів у вірусологічних дослідженнях

Мета: ознайомитися з морфологічною будовою курячого ембріона та його анатомічними структурами, що використовуються для інокуляції вірусного матеріалу; вивчити основні способи зараження ембріонів вірусами залежно від тропізму збудника; навчитися визначати оптимальний вік ембріонів для ефективного культивування вірусів; опанувати процедуру підготовки курячих ембріонів до інфікування та проведення інокуляції з урахуванням асептичних умов; сформувати уявлення про морфологічні ознаки вірусної реплікації в ембріонах та методи отримання вірусовмісного матеріалу для подальшого дослідження.

Теоретичні відомості

1. Будова курячого ембріону.
2. Способи зараження курячих ембріонів.
3. Ознаки розмноження вірусу в курячому ембріоні.
4. Розтин курячого ембріону та отримання вірусовмісного препарату.
5. Переваги та недоліки використання курячих ембріонів для вірусологічних досліджень.

Будова курячого ембріону

Курячий ембріон є одним із найпоширеніших біологічних об'єктів, що використовується у вірусології для культивування вірусів. До моменту інфікування вірусами, ембріони зазвичай досягають 9–12 днів інкубації. На цьому етапі розвитку ембріон має добре сформовані кровоносні судини, амніотичну та алантоїсну порожнини, хоріоалантоїсну оболонку, а також жовтковий мішок.

Хоріоалантоїсна мембрана (ХАО) є багатосудинною структурою, утвореною злиттям хоріона та алантоїсу. Вона виконує функції дихання та виділення, але в контексті вірусології має важливе значення як місце інокуляції вірусів, які мають афінність до епітеліальних тканин або судин. Алантоїсна порожнина — ще одна критично важлива структура, яка заповнена рідиною, зручною для збирання вірусного матеріалу після реплікації. Жовтковий мішок містить поживні речовини і використовується для інокуляції вірусів, що мають тропізм до ендотеліальних або мезодермальних клітин. Амніотична порожнина, що оточує ембріон, застосовується переважно для інфікування нейротропних вірусів.

Розуміння будови курячого ембріона є ключовим для вибору найбільш відповідного шляху інокуляції залежно від властивостей конкретного вірусу.

Способи зараження курячих ембріонів

Існує кілька основних способів інфікування курячих ембріонів вірусами, кожен з яких залежить від біологічних властивостей вірусу — зокрема, його тканинного тропізму, шляху проникнення та умов реплікації. До основних методів інокуляції відносять введення вірусного матеріалу в хоріоалантоїсну мембрану (ХАО), алантоїсну порожнину, амніотичну порожнину, жовтковий мішок та в самому ембріоні — внутрішньовенно або внутрішньомозково. Інокуляція в ХАО здійснюється переважно для вірусів, які викликають видимі ураження у вигляді бляшок або некрозів на мембрані, що полегшує візуальний контроль. Цей метод широко застосовується для діагностики та дослідження вірусів віспи, герпесу, грипу. Введення у алантоїсну порожнину дозволяє культивувати віруси, які розмножуються у рідинному середовищі (наприклад, вірус грипу, хвороби Ньюкасла). Амніотичне введення застосовується для дослідження вірусів, які виявляють афінність до епітелію травного тракту або нервової системи (наприклад, деякі ентеровіруси, віруси грипу). Інокуляція в жовтковий мішок частіше використовується для збереження імуногенності вакцинних штамів та для вирощування вірусів із тропізмом до мезенхімальних клітин.

Усі ці методи вимагають високої точності та стерильності під час виконання, а вибір конкретного способу залежить від типу вірусу, мети дослідження та стадії розвитку ембріона.

Ознаки розмноження вірусу в курячому ембріоні

Після інфікування вірусом курячий ембріон або його оболонки можуть демонструвати специфічні ознаки реплікації вірусу, які дозволяють здійснювати як якісну, так і кількісну оцінку інфекційного процесу. Основними морфологічними та біохімічними проявами є: загибель ембріона, зміни в тканинах оболонок (особливо на хоріоалантоїсній мембрані), утворення

геморагій, некрозів, набряків або специфічних включень, а також накопичення вірусу в рідинах (алантоїсній, амніотичній) або тканинах ембріона. Смерть ембріона зазвичай настає впродовж 24–72 годин після інокуляції, залежно від типу вірусу та дози інфекції. Це є ознакою високої вірулентності або неправильно підбраного розведення вірусу. За наявності живого ембріона, який вижив після інокуляції, визначальним є аналіз вірусної реплікації за зовнішніми та гістологічними ознаками. При інокуляції в ХАО можуть формуватися бляшки — локальні зони некрозу або прозорості, які добре видно при візуальному огляді мембрани. У випадку використання алантоїсної або амніотичної порожнини, рідину відбирають для подальшого аналізу методом ПЛР, ІФА, реакції гемаглютинації тощо.

Таким чином, ознаки реплікації вірусу в курячому ембріоні залежать від місця інокуляції, біології вірусу та тривалості інкубаційного періоду, і вони слугують основою для подальшої діагностики, вивчення властивостей вірусу та виробництва вакцин.

Розтин курячого ембріона та отримання вірусовмісного препарату

Після завершення інкубаційного періоду необхідно провести розтин ембріона для вилучення вірусовмісного матеріалу. Цей процес вимагає суворого дотримання стерильності та обережності, оскільки можливе утворення аерозолів, що несуть інфекційну загрозу. Розтин проводиться у ламінарному боксі з використанням стерильного інструментарію.

Етапи розтину залежать від методу інокуляції. При інфікуванні через алантоїсну порожнину шкаралупу над повітряною камерою протирають антисептиком, просвердлюють отвір і шприцом з голкою відбирають алантоїсну рідину, яка є найбільш інформативним джерелом вірусу. У разі інокуляції в ХАО оболонку знімають і візуально оцінюють утворені бляшки. Амніотичну рідину також можна відібрати за допомогою шприца після відкриття відповідної ділянки шкаралупи.

У випадку введення вірусу внутрішньом'язово або внутрішньовенозно, проводять евтаназію ембріона та вилучення окремих органів або тканин (печінка, мозок, селезінка) для подальшого аналізу — як правило, для гістологічного дослідження або ізоляції вірусу. Вилучені зразки підлягають заморожуванню, консервації або негайній обробці відповідно до цілей експерименту.

Весь процес повинен супроводжуватися дотриманням заходів біозахисту, а зібраний вірусовмісний матеріал етикетується, обліковується та зберігається згідно з правилами роботи з патогенними біологічними агентами.

Переваги та недоліки використання курячих ембріонів для вірусологічних досліджень

Використання курячих ембріонів у вірусології має низку значущих переваг, що забезпечують їх актуальність як моделі для культивування вірусів. Однією з головних переваг є висока чутливість ембріонів до широкого спектра вірусів, зокрема грипу, віспи, хвороби Ньюкасла, герпесу. Вони дозволяють отримувати значні кількості вірусовмісного матеріалу за короткий термін без потреби у складному лабораторному обладнанні. Крім того, ця модель є

дешевшою порівняно з використанням лабораторних тварин або культур клітин, не потребує стерильного віварію, а курячі яйця легко доступні та стандартизовані за якістю.

Курячі ембріони є також прийнятним об'єктом з етичної точки зору, оскільки до певного етапу розвитку вони не підпадають під суворе регулювання експериментів на тваринах у більшості країн.

Проте є і певні обмеження. Основним недоліком є міжвидова бар'єрність: деякі віруси, зокрема специфічні до ссавців, не реплікуються в ембріонах або потребують адаптації. Також результат інфікування може залежати від точного віку ембріона, умов інкубації та точності інокуляції. Ускладнення виникають і при стандартизації дозування, візуальній оцінці результатів (особливо для вірусів без цитопатичної дії) та подальшій ідентифікації збудника. Таким чином, курячі ембріони є ефективним інструментом у практичній вірусології, особливо для діагностики, дослідження вірусної реплікації та виробництва вакцин, однак потребують точного дотримання методик та усвідомлення їхніх обмежень.

Практична частина

Тема. Курячі ембріони як модель для вірусологічних досліджень: будова, методи зараження та ознаки вірусної реплікації

Матеріали: схеми розвитку курячого ембріону, схеми інокуляції вірусів, мікрофотографії вірус-індукованих змін, відеоматеріали з розвитку ембріона, наукові статті, таблиці для аналізу патоморфологічних змін, бланки для нотаток, презентаційне програмне забезпечення.

Обладнання: комп'ютер або ноутбук з доступом до інтернету, проектор або інтерактивна панель, матеріали для створення інфографіки чи презентації (PowerPoint, Canva, Google Slides), принтовані навчальні схеми, макети ембріонів (за наявності).

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Вивчіть будову курячого ембріону.

Примітка. Вивчення ембріонального розвитку курки дозволяє визначити оптимальні часові точки для вірусологічного експерименту та оцінити функціональне значення ембріональних оболонок.

Хід роботи

1. Опишіть основні етапи розвитку курячого ембріону в перші 10 днів інкубації (день за днем).

2. Виділіть критичні етапи, на яких ембріон є найбільш чутливим до вірусної інфекції (день 7–9).

3. Охарактеризуйте будову і функції хоріоаллантоїсної та аллантоїсної оболонок.

4. Обґрунтуйте, чому саме ці оболонки використовують для введення вірусів: наявність судин, доступ до респіраторного епітелію, імунна наївність ембріона.

5. Узагальніть, чому курячий ембріон — ефективна система для реплікації вірусів (особливо грипу, герпесу, віспи).

Завдання 2. Проаналізуйте способи зараження ембріонів вірусом.

Примітка. Різні анатомічні порожнини курячого ембріону дають змогу цілеспрямовано вводити вірус відповідно до його тропізму.

Хід роботи

1. Опишіть основні методи інокуляції вірусів у курячий ембріон:

- у аллантоїсну порожнину (грип, парагрип),
- у амніотичну порожнину (вірус грипу, вірус Ньюкасла),
- під хоріоаллантоїсну мембрану (герпесвіруси, віспа),
- у жовтковий мішок (схожі на арбовіруси, ретровіруси).

2. Обґрунтуйте, чому, наприклад, вірус грипу ефективно розмножується після введення в амніотичну або аллантоїсну порожнину (висока репродукція в епітелії дихальних шляхів).

3. Опишіть, які ознаки можуть вказувати на вірусну інфекцію ембріона:

- затримка розвитку,
- геморагії,
- некроз тканин,
- зменшення рухової активності,
- загибель ембріона.

Завдання 3. Вивчіть ознаки розмноження вірусу в ембріоні.

Примітка. Вивчення морфологічних і цитопатичних змін у заражених ембріонах дозволяє оцінити вірулентність, тропізм і ступінь ураження.

Хід роботи

1. Наведіть приклади характерних ознак реплікації вірусів:

- вірус грипу — геморагії, смерть ембріона, висока концентрація вірусу в аллантоїсній рідині,
- вірус герпесу — білі плями під хоріоаллантоїсною мембраною,
- вірус вітряної віспи (Varicella-Zoster) — дегенеративні зміни епітелію.

2. Проаналізуйте цитопатичні ефекти (ЦПЕ), які спостерігаються після зараження:

- вакуолізація клітин,
- некроз,
- геморагії,
- набряки.

3. Поясніть, як можна візуально або мікроскопічно виявити ефекти реплікації:

- зміни в тканинах хоріоаллантоїсної мембрани,
- осади вірусних тіл у рідинах,
- зменшення об'єму аллантоїсної рідини або зміна її кольору.

Завдання 4. Презентуйте результати та сформулюйте висновки.

Хід роботи

1. Створіть інфографіку, схему або усну презентацію, яка відображає вибране завдання:

- розвиток ембріона (інкубація, функції оболонок)
- способи зараження
- ознаки інфекції

2. Виступіть із коротким поясненням (3–5 хв) перед аудиторією або викладачем.

3. У висновку:

- сформулюйте, чому курячий ембріон — зручна вірусологічна модель
- визначте межі її застосування
- зазначте, які віруси найчастіше використовують цю модель
- порівняйте з іншими альтернативними системами (клітинні культури, тварини-моделі).

Контрольні запитання

1. Які основні морфологічні структури формуються у курячого ембріона на 9–12 день інкубації, і чому саме на цьому етапі його використовують для інокуляції вірусів?

2. Яке біологічне значення має ХАО у курячого ембріона, і чому вона є зручною мішенню для деяких вірусів?

3. Поясніть функціональне призначення алантоїсної порожнини та її переваги для культивування вірусів.

4. У яких випадках для інокуляції вірусів використовують жовтковий мішок курячого ембріона, і які віруси переважно вибирають цю мішень?

5. Чому амніотична порожнина є ефективним місцем для інфікування нейротропних вірусів, і які дослідження можна з її допомогою проводити?

6. Як будова курячого ембріона визначає вибір методу інокуляції вірусу, і які чинники при цьому враховують?

7. Чим зумовлена висока чутливість курячих ембріонів до широкого спектра вірусів, і як це використовується у виробництві вакцин?

8. Які особливості кровопостачання курячого ембріона мають значення при виборі шляху введення вірусу?

9. Як анатомічна доступність курячого ембріона спрощує його використання для практичної роботи у лабораторних умовах?

10. Порівняйте переваги та обмеження використання курячого ембріона з клітинними культурами та лабораторними тваринами як моделями для вивчення вірусів.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №4. Використання клітинних культур у вірусологічних дослідженнях

Мета: ознайомитися з принципами та умовами культивування клітин *in vitro*, класифікацією тваринних культур клітин, їх морфологічними характеристиками та особливостями зберігання; вивчити методи зараження клітинних культур вірусами та оцінювання цитопатичної дії як маркера вірусної реплікації; опанувати практичні підходи до виявлення розмноження

вірусів у клітинних культурах та оцінити переваги використання клітинних систем у вірусологічних дослідженнях порівняно з іншими моделями.

Теоретичні відомості

1. Умови культивування клітин *in vitro*.
2. Поживні середовища.
3. Класифікація тваринних культур клітин.
4. Одношарові культури клітин.
5. Суспензійні культури клітин.
6. Морфологічні категорії клітин у культурі.
7. Зберігання культур клітин.
8. Контамінація культур клітин.
9. Взаємодія вірусів із клітинами.
10. Способи зараження культури клітин вірусом.
11. Цитопатична дія вірусу.
12. Переваги методу культури клітин перед іншими живими системами.

Умови культивування клітин in vitro

Культивування клітин *in vitro* потребує суворого дотримання фізико-хімічних і біологічних умов, які забезпечують життєздатність, проліферацію та стабільність культур. Однією з основних умов є підтримка стерильності, оскільки навіть незначне забруднення призводить до втрати культури. Робота проводиться у ламінарних шафах біологічної безпеки, з використанням стерильного посуду та фільтрованих середовищ.

Температурний режим зазвичай становить 36–37 °C — оптимальний для клітин теплокровних тварин. Вологість повітря підтримується на рівні 95%, а рН середовища стабілізується в межах 7,2–7,4 завдяки буферній системі, яка часто включає гідрогенкарбонат натрію та контроль концентрації CO₂ (зазвичай 5%).

Наявність адекватного газового середовища (насамперед концентрації вуглекислого газу) забезпечується за допомогою спеціальних CO₂-інкубаторів. Також важливою умовою є вибір відповідної пластини або флакона для адгезивного прикріплення клітин або їх рівномірного перемішування у суспензії. Загалом, дотримання фізіологічно наближених умов культивування дозволяє максимально наблизити експеримент до умов *in vivo*.

Поживні середовища

Поживні середовища для клітинного культивування забезпечують постачання основних нутрієнтів, вітамінів, солей, джерел енергії, факторів росту та буферних компонентів. Найпоширенішими є середовища Ігла (DMEM, MEM), RPMI-1640, F-10 та Ham's F-12, кожне з яких має оптимізований склад залежно від типу клітин.

Основу поживного середовища становить суміш амінокислот, глюкози, мінеральних солей (Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Cl⁻, PO₄³⁻), вітамінів (вітаміни групи B, аскорбінова кислота, біотин), а також буферів для підтримки рН. Додатково до складу вводять фетальну телячу сироватку (англ. fetal bovine serum, FBS) — джерело факторів росту, гормонів і білків, які сприяють клітинній адгезії та проліферації.

Також до середовища можуть додаватися антибіотики (пеніцилін, стрептоміцин) для запобігання бактеріальному зараженню, хоча постійне їх використання не рекомендується через ризик розвитку резистентності або цитотоксичності. Поживні середовища можуть бути як рідкими, так і твердими (на агарі) — останні використовують переважно для клітин бактерій або дріжджів.

Класифікація тваринних культур клітин

Тваринні клітинні культури класифікують за кількома критеріями: походженням, здатністю до проліферації, морфологією та типом росту. За походженням виділяють первинні культури, диплоїдні лінії та перевічні (трансформовані) клітинні лінії.

Первинні культури отримують безпосередньо з тканин організму шляхом механічного або ферментативного розщеплення. Вони мають обмежену кількість поділів (звичайно до 5–10 пасажів) і добре зберігають фенотипічні властивості *in vivo*. Диплоїдні лінії (наприклад, MRC-5) мають подовжений життєвий цикл (до 50 поділів) і стабільний каріотип. Безсмертні клітинні лінії (HeLa, Vero, ВНК-21, MDCK) отримані шляхом трансформації і мають необмежений потенціал поділу, але можуть втрачати деякі характеристики вихідної тканини.

Також культури класифікують за типом росту: адгезивні (прилипають до поверхні) та суспензійні (вільно плавають у середовищі). Морфологічно клітини поділяють на епітеліальні, фібробластоподібні та лімфоїдні.

Одношарові культури клітин

Одношарова культура — це найпоширеніший тип культивування клітин *in vitro*, який передбачає прикріплення клітин до поверхні (зазвичай пластикової або скляної) в одній площині. Цей метод широко використовується для вірусологічних, токсикологічних, фармакологічних досліджень.

Основна перевага таких культур — легкість у спостереженні під мікроскопом, контроль щільності, морфології та стану клітин. Адгезивне прикріплення сприяє більш рівномірному росту, дозволяє контролювати процеси мітозу, зараження вірусами, прояви цитопатичної дії (ЦПД) тощо.

Для підтримки одношарових культур використовують спеціальні колби (Т-25, Т-75), планшети з різною кількістю лунок (6-, 24-, 96-лункові) або чашки Петрі. Поверхня посуду часто обробляється адгезивними білками (колаген, фібронектин) для кращого прикріплення клітин.

Однак одношарові культури мають обмеження — вони не імітують тривимірну архітектуру тканин, що знижує їхню відповідність до *in vivo* умов. У зв'язку з цим сучасні дослідження поступово переходять до використання 3D-культур або органоїдів, однак для більшості стандартних вірусологічних задач одношарові культури залишаються основним інструментом.

Суспензійні культури клітин

Суспензійні культури клітин складаються з клітин, що вільно плавають у поживному середовищі без прикріплення до поверхні. Цей тип культур характерний для гемопоетичних або лімфоїдних клітин (наприклад, Jurkat, U937,

ТНР-1), а також використовується у біотехнології для масштабного виробництва біологічних препаратів, зокрема вірусних вакцин.

Переваги суспензійних культур — можливість безперервного культивування у великих об'ємах, легке масштабування, автоматизація процесу та зниження вартості культивування. Такі клітини вирощують у колбах або біореакторах зі слабким перемішуванням (швидкість обертання ~100 об/хв), щоб уникнути осідання або агрегації клітин.

Суспензійні культури часто використовуються для продукції вірусів у суспензійних лініях Vero, ВНК або HEK293 у суспензійному форматі. Вони забезпечують високий вихід вірусного матеріалу, дозволяють контролювати щільність клітин і швидкість росту за допомогою OD (оптичної щільності, англ. optical density) або клітинного лічильника.

Серед недоліків — більша складність морфологічного контролю, потреба в точному налаштуванні умов перемішування, а також ризик утворення агрегатів, що може впливати на результат вірусної інфекції.

Морфологічні категорії клітин у культурі

Клітини, які культивуються *in vitro*, можна класифікувати за морфологічними ознаками на три основні категорії: епітеліальні, фібробластоподібні та лімфоїдні. Ця класифікація ґрунтується на формі клітин, типі прикріплення до поверхні та характері росту.

Епітеліальні клітини мають полігональну або округлу форму, щільно прилягають одна до одної, формуючи монолайер. Вони демонструють високу проліферативну здатність і здатні до формування міжклітинних контактів. Прикладом є клітинна лінія MDCK (собача нирка), яка часто використовується для реплікації вірусу грипу.

Фібробластоподібні клітини витягнуті, веретеноподібної форми, розташовуються паралельно одна до одної. Вони активно мігрують по поверхні субстрату та характеризуються вираженням цитоскелетом. Типовим прикладом є лінія Vero (клітини нирки зеленої мавпи).

Лімфоїдні клітини ростуть у суспензії, мають кулясту форму, не прикріплюються до поверхні. Це, наприклад, клітинні лінії Jurkat або Raji. Вони походять із клітин імунної системи та широко використовуються для імуновірусологічних досліджень.

Знання морфологічних типів клітин дозволяє правильно підібрати умови культивування, визначити оптимальні моделі для дослідження вірусної інфекції та аналізувати специфіку цитопатичних ефектів, викликаних тим чи іншим збудником.

Зберігання культур клітин

Правильне зберігання клітинних культур є критично важливим для забезпечення довготривалого використання клітинної лінії та збереження її генетичних і фенотипових характеристик. Основними методами зберігання є кріоконсервація та поточне культивування з підтриманням пасажів.

Кріоконсервація дозволяє тривале зберігання клітин у замороженому стані при температурах -80°C або -196°C у рідкому азоті. Для цього клітини обробляють кріопротекторами (найчастіше 10% ДМСО у сироватці або

середовищі) для запобігання утворенню кристалів льоду, що можуть пошкодити клітинну мембрану. Процес заморожування повинен бути контрольованим, з поступовим зниженням температури ($\sim 1^\circ\text{C}/\text{хв}$).

Після відновлення клітини швидко розморожують у водяній бані при 37°C , центрифугують для видалення ДМСО, відмивають і пересідають у свіже середовище.

Поточне культивування потребує регулярного перепасажування клітин (залежно від типу — кожні 2–7 днів), щоб уникнути переростання, контакту з виснаженим середовищем або втрати життєздатності. Надмірна кількість пасажів може призвести до генетичної нестабільності.

Контамінація культур клітин

Контамінація — одне з найсерйозніших ускладнень у роботі з клітинними культурами, що може призвести до спотворення результатів експерименту або повної втрати культури. Основні типи контамінації включають бактеріальну, грибкову, мікоплазмову, а також крос-контамінацію іншими клітинними лініями.

Найпоширеніша — мікоплазмова контамінація, яка не викликає помутніння середовища, не виявляється при звичайному мікроскопуванні, але істотно змінює клітинний метаболізм, експресію генів і чутливість до вірусної інфекції. Діагностується методом ПЛР, флуоресцентного фарбування ДНК або специфічними біохімічними тестами.

Бактеріальна або грибкова контамінація зазвичай супроводжується зміною прозорості середовища, неприємним запахом, випаданням осаду. Уникнути її можна завдяки дотриманню стерильності, використанню фільтрованих середовищ, стерильного посуду, регулярному контролю якості середовищ і приміщень.

Запобігання контамінації також включає роботу лише в ламінарних шафах, ізоляцію нових ліній до перевірки, стерилізацію інструментів та використання одноразових матеріалів.

Взаємодія вірусів із клітинами

Вірусна інфекція в культурі клітин є складним багатоступеневим процесом, що включає прикріплення вірусу до специфічних рецепторів на поверхні клітини, проникнення в цитоплазму, реплікацію генетичного матеріалу, синтез вірусних білків, складання віріонів і їхній вихід із клітини.

Кожен вірус має тропізм до певних типів клітин, який визначається наявністю специфічних рецепторів. Наприклад, вірус грипу розпізнає сіалові кислоти, вірус імунодефіциту людини (ВІЛ) — CD4^+ Т-лімфоцити.

Клітинна відповідь на інфекцію може варіювати від некрозу або апоптозу до персистенції або трансформації. Деякі віруси можуть змінювати експресію клітинних генів або викликати утворення включень у ядрі чи цитоплазмі.

Вірусна реплікація в культурі є ключовим моментом для оцінки інфекційної активності, вивчення механізмів патогенезу та тестування противірусних препаратів. Залежно від виду вірусу і мети дослідження, застосовуються різні методи — ІФА, ПЛР, реакція гемаглютинації, цитопатичний ефект.

Способи зараження культури клітин вірусом

Інфікування клітинної культури здійснюється шляхом інокуляції вірусного матеріалу на моношар або у суспензію. Попередньо клітини повинні бути життєздатні, з оптимальною щільністю (звичайно 80–90% конфлюентності).

Вірус додають у мінімальному об'ємі до клітин, інкубують 1–2 години при 37 °С для адсорбції, після чого промивають або одразу додають свіже середовище. Інфекція може бути гострою (один цикл реплікації) або персистентною (тривале носійство).

Важливим є дотримання множинності інфекції (MOI) — співвідношення віріонів до клітин. Високий MOI забезпечує синхронне зараження, низький — природну динаміку інфекції.

Цитопатична дія вірусу

Цитопатична дія (ЦПД) — це морфологічні зміни в інфікованих клітинах, спричинені реплікацією вірусу. Вона є важливим діагностичним критерієм і дозволяє візуально ідентифікувати інфікування.

Прояви ЦПД можуть включати ущільнення або лізис клітин, формування симпластів, утворення вакуоль, втрата прикріплення, грануляція цитоплазми, пікноз ядра, утворення внутрішньоклітинних включень. Ці зміни спостерігаються під мікроскопом у фазово-контрастному або світловому режимі.

Типові приклади: вірус герпесу викликає великі внутрішньоядерні включення; вірус грипу — вакуолізацію; аденовіруси — округлення клітин; ВІЛ — формування багатоядерних клітин.

Переваги методу культури клітин перед іншими живими системами

Метод культивування клітин має низку переваг у порівнянні з іншими живими системами (тварини, курячі ембріони):

- **Етичність:** не потребує використання живих тварин.
- **Відтворюваність і стандартизація:** забезпечує контрольовані умови експерименту.
- **Можливість візуалізації** змін у реальному часі.
- **Економічна ефективність:** менші витрати на утримання, можливість зберігання ліній.
- **Масштабованість:** дозволяє масштабне виробництво вакцин, антигенів, тест-систем.
- **Гнучкість:** можливість генетичної модифікації, трансфекції, створення моделей різних патологій.

Клітинні культури стали незамінним інструментом у вірусології, фармації, біотехнології та молекулярній медицині.

Практична частина

Тема. Цитопатична дія вірусів: механізми, фактори впливу та методи виявлення в клітинних культурах

Матеріали: наукові статті та огляди з вірусології, мікрофотографії клітин з ознаками цитопатичної дії (ЦПД), схеми клітинних змін, відеоматеріали (вірусна інфекція *in vitro*), таблиці для заповнення результатів,

приклади досліджень методами RT-PCR, імуофлуоресценції, електронної мікроскопії.

Обладнання: комп'ютер з доступом до баз даних (PubMed, NCBI), презентаційне програмне забезпечення (PowerPoint, Canva), при наявності — мікроскоп, зразки клітинних культур (віртуальні або демонстраційні), зошити для записів.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Дослідіть механізми цитопатичної дії вірусів.

Примітка. Аналіз механізмів, за допомогою яких віруси змінюють структуру та функцію клітин, дозволяє зрозуміти патогенез вірусних інфекцій і сприяти розробці противірусних стратегій.

Хід роботи

1. Опишіть основні типи цитопатичної дії вірусів:

- лізис клітин — руйнування клітинної мембрани під час виходу вірусних частинок,
- синцитіюутворення — злиття інфікованих клітин у багатоядерні гігантські клітини (наприклад, при інфекції вірусом кори, RSV),
- апоптоз — програмована загибель клітин під впливом вірусної інфекції.

2. Наведіть приклади вірусів, які викликають кожен із цих ефектів.

3. Поясніть, як вірусні білки (наприклад, білки оболонки, неструктурні білки, протеази) змінюють сигнальні шляхи клітини, індукують стрес ендоплазматичного ретикулума або порушують цитоскелет.

4. Узагальніть біологічне значення ЦПД: сприяння поширенню вірусу, уникнення імунної відповіді, виснаження інфікованих клітин.

Завдання 2. Проаналізуйте методи виявлення вірусної реплікації в клітинних культурах.

Примітка. Сучасні методи дозволяють виявити наявність і динаміку реплікації вірусу, навіть за відсутності явної морфологічної ЦПД.

Хід роботи

1. Проаналізуйте три основні методи:

- імуофлуоресценція — виявлення вірусних білків за допомогою флуоресцентно мічених антитіл (локалізація вірусного антигену в клітині),
- RT-PCR (зворотнотранскриптазна ПЛР) — виявлення вірусної РНК з високою чутливістю і специфічністю (наприклад, для SARS-CoV-2, грипу),
- електронна мікроскопія (ЕМ) — візуалізація вірусних частинок у клітинах, виявлення віріонів у цитоплазмі, ядрах, везикулах.

2. Порівняйте переваги та обмеження кожного з методів: чутливість, специфічність, швидкість, технічна складність

3. Обґрунтуйте вибір методу для виявлення конкретних вірусів: RT-PCR — для РНК-вірусів, ІФА — для вірусів із високою експресією поверхневих антигенів, ЕМ — для підтвердження структури невідомих віріонів

Завдання 3. Проаналізуйте вплив різних факторів на цитопатичну дію вірусів.

Примітка. Цитопатичний ефект залежить не лише від типу вірусу, а й від умов середовища, типу клітин та інфекційного навантаження.

Хід роботи

1. Оцініть вплив температури інкубації на ЦПД: при підвищеній температурі реплікація може бути інтенсивнішою або, навпаки, гальмуватися.
2. Проаналізуйте вплив дози вірусу (МОІ): низьке навантаження — м'який ЦПЕ, високе — масова загибель клітин.
3. Порівняйте різні типи клітинних ліній:
 - Vero — чутливі до багатьох вірусів,
 - HEp-2 — підходять для РС-вірусу,
 - MDCK — для вірусу грипу.
4. Поясніть, чому одні клітини стійкіші: відсутність специфічних рецепторів, сильні антивірусні механізми (наприклад, інтерференова відповідь).
5. Обговоріть вплив середовища (рН, склад поживних речовин, наявність сироватки) на активність реплікації.

Завдання 4. Представте результати та обговоріть їх.

Хід роботи

1. Створіть інфографіку, презентацію або мікросхему на основі обраного завдання:
 - механізми цитопатичної дії,
 - порівняння методів виявлення вірусної реплікації,
 - таблиця залежності ЦПД від умов.
2. У формі короткої доповіді (до 5 хв) представте результати.
3. Обговоріть із групою:
 - Які методи найбільш ефективні для дослідження вірусної патогенності?
 - Чи можна уникнути ЦПД і зберегти клітини живими?
 - Як дослідження ЦПЕ сприяє створенню вакцин і противірусних препаратів?

Контрольні запитання

1. Які фізико-хімічні параметри є критичними для підтримки життєздатності клітин *in vitro*?
2. Чому важливе дотримання стерильності під час культивування клітин, і які засоби використовують для цього?
3. Який температурний режим оптимальний для культивування клітин ссавців і чому?
4. Яким чином підтримується стабільний рівень рН у культурному середовищі?
5. Яке значення має контроль рівня CO₂ в інкубаторах і якою є його оптимальна концентрація?

6. Для чого використовується ламінарна шафа у роботі з клітинними культурами?

7. Які показники вологості та як вони підтримуються в умовах культивування клітин?

8. Чому важливо правильно підібрати тип пластичного посуду для різних типів клітинних культур?

9. Які наслідки можуть виникнути при порушенні фізіологічних умов культивування клітин?

10. Як забезпечується фізіологічна наближеність умов *in vitro* до *in vivo* при роботі з клітинними культурами?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №5. Способи зберігання і транспортування вірусів

Мета: ознайомитися з основними методами зберігання та транспортування вірусів різних типів; вивчити принципи кріоконсервації та ліофілізації як ключових способів консервування вірусних ізолятів; сформулювати уявлення про вимоги до маркування, обліку та етики використання вірусного матеріалу в лабораторних умовах; навчитися аналізувати та порівнювати ефективність різних способів збереження вірусовмісних проб з урахуванням типу вірусу, тривалості зберігання та умов транспортування.

Теоретичні відомості

1. Основні методи консервування вірусів різних типів (кріоконсервація, ліофілізація)

2. Облік і етикування у лабораторії.

3. Транспортування вірусних ізолятів.

Основні методи консервування вірусів різних типів (кріоконсервація, ліофілізація)

Консервування вірусів є критичним етапом у вірусологічних дослідженнях, який забезпечує тривале збереження інфекційної активності вірусних ізолятів для подальших діагностичних, наукових чи виробничих потреб. Серед основних методів консервування найпоширенішими є кріоконсервація та ліофілізація.

Кріоконсервація — це заморожування вірусів при дуже низьких температурах, зазвичай -80°C (у морозильниках глибокої заморозки) або -196°C (у рідкому азоті). Метод базується на призупиненні біологічної активності за рахунок зниження температури, що запобігає розкладу вірусного геному та структурних білків. Щоб уникнути утворення кристалів льоду, які можуть пошкодити вірусні частинки, застосовують кріопротектори — найчастіше це 5–10% диметилсульфоксид (ДМСО), гліцерин або сироватка крові. Кріоконсервація зберігає віруси високої чутливості, включно з РНК-вмісними, і широко використовується для робочих колекцій.

Ліофілізація (сублімаційне висушування) передбачає видалення води з вірусного препарату при низькій температурі й низькому тиску. У результаті утворюється стабільний сухий порошок, який можна зберігати при температурі

4 °C або кімнатній температурі без значної втрати інфекційної активності. Перед початком процесу до вірусомісного розчину додають стабілізатори — сахарозу, желатин, альбумін — для збереження структури віріонів. Ліофілізовані препарати зручні для транспортування, стандартизовані та мають тривалий термін придатності, тому їх широко використовують у виробництві вакцин.

Кожен з методів має свої переваги й обмеження залежно від типу вірусу. Наприклад, оболонкові віруси є більш чутливими до заморожування та висушування, тому для них необхідно ретельно обирати стабілізатори. Вибір методу консервування залежить від стабільності вірусу, мети зберігання, наявного обладнання та подальшого використання препарату.

Облік і етикетування у лабораторії

Управління вірусними зразками в лабораторії потребує суворого контролю, чіткого етикетування та систематичного обліку. Це є необхідною умовою не лише для забезпечення відтворюваності досліджень і збереження біоматеріалу, але й для дотримання принципів біобезпеки та біоетики.

Етикетування вірусних ізолятів здійснюється безпосередньо після приготування або консервації зразка. На етикетці обов'язково зазначають: повну назву зразка (назва вірусу, штам), дату отримання або заморожування, джерело (культура клітин, курячий ембріон, біоматеріал), ступінь розведення або титр, а також ініціали оператора. У разі використання кольорових етикеток — вони повинні відповідати прийнятій у лабораторії системі маркування. Етикетки мають бути водостійкими й термостійкими, особливо при роботі з рідким азотом або автоклавуванням.

Облік зразків ведеться у паперовому журналі або в електронній базі даних. Такий облік включає інформацію про походження, умови зберігання, кількість вірусомісних флаконів, термін придатності та історію використання. Усі операції з вірусами повинні бути задокументовані: від моменту інокуляції до зберігання та утилізації.

Особливе значення має систематичний аудит: перевірка актуальності зразків, умов їх зберігання, справності морозильників і рідинноазотних систем. У лабораторіях високого рівня біобезпеки ведеться подвійний контроль: один — оператором, другий — уповноваженою особою. Усі зразки повинні мати унікальний код або ідентифікатор, що дає змогу відстежувати їхній шлях у системі обігу біологічних агентів.

Належна система обліку та етикетування забезпечує ефективне управління колекцією вірусів, запобігає помилкам у роботі та сприяє дотриманню міжнародних вимог з біобезпеки та лабораторної практики (GCLP, ISO 15189, BMBL).

Транспортування вірусних ізолятів

Транспортування вірусів — відповідальна процедура, яка має відповідати суворим національним і міжнародним вимогам щодо біобезпеки, включно з правилами ВООЗ, CDC, IATA (International Air Transport Association) та українським законодавством. Основна мета транспортування — безпечна доставка вірусного матеріалу без втрати його інфекційної активності та без створення ризику для оточуючого середовища і персоналу.

Віруси транспортують у триплексних системах пакування, що включають:

1. Первинну герметичну ємність (ампула, флакон із пробой), заповнену сорбуючим матеріалом у разі розливу.
2. Вторинний герметичний контейнер, стійкий до пошкоджень і герметичний за умови протікання.
3. Зовнішню упаковку, що забезпечує фізичний захист, маркування та документацію.

Для ізолятів, які підпадають під категорію А (патогени з високим ризиком, наприклад, Ебола, Марбург), необхідна спеціальна ліцензія та супровід сертифікованим персоналом. Менш небезпечні віруси транспортуються за категорією В згідно з кодом UN 3373.

Під час транспортування важливо забезпечити контроль температури. Для цього використовуються холодові акумулятори, сухий лід (-78°C) або контейнери з рідким азотом (-196°C), залежно від терmostійкості вірусу. Обов'язковим є моніторинг температури в реальному часі для забезпечення стабільності умов.

Окрім фізичних вимог, транспортування супроводжується повним пакетом документів, до якого входять: декларація про небезпечний вантаж, інструкції з безпеки, дані про відправника та отримувача, протокол умов транспортування, паспорт зразка, сертифікати якості.

Таким чином, транспортування вірусів вимагає дотримання багаторівневої системи безпеки, що охоплює підготовку зразка, правильне пакування, оформлення документації та постійний контроль умов зберігання — усе це гарантує безпеку, стабільність і достовірність у роботі з біологічними агентами.

Практична частина

Тема. Розробка інструкцій з безпечного транспортування вірусних ізолятів

Матеріали: нормативні документи ВООЗ (WHO), IATA (Dangerous Goods Regulations), ISO 15189, довідкова література з біобезпеки, зразки форм супровідної документації, приклади маркування небезпечних біологічних матеріалів.

Обладнання: комп'ютер з доступом до інтернету, програми для створення схем (Canva, PowerPoint, Lucidchart), зошит для записів, шаблони для друку етикеток і контейнерів (віртуальні або демонстраційні), інструкції для пакування біологічних зразків.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з правилами транспортування.

Примітка. Дотримання міжнародних стандартів транспортування біологічних агентів є критично важливим для запобігання розповсюдженню небезпечних патогенів, забезпечення безпеки персоналу та навколишнього середовища.

Хід роботи

1. Ознайомтесь із основними нормативними документами: IATA Dangerous Goods Regulations (розділ щодо Category A та Category B інфекційних речовин), WHO Guidance on the Transport of Infectious Substances, ISO 15189, ISO 9001, Національні правила транспортування патогенних біологічних агентів.

2. Вивчіть класифікацію вірусів за рівнем біологічної небезпеки (патогенність, потенційна шкода, потреба в захисних бар'єрах): група патогенності 1–4, визначення біологічного рівня безпеки (BSL).

Завдання 2. Виберіть сценарій транспортування.

Хід роботи

1. Оберіть один із запропонованих сценаріїв.

Наприклад:

Сценарій 1: транспортування вірусного ізоляту (вірус грипу H5N1) з дослідницької лабораторії в Києві до діагностичної лабораторії в Львові.

2. Опишіть характеристики транспортування:

- температурний режим: охолодження до +4 °C,
- метод: автотранспорт із холодильним відсіком,
- категорія небезпеки: Category B (UN3373).

Сценарій 2: транспортування небезпечного вірусу (наприклад, вірусу грипу високої патогенності) між двома лабораторіями в межах однієї установи.

Сценарій 3: міжнародне транспортування вірусного ізоляту для наукового співробітництва між двома країнами.

Завдання 3. Розробіть інструкцію з безпечного транспортування.

Пакування зразка

- **Первинний контейнер** — герметично закритий флакон або пробірка, стійка до протікання, розміщена в абсорбуючому матеріалі.
- **Вторинний контейнер** — жорсткий пластиковий або металевий контейнер, який захищає від механічних пошкоджень.
- **Третинний (зовнішній) контейнер** — коробка з маркуванням, термостійка, із температурними сенсорами (при необхідності), відповідно до вимог PI650 (IATA).

Маркування контейнерів

- Позначка UN3373 (Biological Substance, Category B)
- Вказівка "Handle with care / Refrigerated"
- Ідентифікаційний номер зразка, партії, дати, контактні дані відправника та одержувача
- Наклейка "Infectious substances", якщо використовується категорія A (UN2814/UN2900)

Умови транспортування:

- Температурний режим: +2...+8 °C
- Контроль температури за допомогою індикаторів або логерів
- Використання транспортного засобу з відсіком для біоматеріалів
- Доступ до вантажу обмежений та зафіксований у супровідному журналі

Супровідна документація:

- Паспорт безпеки (MSDS) для вірусного ізоляту
- Заява на транспортування біологічного матеріалу

- Лабораторний протокол відбору зразка
- Інструкція на випадок аварійної ситуації
- При міжнародному перевезенні — експортно-імпортні дозволи (формати: CDC Permit, Export Certificate)

Процедура розпакування:

1. Виконувати в біобезпеківій шафі класу II або III
2. Одягнути ЗІЗ (Засоби індивідуального захисту) — халат, маска, окуляри, рукавички
3. Перевірити цілісність тари та задокументувати температуру
4. Утилізувати зовнішнє пакування згідно з протоколами знешкодження (автоклавування або інфекційний контейнер)

5. Додати записи до журналу реєстрації ізолятів

Завдання 4. Розробіть сценарій дій у разі аварійної ситуації.

- **Пошкодження контейнера / розлив:** зона ізолюється, викликається персонал з біозахисту, дезінфекція відповідно до класу вірусу (розчин хлоргексидину, 70% етанол, автоклав), повідомлення відповідального за біобезпеку

- **Порушення температурного режиму:** аналіз часу порушення та температури, приймається рішення про повторне відбору зразка або його непридатність

Завдання 5. Візуалізуйте інструкцію.

Хід роботи

1. Побудуйте схему пакування у вигляді інфографіки: показати тришарову структуру упаковки; вказати маркування на кожному шарі
2. Додайте діаграму з температурними зонами зберігання: заморожені ізоляти (-20°C / -80°C); охолоджені ($+2\ldots+8^{\circ}\text{C}$); при кімнатній температурі ($15\ldots25^{\circ}\text{C}$)
3. Оформіть інструкцію як документ із текстовим описом і схемами.

Контрольні запитання

1. У чому полягає принцип кріоконсервації вірусів і які температурні режими використовуються для тривалого зберігання вірусних ізолятів?
2. Яку роль відіграють кріопротектори у процесі кріоконсервації, та які речовини найчастіше застосовують у цій ролі?
3. Опишіть механізм ліофілізації та вкажіть, які стабілізатори застосовують для збереження інфекційної активності вірусів під час сублімаційного висушування.
4. Які віруси краще зберігаються за допомогою ліофілізації, а які — за допомогою кріоконсервації? Від чого залежить вибір методу консервування?
5. Які обов'язкові відомості повинні бути зазначені на етикетці вірусовмісного препарату у лабораторії?
6. Які переваги забезпечує належний облік вірусних ізолятів у лабораторії для збереження якості досліджень і дотримання біобезпеки?
7. Назвіть ключові етапи систематичного аудиту колекції вірусів у лабораторії та їхнє значення.

8. У чому полягають принципи тришарового (триплексного) пакування при транспортуванні вірусних ізолятів?

9. Які категорії біологічної небезпеки вірусів виділяють при транспортуванні, та яка документація супроводжує ізоляти високого ризику?

10. Які заходи контролю температури застосовуються під час транспортування вірусів, і чому стабільність температурного режиму є критично важливою для збереження інфекційної активності?

ЧАСТИНА 2. МЕТОДИ ІНДИКАЦІЇ ТА ІДЕНТИФІКАЦІЇ ВІРУСІВ

Індикація та ідентифікація вірусів є ключовими етапами в сучасній вірусології, що забезпечують швидке виявлення збудників, оцінку їхньої інфекційної активності, визначення типу та серотипу вірусу, а також контроль за поширенням інфекцій. Розвиток методів діагностики вірусних інфекцій тісно пов'язаний із впровадженням високочутливих і специфічних технологій, які дозволяють не лише виявляти вірус у зразку, але й кількісно оцінювати його реплікаційну активність та імуногенність.

У цьому розділі практичної підготовки здобувачі вищої освіти ознайомляться з традиційними та сучасними методами індикації та ідентифікації вірусів, серед яких: оцінка цитопатичної дії в культурі клітин, реакції гемаглютинації та гемадсорбції, імунофлюоресцентний аналіз, електронна мікроскопія, методи ампліфікації нуклеїнових кислот (у тому числі ПЛР і її ізотермічні аналоги), реакції нейтралізації та імуноферментний аналіз.

Окрема увага приділяється електронномікроскопічним дослідженням і цифровому аналізу вірусних зображень за допомогою програмного забезпечення, а також інтерпретації результатів у контексті клінічної вірусології. Важливим елементом навчального процесу є вивчення кількісних методів оцінки вірусної інфекційності, зокрема методів підрахунку бляшок, визначення інфекційної та летальної дози, аналізу вірусних антигенів.

Під час практичних занять студенти здобудуть навички критичного порівняння ефективності різних методів діагностики, навчатимуться інтерпретувати результати лабораторних досліджень, а також опановуватимуть роботу з сучасними діагностичними й біоінформатичними інструментами. Активні дискусії, практичний аналіз зображень та робота з експериментальними даними сприятимуть формуванню компетентностей у сфері вірусологічної діагностики та біотехнологічного контролю інфекцій.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №6. Огляд основних методів індикації та ідентифікації вірусів

Мета: ознайомитися з основними методами індикації та ідентифікації вірусів, які застосовуються в лабораторній діагностиці вірусних інфекцій; вивчити принципи цитопатичної дії вірусів у культурі клітин, реакцій гемаглютинації та гемадсорбції, нейтралізації, кольорової проби, бляшкоутворення; проаналізувати можливості імуноферментного аналізу та імуноблотингу в підтвердженні вірусної природи збудника; сформуванню уявлення про чутливість, специфічність, переваги й обмеження кожного з

методів у контексті вірусологічних досліджень; навчитися критично оцінювати ефективність підходів до діагностики через участь у груповій дискусії.

Теоретичні відомості

1. Цитопатична дія вірусів у культурі клітин. Виявлення внутрішньоклітинних включень.
2. Реакція гемадсорбції.
3. Бляшкоутворення.
4. Кольорова проба.
5. Використання реакції гемаглютинації, реакції пригнічення гемаглютинації і біологічних моделей для індикації та ідентифікації вірусів.
6. Реакція нейтралізації вірусів *in vivo*.
7. Нейтралізація ЦПД. Нейтралізація гемадсорбції. Нейтралізація кольорової проби.
8. Імуноферментний аналіз.
9. Імуноблотинг

Цитопатична дія вірусів у культурі клітин. Виявлення внутрішньоклітинних включень

Цитопатична дія (ЦПД) — це морфологічні зміни, які виникають у клітинах внаслідок реплікації вірусу. Ці зміни можуть бути результатом прямого руйнування клітини, порушення метаболічних процесів або впливу вірусних білків. ЦПД є одним з найважливіших індикаторів інфекційності вірусного ізоляту і широко використовується для первинної індикації вірусів *in vitro*.

Серед основних типів цитопатичних змін — ущільнення клітин, утворення симпластів (злиття клітин), вакуолізація цитоплазми, утворення включень, деструкція клітинної мембрани, апоптоз. Ці зміни зазвичай виявляються за допомогою світлової або фазово-контрастної мікроскопії протягом 24–72 год після інфікування.

Внутрішньоклітинні включення — це скупчення вірусних частинок або вірусіндукованих білків у ядрі або цитоплазмі клітин. Їх можна виявити за допомогою гістохімічного або імуноцитохімічного фарбування. Прикладами є включення типу «сова» при інфекції цитомегаловірусом, внутрішньоядерні включення при герпесвірусних інфекціях або цитоплазматичні включення при сказі (тільця Негрі). Наявність характерних включень допомагає у диференційній діагностиці і може бути специфічним маркером певного вірусу.

Реакція гемадсорбції

Реакція гемадсорбції базується на здатності деяких вірусів індукувати експресію гемаглютининів на поверхні інфікованих клітин. Ці вірусні білки мають здатність зв'язувати еритроцити певних видів тварин, що й лежить в основі реакції. У присутності еритроцитів вони адсорбуються до мембрани інфікованої клітини, що можна легко спостерігати під мікроскопом або візуально за агрегацією еритроцитів.

Реакція проводиться шляхом інфікування клітинної культури підозрюваним вірусом. Через 24–48 год до клітин додаються суспензії

еритроцитів. Якщо вірус здатний індукувати гемаглютинін, відбувається специфічна адсорбція еритроцитів до клітинної поверхні. Цей ефект не спостерігається в неінфікованих клітинах, що забезпечує високу специфічність методу.

Найбільш типові віруси, що демонструють гемадсорбцію — віруси грипу, парагрипу, кори, міксу віруси. Метод є простим, швидким і чутливим, дозволяє ідентифікувати активну вірусну інфекцію навіть у разі відсутності вираженої ЦПД. Результати реакції можуть бути підтверджені нейтралізацією або імуноцитохімічними методами.

Бляшкоутворення

Метод бляшкоутворення використовується для виявлення і кількісної оцінки вірусної інфекційності шляхом візуалізації зон лізису (бляшок) у моношарі клітин, спричинених реплікацією вірусу. Цей метод вважається "золотим стандартом" для визначення титру вірусу, оскільки дозволяє точно підрахувати кількість інфекційних одиниць (PFU — plaque-forming units).

Суть методу полягає у внесенні серійних розведень вірусного матеріалу на моношар клітин і подальшому інкубуванні протягом 2–5 днів. Щоб запобігти поширенню вірусу у всій культурі, поверх клітин додають напівтверде середовище (наприклад, агар або метилцелюлозу), що обмежує дисемінацію вірусів тільки на сусідні клітини. Бляшки згодом візуалізують шляхом фарбування (нейтральний червоний, кристалічний фіолетовий) і підраховують вручну або за допомогою програмного забезпечення.

Кількість бляшок прямо пропорційна кількості інфекційно активного вірусу у зразку. Цей метод широко використовується у вірусології, вакцинології та фармакології для тестування противірусних засобів.

Кольорова проба

Кольорова проба є методикою, яка дозволяє виявляти вірусну інфекцію шляхом фарбування інфікованих клітин або колоній із проявами цитопатичної дії. Це не тільки полегшує візуалізацію морфологічних змін, але й допомагає кількісно оцінити ступінь ураження культури.

Серед найбільш вживаних барвників — нейтральний червоний, який дозволяє ідентифікувати живі клітини (що забарвлюються), у той час як мертві клітини залишаються безбарвними або прозорими. Інші варіанти включають трипановий синій, кристалічний фіолетовий або метиленовий синій.

Цей метод є особливо корисним для візуального визначення кількості інфікованих клітин при слабовираженій ЦПД або в роботі з вірусами, які не індукують гемадсорбцію. Застосовується для скринінгу противірусної активності препаратів, підрахунку вірусних бляшок, а також у тестах життєздатності клітин (наприклад, МТТ-тест).

Кольорова проба є простою, доступною і візуально інформативною методикою, яка підсилює ефективність морфологічного аналізу у вірусологічних дослідженнях.

Реакції гемаглютинації, пригнічення гемаглютинації та використання біологічних моделей

Гемаглютинація — це реакція агрегації еритроцитів під впливом вірусів, що мають гемаглютинуючі властивості. Багато вірусів, зокрема грипу, парагрипу, кори, здатні безпосередньо з'єднуватися з еритроцитами через гемаглютинінові білки на поверхні віріонів. Це дозволяє застосовувати гемаглютинаційний тест для виявлення вірусної активності.

Реакція пригнічення гемаглютинації (РПГА) використовується для ідентифікації вірусу або визначення рівня специфічних антитіл у сироватці. Якщо в сироватці є антитіла до гемаглютинінів вірусу, вони блокують агрегацію еритроцитів — це і є позитивною реакцією пригнічення.

Біологічні моделі, зокрема курячі ембріони та лабораторні тварини (миші, хом'яки), також широко застосовуються для індикації вірусів, особливо у випадках, коли культури клітин непридатні або вірус має складний тропізм. Ці моделі дозволяють оцінювати патогенність, летальність, реплікаційну активність і нейтралізуючу здатність антитіл.

У сукупності ці методи забезпечують чутливу і специфічну діагностику, дозволяють оцінювати імуногенність вірусів і слугують важливою ланкою у процесі розробки вакцин.

Реакція нейтралізації вірусів in vivo

Реакція нейтралізації *in vivo* є біологічним методом виявлення наявності специфічних антитіл або визначення ступеня захисту організму від певного вірусу. Її суть полягає в тому, що вірусна суспензія інкубується з тестовою сироваткою, після чого суміш вводиться лабораторним тваринам або курячим ембріонам. Якщо у сироватці є нейтралізуючі антитіла, вірус втрачає здатність спричиняти інфекцію, а тварини залишаються здоровими.

Цей метод застосовується для оцінки імуногенності вакцин, визначення рівня захисних антитіл у сироватці, а також для типування вірусів, які мають спільну антигенну будову. Як тест-системи використовують мишей, морських свинок, ембріоновані яйця. Важливим моментом є правильне дозування вірусу та контрольна група (без антитіл), що дозволяє визначити рівень летальності чи патологічних змін.

Реакція нейтралізації *in vivo* є чутливим і біологічно значущим методом, однак має певні обмеження: потреба в експериментальних тваринах, складність стандартизації, етичні аспекти. Тому в сучасній практиці її частково замінюють *in vitro* методами.

Нейтралізація ЦПД, гемадсорбції, кольорової проби

Нейтралізація ЦПД, гемадсорбції та кольорової проби — це модифікації реакції нейтралізації *in vitro*, які дозволяють визначити наявність віруснейтралізуючих антитіл без використання тварин. Основним принципом є інкубація вірусної суспензії з досліджуваною сироваткою та подальше інфікування клітинної культури.

Нейтралізація ЦПД: якщо антитіла в сироватці нейтралізують вірус, клітини зберігають нормальну морфологію, тоді як у контрольній пробі з вірусом розвивається характерна цитопатична дія. Цей тест є напівкількісним і дозволяє оцінити титр антитіл.

Нейтралізація гемадсорбції: після інфікування вірусом, що викликає гемадсорбцію, додають еритроцити. Якщо вірус був нейтралізований, еритроцити не адсорбуються. Таким чином, реакція дозволяє швидко оцінити ефективність антитіл.

Нейтралізація кольорової проби: застосовується для візуалізації ефекту за допомогою життєздатних барвників. Якщо вірус нейтралізовано, клітини залишаються життєздатними і фарбуються; якщо інфекція відбулась — клітини гинуть.

Ці методи широко використовуються у діагностиці, дослідженнях імуногенності, а також для контролю ефективності вакцинації. Вони є зручними, етичними та добре стандартизованими.

Імуноферментний аналіз (ІФА)

Імуноферментний аналіз (ІФА, англ. ELISA — enzyme-linked immunosorbent assay) — це чутливий і специфічний метод виявлення вірусних антигенів або антитіл у біологічних зразках. Його суть полягає у взаємодії антиген–антитіло з подальшим виявленням за допомогою ферментної мітки, яка каталізує реакцію утворення кольорового продукту.

ІФА може бути прямим (виявляє антигени) або непрямим (виявляє антитіла до вірусу). Основними компонентами є: твердий носій (мікропланшет), специфічні антитіла або антигени, ферментна мітка (наприклад, пероксидаза хрому), субстрат, що змінює колір під дією ферменту. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості цільової молекули.

ІФА широко застосовується у лабораторній діагностиці вірусних інфекцій (гепатити, ВІЛ, грип, ротавірус, COVID-19), скринінгу донорської крові, епідеміологічному моніторингу. Метод має високу автоматизованість, дозволяє обробляти великі серії зразків і забезпечує кількісну оцінку результатів.

Попри свою універсальність, ІФА має обмеження: можливі хибнопозитивні результати при наявності неспецифічних антитіл або автоантитіл, а також потребує стандартизації та відповідного контролю якості.

Імуноблотинг (імуноблот)

Імуноблотинг (англ. Western blot) — це метод виявлення специфічних вірусних білків або антитіл до них після розділення білкових компонентів за допомогою електрофорезу. Його застосовують для підтвердження серологічної діагностики, дослідження структури вірусів, контролю якості вакцин та антивірусних препаратів.

Процедура включає кілька етапів: електрофоретичне розділення білків у поліакриламідному гелі (англ. SDS-PAGE), перенесення білків на мембрану (PVDF або нітроцелюлозу), інкубація мембрани з первинними антитілами (специфічними до вірусного білка), обробка вторинними антитілами, кон'югованими з ферментом, та візуалізація сигналу.

Імуноблот дозволяє виявити окремі білкові компоненти вірусу, навіть у складній суміші. Завдяки високій специфічності, цей метод застосовується для верифікації ІФА, зокрема при ВІЛ-діагностиці, і визначення спектра імунної відповіді на вакцинацію.

Недоліками методу є відносна складність, потреба в спеціалізованому обладнанні, висока вартість реактивів і обмежена пропускна здатність. Проте його аналітична точність робить імуноблотинг цінним інструментом у сучасній вірусології.

Практична частина

Тема. Дискусія на тему «Який метод ідентифікації вірусів є найефективнішим?» (групова робота)

Матеріали: наукова література з вірусології, навчальні посібники, статті з баз даних PubMed, Scopus, платформи для створення презентацій (PowerPoint, Canva), картки з описом методів, формуляри для порівняльного аналізу, бланки для запису результатів дискусії.

Обладнання: комп'ютер або планшет, мультимедійний проєктор, фліпчарт або дошка, маркери, роздаткові матеріали (таблиці з порівняльними характеристиками методів), інтернет-доступ для пошуку джерел.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Виберіть і дослідіть методи ідентифікації вірусів.

Примітка. Різні вірусологічні методи мають свої переваги залежно від умов, у яких вони застосовуються, типу вірусу, ресурсного забезпечення лабораторії та мети дослідження. Вивчення методів дозволяє обґрунтовано обрати оптимальний підхід до ідентифікації вірусів.

Хід роботи

1. У складі групи оберіть один метод із переліку: реакція нейтралізації вірусів *in vivo*, ЦПД, нейтралізація гемадсорбції, нейтралізація кольорової проби, ІФА, імуноблотинг (Western blot), імунофлуоресценція, полімеразна ланцюгова реакція (PCR/RT-PCR).

2. Опрацюйте джерела інформації щодо: принципу дії методу, точності, чутливості, специфічності, витрат часу та фінансових ресурсів, сфери застосування (клінічна діагностика, наукові дослідження, польові умови), обмежень і переваг.

3. Зробіть короткі нотатки для презентації результатів у групі.

Завдання 2. Презентуйте результати дослідження методу.

Хід роботи

1. Підготуйте коротку усну презентацію або інфографіку (3–5 хв): назва методу, суть методу (як працює), де і коли використовується, основні переваги та недоліки, приклади вірусів, для яких метод є ефективним

2. Виступіть перед групою, подайте візуальні матеріали (слайд, схема, картка), поясніть принцип і ключові характеристики методу.

3. Візьміть участь в обговоренні: відповідайте на запитання, порівнюйте свій метод з іншими, аргументуйте свої висновки.

Завдання 3. Групова дискусія: обґрунтуйте найефективніший метод.

Примітка. Колективний аналіз дозволяє об'єктивно порівняти різні методи ідентифікації вірусів за вибраними критеріями та обрати оптимальний залежно від цілей діагностики.

Хід роботи

1. Разом із групою визначте критерії для оцінювання методів, наприклад: точність, чутливість, специфічність, швидкість, вартість, лабораторна доступність, можливість використання в польових умовах

2. Проведіть порівняльний аналіз методів за кожним із критеріїв:

- вкажіть, які методи краще підходять для експрес-діагностики,
- які — для досліджень у референс-лабораторіях,
- які — у складних польових умовах або при обмежених ресурсах.

3. Обговоріть можливість комбінованого застосування методів для підвищення точності результатів.

Завдання 4. Сформулюйте узагальнюючі висновки.

Хід роботи

1. Разом сформулюйте колективний висновок, в якому:

- назвіть метод, який був визнаний найефективнішим за сукупністю критеріїв,
- обґрунтуйте це рішення (наприклад, PCR як золотий стандарт через високу чутливість і точність).,
- визначте, для яких умов інші методи можуть бути більш доречними.

2. Складіть рекомендації для різних сценаріїв (польова діагностика, клінічна лабораторія, епідеміологічне спостереження тощо).

Завдання 5. Підготуйте фінальну презентацію/звіт.

Хід роботи

1. Підготуйте узагальнюючу презентацію або звіт, що містить:

- назви методів та їх короткий опис,
- порівняльну таблицю за критеріями,
- колективний висновок з обґрунтуванням,
- візуальні матеріали: інфографіку, схеми, діаграми.

2. Проведіть фінальну презентацію перед усією групою, обґрунтуйте свій вибір, відповідайте на запитання аудиторії.

Контрольні запитання

1. Що таке ЦПД і які механізми її виникнення в інфікованих вірусом клітинах?

2. Які морфологічні ознаки свідчать про наявність цитопатичної дії в культурі клітин, заражених вірусом?

3. Назвіть основні типи ЦПД, які можуть спостерігатися при вірусній інфекції в клітинній культурі.

4. Якими методами візуалізують цитопатичні зміни клітин, спричинені вірусом? У чому їхні переваги?

5. Що таке внутрішньоклітинні включення і яку роль вони відіграють у діагностиці вірусних інфекцій?

6. Наведіть приклади вірусів, які формують характерні внутрішньоклітинні включення, і опишіть їх морфологію.

7. Якими методами можна виявити внутрішньоклітинні включення? У чому полягає роль імуноцитохімічного аналізу в цьому процесі?

8. Як пов'язані наявність включень у клітинах і механізми реплікації вірусів?

9. Чому ЦПД вважається важливим первинним методом індикації вірусів *in vitro* і які його обмеження?

10. У яких випадках цитопатична дія може бути відсутньою, незважаючи на реплікацію вірусу, і як це впливає на діагностичний підхід?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №7. Використання електронної мікроскопії у вірусологічних дослідженнях

Мета: ознайомитися з основними методами електронної мікроскопії, що застосовуються у вірусологічних дослідженнях; опанувати принципи контрастування вірусних препаратів та підготовки ультратонких зрізів; розглянути можливості кріоелектронної та імуноелектронної мікроскопії для візуалізації вірусних структур; навчитися інтерпретувати електронномікроскопічні зображення вірусних частинок; здобути практичні навички цифрового аналізу мікроскопічних зображень за допомогою програмного забезпечення ImageJ.

Теоретичні відомості

1. Методи контрастування препаратів вірусів.
2. Метод ультратонких зрізів.
3. Кріоелектронна мікроскопія.
4. Імуноелектронна мікроскопія
5. Інтерпретація результатів електронної мікроскопії.

Методи контрастування препаратів вірусів

Електронна мікроскопія (ЕМ) дозволяє безпосередньо візуалізувати вірусні частинки завдяки значно вищій роздільній здатності порівняно зі світловою мікроскопією. Однак більшість біологічних структур, включно з вірусами, мають низьку електронну щільність і тому погано взаємодіють з електронним пучком. Щоб підвищити контрастність зображення, застосовують спеціальні методи контрастування.

Контрастування може бути позитивним або негативним. **Негативне контрастування** є найпоширенішим у вірусології: препарат змішують з електронно-щільним барвником (наприклад, ураніл ацетатом, фосфорно-вольфрамовою кислотою або цитратом свинцю), який заповнює простір навколо вірусної частинки, залишаючи саму частинку світлішою на темному фоні. Цей метод забезпечує добру візуалізацію зовнішньої морфології віріонів і підходить для аналізу розміру, форми, симетрії та наявності оболонки.

Позитивне контрастування, натомість, передбачає фарбування внутрішніх структур вірусу. Його застосовують рідше через складність методики та ризик ушкодження зразка.

Також у вірусології використовуються методи тінювання (напилення металів, таких як платина або вольфрам під кутом) для вивчення топографії

частинок, а також фіксації з осаджуючими агентами (глутаральдегід, осмієвий тетраоксид), які стабілізують структуру віріонів перед дослідженням. Якісне контрастування є критично важливим етапом підготовки препарату, оскільки визначає чіткість, деталізацію та інтерпретованість результатів електронної мікроскопії.

Метод ультратонких зрізів

Метод ультратонких зрізів є основним способом отримання детального зображення вірусів у контексті клітинної або тканинної структури. Він передбачає фіксацію зразка, його зневоднення, заливку у пластичну смолу (наприклад, епоксидну), нарізання ультратонких зрізів (50–100 нм) за допомогою ультрамікротома та подальше контрастування для електронної мікроскопії.

Фіксація проводиться комбінацією глутаральдегіду (для стабілізації білків) та осмієвого тетраоксиду (для збереження ліпідних мембран), після чого зразок проходить через серії спиртів або ацетону для дегідратації. Далі зразок інфільтрується пластиком і твердне в спеціальних формах.

Ультратонкі зрізи отримують за допомогою алмазного або скляного ножа, закріпленого в ультрамікротомі. Зрізи переносять на сітки з мідної фольги, які потім контрастують важкими металами — ураніл ацетатом (забарвлює нуклеїнові кислоти) та цитратом свинцю (забарвлює білки).

Цей метод дозволяє візуалізувати віруси у внутрішньоклітинному середовищі, зокрема в органелах, ядрах, цитоплазмі. З його допомогою можна простежити стадії вірусного життєвого циклу — адсорбцію, ендоцитоз, реплікацію, збірку та екзоцитоз. Метод ультратонких зрізів незамінний у фундаментальній вірусології, патоморфології, а також у дослідженні механізмів вірус-опосередкованої цитопатичної дії.

Кріоелектронна мікроскопія

Кріоелектронна мікроскопія (кріо-ЕМ) є інноваційним методом візуалізації біомолекул, який дозволяє отримувати зображення вірусних частинок у їхньому природному (гідратованому) стані без необхідності фарбування чи фіксації. Зразок миттєво заморожується у рідкому етані або пропані при наднизьких температурах (близько -180°C) та зберігається у склоподібному (вітрифікованому) стані. Це запобігає утворенню кристалів льоду, які можуть пошкодити структури.

Кріо-ЕМ має декілька форматів:

- **Одинична частинка (англ. single particle analysis, SPA)** — дозволяє реконструювати 3D-структуру віріону з високою роздільною здатністю.
- **Кріо-томографія (англ. cryo-ET)** — дає змогу вивчати вірусні частинки в клітинному контексті без фізичного зрізування.
- **Кріо-електронна дифракція** — застосовується для аналізу кристалізованих вірусних білків.

Кріоелектронна мікроскопія не потребує контрастування важкими металами, тому дозволяє отримувати високоінформативні зображення із збереженням нативної структури. Цей метод широко використовується для

дослідження структури вірусних капсидів, глікопротеїнів, ферментів, а також для вивчення механізмів взаємодії вірусу з антитілами або рецепторами клітин.

Основними перевагами кріо-ЕМ є відсутність артефактів фіксації, надвисока роздільна здатність (до 2–3 Å), можливість 3D-реконструкції. Сьогодні цей метод є «золотим стандартом» для структурної вірусології та вірусного дизайну вакцин.

Імуноелектронна мікроскопія

Імуноелектронна мікроскопія поєднує специфічність імуноцитохімічних методів з високою роздільною здатністю електронної мікроскопії. Основною метою цього підходу є виявлення локалізації вірусних антигенів у клітинах або тканинах з використанням специфічних антитіл, мічених електронно-щільними маркерами — найчастіше золотими наночастинками.

Існує два основних підходи:

- Пре-ембедіювання: антитіла наносяться на зразок до його заливки в смолу.
- Пост-ембедіювання: антитіла додаються після виготовлення зрізів, що забезпечує кращий доступ до епітопів.

Після зв'язування первинних антитіл із вірусними білками, додають вторинні антитіла, кон'юговані з колоїдним золотом. Частинки золота візуалізуються в електронному мікроскопі як щільні темні точки, що дозволяє точно визначити локалізацію вірусних компонентів у субклітинному просторі.

Імуноелектронна мікроскопія є потужним інструментом для вивчення взаємодії вірусів із клітинами, механізмів проникнення, реплікації, формування віріонів, верифікації присутності вірусу в складних біологічних зразках. Вона широко використовується у патоморфології, фармакологічних дослідженнях і в розробці вакцин.

Інтерпретація результатів електронної мікроскопії

Інтерпретація електронномікроскопічних зображень вимагає високої фахової підготовки, знання морфології вірусів та досвіду у розрізненні вірусних структур від клітинних компонентів. Основна мета аналізу — ідентифікація вірусних частинок, оцінка їх морфологічних характеристик (розмір, симетрія, наявність оболонки), стадій життєвого циклу, локалізації в клітині, а також можливих патологічних змін, які вони спричиняють.

Для верифікації результатів застосовують:

- порівняння з референтними зображеннями відомих вірусів;
- морфометричний аналіз (наприклад, за допомогою програмного забезпечення ImageJ);
- імуномаркування (у випадку імуноелектронної мікроскопії);
- аналіз взаємозв'язку з цитопатичною дією у клітинній культурі.

Особливу увагу приділяють оцінці наявності артефактів, які можуть виникати через неправильну фіксацію, недостатнє контрастування, механічні пошкодження під час підготовки. Важливо також диференціювати вірусні частинки від клітинних везикул, лізосом або інших субклітинних структур.

Завдяки електронній мікроскопії можливо отримати візуальний доказ присутності вірусу, що є цінним у діагностиці нових або

складно ідентифікованих патогенів, при вивченні структури віріонів і взаємодії з клітинними мембранами. У поєднанні з іншими методами (ІФА, ПЛР, мас-спектрометрією) ЕМ забезпечує комплексне уявлення про морфологію та біологію вірусів.

Практична частина

Тема. Аналіз електронномікроскопічних зображень вірусних частинок за допомогою програмного забезпечення ImageJ

Матеріали: електронномікроскопічні зображення вірусів (у форматах JPEG, PNG, TIFF), шкала масштабу на зображенні, наукові публікації з морфології вірусів, довідкові таблиці розмірів вірусів.

Обладнання: комп'ютер з встановленим програмним забезпеченням ImageJ, доступ до інтернету (для порівняння з літературними джерелами), калькулятор, таблиці для запису результатів, довідкові матеріали з вірусології, ручка/олівець.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Завантажте електронномікроскопічне зображення вірусів.

Примітка. Програма ImageJ дозволяє здійснювати морфометричний аналіз зображень, зокрема визначати розміри та форму вірусних частинок, ґрунтуючись на масштабі та пороговому контрасті.

Хід роботи

1. Запустіть ImageJ.
2. Відкрийте зображення: File > Open > вибрати файл.
3. Переконайтесь, що зображення чітке та містить достатню кількість вірусних частинок.

Завдання 2. Відкалібруйте зображення.

Примітка. Калібрування дозволяє перевести пікселі зображення у реальні одиниці виміру (нм, мкм).

Хід роботи

1. Виміряйте масштабну лінію (Straight Line Tool).
2. Analyze > Set Scale.
3. Введіть відому довжину (наприклад, 100 нм) та одиниці (nm).
4. Натисніть ОК.

Завдання 3. Підготуйте зображення для аналізу.

Примітка. Попередня обробка зображення (контраст, яскравість, порогове виділення) підвищує точність виявлення частинок.

Хід роботи

1. Image > Adjust > Brightness/Contrast — налаштуйте параметри.
2. Image > Adjust > Threshold — виділіть частинки.
3. Натисніть Apply.

Завдання 4. Виміряйте розміри вірусних частинок.

Примітка. ImageJ аналізує виділені частинки за площею, діаметром, периметром та круглістю.

Хід роботи

1. Analyze > Analyze Particles.
2. Вкажіть параметри: Size: 0.01–5 μm^2 , Circularity: 0.3–1.0
3. Поставте галочки: Display Results, Summarize, Add to Manager (за потреби)
4. Натисніть ОК — отримаєте таблицю з результатами.

Завдання 5. Проаналізуйте морфологію вірусних частинок.

Примітка. Морфометричні характеристики частинок дають уявлення про форму, симетрію капсиду та ступінь гомогенності зразка.

Хід роботи

1. Перегляньте дані у Results.
2. Проаналізуйте симетрію (кубічна, спіральна тощо).
3. Визначте форму (сферична, паличкоподібна, ікосаедрична).
4. Збільшіть зображення для детального перегляду частинок.

Завдання 6. Проведіть татистичний аналіз.

Примітка. Статистична обробка результатів дозволяє об'єктивно охарактеризувати вибірку частинок.

Хід роботи

1. Analyze > Summarize.
2. Отримайте середнє значення площі, діаметра, стандартне відхилення.
3. За потреби збережіть таблицю результатів.

Завдання 7. Порівняйте отримані дані з літературними джерелами.

Примітка. Порівняння морфологічних характеристик із довідковими даними дозволяє встановити тип вірусу або підтвердити ідентифікацію.

Хід роботи

1. Знайдіть літературні дані про досліджуваний вірус.
2. Порівняйте розміри, форму, симетрію.
3. Оцініть відповідність отриманих даних.

Завдання 8. Оформіть результати.

Хід роботи

1. Збережіть зображення з виділеними частинками: File > Save As.
2. Збережіть таблиці: File > Save As.
3. Закрийте програму ImageJ.
4. Оформіть результати у вигляді таблиці:

№	Діаметр частинки (нм)	Площа (нм ²)	Круглість	Форма капсиду	Тип симетрії
1					
2					
...					
Середнє	...	...	...	...	...

Завдання 9. Зробіть висновки.

Контрольні запитання

1. Які фізико-хімічні властивості вірусних частинок ускладнюють їх візуалізацію за допомогою електронної мікроскопії, і яку роль при цьому відіграють методи контрастування?
2. У чому полягає принцип негативного контрастування у вірусологічних дослідженнях та які електронно-щільні барвники найчастіше застосовуються для цієї мети?
3. Які переваги та обмеження має позитивне контрастування при підготовці вірусних препаратів до електронної мікроскопії?
4. Поясніть суть методу тінювання та у яких випадках його доцільно застосовувати при вивченні морфології вірусів.
5. У чому полягає технологічна послідовність методу ультратонких зрізів та які типи фіксації і контрастування використовують на кожному з етапів?
6. Які особливості має кріоелектронна мікроскопія, що відрізняє її від традиційних методів ЕМ, і які структурні характеристики вірусів вона дозволяє аналізувати?
7. Опишіть основні формати кріо-ЕМ (SPA, кріо-томографія, електронна дифракція) та їх значення для вірусології.
8. Як функціонує імуноелектронна мікроскопія: які типи антитіл і міток використовуються, і яку інформацію вона дозволяє отримати щодо вірусної інфекції?
9. Які фактори слід враховувати при інтерпретації електронномікроскопічних зображень вірусів, щоб уникнути помилок у диференціації вірусних частинок від клітинних структур або артефактів?
10. Які переваги надає поєднання електронної мікроскопії з іншими методами вірусологічного аналізу (ІФА, ПЛР, імуноцитохімія) у комплексній діагностиці вірусних інфекцій?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №8. Використання реакції імунофлуоресценції у вірусологічних дослідженнях

Мета: ознайомитися з принципами дії реакції імунофлуоресценції як методу виявлення вірусних антигенів у клітинному або тканинному матеріалі; вивчити різновиди імунофлуоресцентного аналізу (пряма та непряма ІФ), їх переваги, обмеження та сферу застосування у вірусологічній діагностиці; розглянути техніку постановки реакції з урахуванням вимог до підготовки препаратів і вибору флуоресцентно мічених антитіл; навчитися інтерпретувати результати імунофлуоресцентного аналізу; здобути практичні навички цифрової обробки й аналізу зображень флуоресцентної мікроскопії з використанням програмного забезпечення ImageJ.

Теоретичні відомості

1. Принцип і різновиди методу імунофлуоресценції.
2. Техніка постановки реакції імунофлуоресценції.

3. Переваги і недоліки реакції імунофлуоресценції.
4. Використання методу у діагностиці вірусних захворювань.

Принцип і різновиди методу імунофлуоресценції

Імунофлуоресценція — це високочутливий метод візуалізації вірусних антигенів у клітинному чи тканинному матеріалі на основі специфічної взаємодії антигену з антитілом, міченим флуорохромом. Основу методу становить здатність певних речовин (флуорохромів) поглинати світло однієї довжини хвилі (збуджуюче випромінювання) і випромінювати світло іншої, довшої довжини хвилі — флуоресценцію. Прикладами флуорохромів, що широко використовуються, є флуоресцеїн ізотіоціанат (FITC), родамін, Alexa Fluor тощо.

Існує два основних різновиди методу: **пряма імунофлуоресценція (ПІФ)** і **непряма імунофлуоресценція (НІФ)**. У ПІФ застосовуються антитіла, безпосередньо мічені флуорохромом, які зв'язуються з вірусним антигеном у зразку. Метод є швидким і менш трудомістким, проте менш чутливим. У НІФ первинні антитіла (немічені) взаємодіють із вірусним антигеном, а потім додаються вторинні флуорохром-марковані антитіла, які розпізнають Fc-фрагмент первинного антитіла. Такий підхід забезпечує посилення сигналу і є більш чутливим.

Окрім класичної флуоресценції, існують й інші модифікації: мультиплексна імунофлуоресценція (для одночасного виявлення кількох антигенів), конфокальна мікроскопія (для 3D-візуалізації) та супервисокороздільна флуоресценція (STED, SIM), які відкривають нові можливості в аналітичній вірусології.

Техніка постановки реакції імунофлуоресценції

Постановка імунофлуоресцентної реакції включає кілька етапів: фіксацію зразка, інкубацію з антитілами, промивання, візуалізацію за допомогою флуоресцентного мікроскопа та інтерпретацію отриманих зображень. Зразком може бути клітинна культура, мазок, тонкий зріз тканини або відбиток біоптату.

На початку проводиться фіксація клітин або тканин — зазвичай холодним ацетоном або параформальдегідом. Вибір фіксатора залежить від збереження епітопів і структури клітини. Далі виконується інкубація з первинними антитілами (у випадку НІФ) або безпосередньо з міченими антитілами (ПІФ), зазвичай протягом 30–60 хвилин при кімнатній температурі або в холодильнику.

Після промивань (часто буфером PBS із додаванням Tween 20) додаються вторинні антитіла (у НІФ), мічені флуорохромом. На завершальному етапі препарат монтується в середовище з антифотоблідниками (наприклад, DAPI або Mounting Medium) і аналізується за допомогою флуоресцентного мікроскопа з відповідними фільтрами.

Ключовими умовами успішної реакції є: оптимальна концентрація антитіл, якість фіксації, правильний вибір флуорохрому, контроль неспецифічного зв'язування (використання блокуючих агентів) та відповідне програмне забезпечення для аналізу зображень (наприклад, ImageJ або CellProfiler).

Переваги і недоліки реакції імунофлуоресценції

Імунофлуоресценція має низку переваг, що обумовлюють її широке застосування у вірусології та діагностиці вірусних інфекцій. Основною перевагою методу є висока специфічність завдяки використанню моноклональних або поліклональних антитіл, здатних розпізнавати конкретні вірусні антигени. Також метод забезпечує високу чутливість, особливо в непрямому варіанті, що дозволяє виявляти навіть незначні кількості вірусу в зразку.

До переваг належать:

- можливість візуалізації локалізації вірусу в клітині (ядерна, цитоплазматична, мембранна);
- швидкість отримання результатів (до 1–2 годин);
- можливість мультиплексного аналізу (одночасне виявлення кількох вірусів або вірус–клітинних маркерів).

Недоліки включають:

- потребу у спеціалізованому флуоресцентному мікроскопі;
- ризик фотоблякнення (вицвітання сигналу під час огляду);
- неспецифічне зв'язування антитіл, що може призводити до хибнопозитивних результатів;
- необхідність досвіду в інтерпретації флуоресцентних зображень.

Попри недоліки, імунофлуоресценція залишається одним із провідних методів якісного виявлення вірусних антигенів завдяки своїй простоті, швидкості та інформативності.

Використання методу у діагностиці вірусних захворювань

Імунофлуоресценція широко використовується у лабораторній діагностиці вірусних інфекцій, особливо респіраторних, герпесвірусних, ентеровірусних і нейроінфекцій. Завдяки високій специфічності та здатності до локалізації вірусних антигенів на рівні клітини метод дозволяє швидко і точно виявляти патоген.

Класичними прикладами застосування ІФА є:

- діагностика вірусів грипу, RSV, аденовірусів, парагрипу у мазках з носоглотки;
- виявлення герпесвірусу або цитомегаловірусу в біоптатах та мазках;
- підтвердження вірусного ураження мозку при інфекційному енцефаліті (через аналіз спинномозкової рідини або зрізів мозкової тканини);
- виявлення вірусу сказу шляхом детекції тілець Негрі або вірусних антигенів у мозковій тканині тварин.

Також метод використовується для вивчення патогенезу вірусних інфекцій, оцінки ефективності антивірусної терапії, моніторингу вакцинальних відповідей та в наукових дослідженнях з вірусної цитопатичності.

У поєднанні з іншими імунологічними методами, такими як ELISA, імунофлуоресценція забезпечує комплексний підхід до діагностики, дозволяє відрізнити гостру інфекцію від хронічної або персистуючої, і має високу цінність у клінічній та ветеринарній вірусології.

Практична частина

Тема. Аналіз зображень імунофлуоресценції (підрахунок відсотка інфікованих вірусом клітин) за допомогою програмного забезпечення ImageJ

Матеріали: імунофлуоресцентні мікрофотографії клітин у форматах JPEG/PNG/TIFF із двома каналами (синій — ядра клітин, зелений — вірусна інфекція), літературні джерела з морфології клітин та методів імунофлуоресцентного аналізу, шкала зображення.

Обладнання: комп'ютер з встановленою програмою ImageJ, миша, блокнот для записів, калькулятор, довідкові таблиці розмірів клітин та критерії оцінки інфекції.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Завантажте та попередньо обробіть зображення.

Примітка. ImageJ дозволяє проводити кількісний аналіз зображень, зокрема розділення каналів флуоресценції та підрахунок об'єктів на основі заданих морфометричних параметрів.

Хід роботи

1. Запустіть ImageJ.
2. Відкрийте зображення: File > Open.
3. Переконайтесь у наявності двох флуоресцентних каналів: синій (ядра) і зелений (інфіковані клітини).
4. За потреби налаштуйте яскравість і контраст: Image > Adjust > Brightness/Contrast.
5. Для розділення каналів виберіть: Image > Color > Split Channels.

Завдання 2. Підрахуйте загальну кількість клітин.

Примітка. За допомогою синього каналу (DAPI-мітка ядер) обчислюється загальна кількість клітин у полі зору.

Хід роботи

1. Виберіть зображення синього каналу.
2. Якщо зображення не каліброване, задайте масштаб: Analyze > Set Scale.
3. Перейдіть до Analyze > Analyze Particles.
4. Вкажіть розмір частинок: Size (наприклад, 50–400 μm^2) та Circularity (0.50–1.00).
5. Поставте галочки:
 - Display Results
 - Summarize
6. Натисніть OK — отримаєте кількість ядер клітин.

Завдання 3. Підрахуйте кількість інфікованих клітин.

Примітка. Визначення кількості клітин, що мають зелену флуоресцентну мітку (ознака вірусної інфекції).

Хід роботи

1. Виберіть зображення зеленого каналу.
2. Задайте масштаб (якщо не зроблено раніше).

3. Analyze > Analyze Particles.

4. Встановіть параметри:

○Size (наприклад, 50–400 μm^2)

○Circularity (0.50–1.00)

5. Поставте галочку Display Results.

6. Натисніть ОК — отримайте кількість інфікованих клітин.

Завдання 4. Обчисліть відсоток інфікованих клітин.

Примітка. Визначення частки інфікованих клітин у вибірці дозволяє оцінити ефективність зараження та ступінь вірусної інвазії.

Хід роботи

1. З використанням отриманих чисел обчисліть:

Відсоток інфікованих клітин = $\left(\frac{\text{Кількість інфікованих клітин}}{\text{Загальна кількість клітин}} \right) \times 100\%$

2. Зафіксуйте результат у таблиці.

Завдання 5. Збережіть та задокументуйте результати.

Хід роботи

1. Збережіть оброблені зображення: File > Save As.

2. Збережіть таблиці результатів: Results > File > Save As.

3. Занотуйте параметри, використані для аналізу, у робочому зошиті або звіті.

Параметр	Значення
Загальна кількість клітин	...
Кількість інфікованих клітин	...
Відсоток інфікованих клітин (%)	...

Завдання 6. Зробіть висновки.

Контрольні запитання

1. У чому полягає фізичний принцип методу імунофлуоресценції та яке явище лежить в його основі?

2. Які флуорохроми найчастіше використовуються для мічення антитіл у методі імунофлуоресценції та які їхні характеристики?

3. Чим відрізняється пряма імунофлуоресценція від непрямой за принципом дії, чутливістю та кількістю стадій?

4. У яких випадках доцільніше використовувати непряму імунофлуоресценцію замість прямої?

5. Які переваги надає використання вторинних антитіл у непрямій імунофлуоресценції?

6. Що таке мультиплексна імунофлуоресценція та яку інформацію вона дозволяє отримати в одному дослідженні?

7. У чому полягає перевага конфокальної мікроскопії порівняно зі звичайною флуоресцентною мікроскопією при проведенні ІФА?

8. Які особливості мають методи супервисокороздільної флуоресценції (STED, SIM) у вірусологічних дослідженнях?

9. Які обмеження можуть виникати при застосуванні імунофлуоресценції для виявлення вірусів *in situ*?

10. Як впливає вибір типу антитіла та флуорохрому на специфічність і результативність імунофлуоресцентного дослідження?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №9. Використання методів ампліфікації нуклеїнових кислот у вірусологічних дослідженнях

Мета: ознайомитися з основними методами ампліфікації нуклеїнових кислот, що застосовуються у сучасних вірусологічних дослідженнях; вивчити принципи дії полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (RT-PCR) та ізотермічних методів ампліфікації (NEAR, LAMP, TMA, HDA, SDA); з'ясувати роль молекулярної діагностики на основі NAATs у виявленні та ідентифікації вірусних інфекцій; порівняти аналітичні можливості класичних і новітніх підходів ампліфікації; сформувати практичні навички критичного аналізу ефективності, чутливості та специфічності різних методів ампліфікації нуклеїнових кислот у вірусологічній практиці.

Теоретичні відомості

1. Різновиди методів ампліфікації нуклеїнових кислот, принципи і застосування для індикації та ідентифікації вірусів.

2. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) зі зворотною транскрипцією.

3. Ізотермічна ампліфікація.

Різновиди методів ампліфікації нуклеїнових кислот: принципи і застосування для індикації та ідентифікації вірусів

Методи ампліфікації нуклеїнових кислот (nucleic acid amplification tests, NAATs) — це група молекулярно-біологічних методів, які дають змогу значно збільшити кількість специфічних фрагментів ДНК або РНК вірусу, що дозволяє виявити навіть мізерні кількості збудника в клінічному матеріалі. Ці методи є основою сучасної лабораторної діагностики вірусних інфекцій завдяки високій чутливості, специфічності та швидкості отримання результату.

Застосування NAATs охоплює виявлення гострих вірусних інфекцій (грип, SARS-CoV-2, ВІЛ, вірусні гепатити, герпесвіруси), ідентифікацію збудника при низькому вірусному навантаженні, моніторинг антивірусної терапії, скринінгові дослідження, типування вірусів. Класичним представником є полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), однак нині активно впроваджуються ізотермічні методи, що дозволяють проводити ампліфікацію без складного обладнання.

Кожен метод має свої переваги та обмеження. Наприклад, ПЛР вимагає термоциклера, тоді як ізотермічні тести можуть проводитись у польових умовах. Загалом, вибір конкретної технології залежить від клінічної задачі, типу вірусу, ресурсу лабораторії та необхідного часу діагностики.

Полімеразна ланцюгова реакція зі зворотною транскрипцією

RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) — це золотий стандарт у молекулярній вірусології для виявлення РНК-вірусів. Метод базується на двох ключових етапах: 1) зворотна транскрипція, під час якої РНК вірусу перетворюється на комплементарну ДНК (кДНК) за допомогою зворотної транскриптази, та 2) ампліфікація утвореної кДНК у ланцюговій реакції з використанням термостабільної ДНК-полімерази.

RT-PCR дозволяє виявити з високою точністю такі РНК-віруси, як SARS-CoV-2, вірус грипу, вірус гепатиту С, ентеровіруси, вірус сказу тощо. Для візуалізації результатів застосовують гель-електрофорез, флуоресцентні зонди або інтеркалюючі барвники (SYBR Green), особливо в режимі реального часу (qRT-PCR), який забезпечує кількісну оцінку вірусного навантаження.

Переваги RT-PCR — висока чутливість (виявлення <10 копій РНК), специфічність, швидкість (2–3 години). Метод широко використовується у ветеринарній, медичній та промисловій діагностиці, зокрема для скринінгу продукції тваринництва та контролю біобезпеки в аграрному секторі.

Ізотермічна ампліфікація: NEAR, LAMP, TMA, HDA, CRISPR, SDA

NEAR (Nicking Endonuclease Amplification Reaction)

Цей метод базується на використанні ферментів, що розрізають тільки один ланцюг ДНК (nicking-ендонуклеаз), активуючи послідовне синтезування нового ланцюга полімеразою без потреби температурної денатурації. Ампліфікація проходить при постійній температурі (близько 55–60 °C), що спрощує технічне забезпечення.

NEAR використовується для експрес-діагностики, наприклад, COVID-19. Час реакції — до 15 хвилин. Метод зручний для польової вірусології, однак потребує дуже ретельної оптимізації системи, щоб уникнути неспецифічного фону.

LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification). LAMP — потужний ізотермічний метод, який використовує 4–6 спеціально підібраних праймерів і фермент з активністю переміщення ланцюга. Реакція проходить за температури 60–65 °C, формуючи характерні петлеві структури, що забезпечують експоненціальне нарощення ДНК.

LAMP швидко виявляє РНК- та ДНК-віруси, зокрема вірус Зіка, SARS-CoV-2, гепатити. Може поєднуватися з флуоресцентними або турбідиметричними детекторами. Метод є простим, доступним, але складним у дизайні праймерів.

TMA (Transcription-Mediated Amplification). TMA — високо чутливий метод ампліфікації РНК, що імітує природні процеси транскрипції. Включає два ферменти: зворотну транскриптазу і РНК-полімеразу, які багаторазово синтезують РНК-копії цільової послідовності.

TMA використовується для виявлення ВІЛ, HBV, HCV. Його переваги — висока швидкість, ізотермічність (42–45 °C), висока чутливість (до 1 копії РНК), але є залежність від складних реагентів і висока вартість.

HDA (Helicase-Dependent Amplification). Метод, що імітує природне розділення ланцюгів ДНК за допомогою гелікази — ферменту, що «розплітає»

дволанцюгову ДНК. Не потребує денатурації температурою, бо реакція відбувається при 37–65 °С.

HDA має потенціал для швидкої детекції вірусів у клінічних зразках, однак відрізняється меншою стабільністю, складною оптимізацією та обмеженим спектром застосування.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats). CRISPR-технології в ампліфікації вірусної ДНК/РНК використовують нуклеази Cas (наприклад, Cas12, Cas13), які після розпізнавання цільової послідовності активуються і розрізають флуоресцентно-марковані репортери. Метод часто поєднується з попередньою ампліфікацією (RPA або LAMP).

CRISPR-системи демонструють надзвичайну чутливість, специфічність до 1 нуклеотидної відмінності і можуть бути використані для мультіплексного виявлення вірусів, зокрема SARS-CoV-2, HPV, HBV.

SDA (Strand Displacement Amplification). Метод SDA базується на ампліфікації ДНК із заміщенням ланцюга під дією ферментів із специфічною активністю — зазвичай DNA-полімеразаю і рестриктазою. Реакція відбувається за 50–60 °С без необхідності циклічного нагріву.

SDA підходить для виявлення вірусів у зразках із низьким навантаженням, але потребує тонкого налаштування та не підходить для РНК-вірусів без попередньої транскрипції.

Практична частина

Тема. Порівняльний аналіз методів ампліфікації нуклеїнових кислот для виявлення вірусів

Матеріали: теоретичні джерела з описом методів ампліфікації (RT-PCR, NEAR, LAMP, TMA, HDA, CRISPR, SDA); оглядові наукові статті (PubMed, Google Scholar); приклади застосування у діагностиці вірусів (SARS-CoV-2, ВІЛ, віруси гепатиту).

Обладнання: комп'ютер з доступом до Інтернету, таблицний редактор (Excel або Google Sheets), онлайн-бази наукових публікацій, програмне забезпечення для створення графіків і презентацій.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з методами ампліфікації нуклеїнових кислот.

Примітка. Методи ампліфікації нуклеїнових кислот (NAATs) використовуються для множинного копіювання специфічних ділянок РНК або ДНК вірусів, що дозволяє їх виявити навіть за мінімальної кількості генетичного матеріалу.

Хід роботи

1. Опрацюйте матеріали про методи:

- RT-PCR (зворотна транскрипція + полімеразна ланцюгова реакція),
- NEAR (Nicking Enzyme Amplification Reaction),
- LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification),
- TMA (Transcription-Mediated Amplification),
- HDA (Helicase-Dependent Amplification),

- CRISPR-асоційовані діагностики (SHERLOCK, DETECTR),
- SDA (Strand Displacement Amplification).

2. Сформулюйте короткий опис кожного методу.

Завдання 2. Заповніть таблицю порівняльного аналізу методів.

Примітка. Створення узагальнюючої таблиці дозволяє об'єктивно порівняти основні технічні та практичні характеристики методів ампліфікації.

Хід роботи

1. Заповніть таблицю:

Метод	Принцип роботи	Чутливість	Час виконання	Вимоги до обладнання	Застосування
RT-PCR	...	...	...	...	...
NEAR	...	...	...	...	...
LAMP	...	...	...	...	...
TMA	...	...	...	...	...
HDA	...	...	...	...	...
CRISPR	...	...	...	...	...
SDA	...	...	...	...	...

2. Для кожного методу додайте приклади застосування для виявлення конкретних вірусів.

Завдання 3. Порівняйте переваги і недоліки різних методів.

Примітка. Поглиблений аналіз практичної ефективності кожного методу дозволяє обрати найкращий для різних умов — лабораторних, польових, ресурсно обмежених.

Хід роботи

1. Визначте переваги/недоліки кожного методу:

- Який найчутливіший?
- Який найшвидший?
- Який підходить для простих польових умов?
- Який вимагає складного обладнання?

2. Побудуйте діаграми:

- Стовпчасту — для візуалізації часу виконання.
- Кругову — для порівняння чутливості.

Завдання 4. Сформулюйте висновки.

Примітки. Узагальнення результатів аналізу з урахуванням різних критеріїв дозволяє зробити практичні рекомендації щодо застосування методів ампліфікації у вірусологічній діагностиці.

Хід роботи

1. Визначте:

- Найшвидший метод.
- Найчутливіший метод.
- Метод з мінімальними вимогами до лабораторії.

2. Узагальніть рекомендації щодо:

- Використання в клініко-діагностичних лабораторіях.
- Застосування в польових умовах.
- Перспектив застосування у майбутньому.

3. Результати запишіть у таблицю.

Метод	Найкраще підходить для...	Основна перевага	Основне обмеження
RT-PCR			
LAMP			
CRISPR			
...	...	...	...

Контрольні запитання

1. Що таке NAATs і яку роль вони відіграють у сучасній вірусологічній діагностиці?
2. Поясніть основні етапи полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (RT-PCR) та її переваги для виявлення РНК-вірусів.
3. У чому полягають основні відмінності між класичною ПЛР та ізотермічними методами ампліфікації нуклеїнових кислот?
4. Охарактеризуйте принцип дії методу NEAR. Для яких вірусів і в яких умовах його застосування є доцільним?
5. Які ферменти та праймери використовуються у методі LAMP і чому він є перспективним для польової вірусної діагностики?
6. Розкрийте механізм транскрипційно-опосередкованої ампліфікації (TMA) та її переваги порівняно з іншими методами.
7. Що таке HDA? Які особливості ферментативного процесу лежать в основі цього методу, і які його обмеження?
8. Як працює CRISPR-асоційована ампліфікація? Які Cas-білки найчастіше використовуються і як досягається специфічність у детекції вірусів?
9. Опишіть принцип ампліфікації із заміщенням ланцюга (SDA). Які ферменти залучені до процесу і для яких типів вірусів він підходить?
10. Як обирається метод NAATs залежно від типу вірусу, лабораторного забезпечення та клінічної задачі? Наведіть приклади.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №10. Кількісне визначення вірусів

Мета: ознайомитися з основними підходами до кількісного визначення вірусів у лабораторних умовах; вивчити принципи визначення інфекційності вірусів і методи підрахунку вірусних бляшок, некротичних плям та зон проліферації; опанувати поняття вірусного титру, інфекційної та летальної дози; засвоїти методики інфекційних центрів, трансформації та прямих тестів на інфекційність; розглянути реакцію кількісної гемаглютинації та кількісну електронну мікроскопію як засоби вірусної детекції; сформувати практичні навички визначення титру вірусу методом бляшкоутворення з подальшим аналізом та візуалізацією результатів за допомогою біоінформатичних інструментів.

Теоретичні відомості

1. Визначення інфекційності вірусів.
2. Кількісна електронна мікроскопія.

Визначення інфекційності вірусів

Інфекційність вірусу визначається його здатністю проникати в сприйнятливі клітини, реплікуватися та утворювати інфекційні віріони, що можуть заражати нові клітини. Оцінка інфекційності є критичною для розуміння патогенезу вірусних інфекцій, розробки вакцин, антивірусних препаратів та діагностичних тестів. Для визначення інфекційності використовують різні методи, які можна поділити на прямі та непрямі.

Підрахунок кількості вірусних бляшок (негативних колоній), некротичних плям, зон проліферації. Метод бляшкоутворення є класичним підходом для кількісного визначення інфекційних вірусів. Він базується на здатності вірусу інфікувати моношар клітин та спричиняти їх лізис, утворюючи видимі зони руйнування — бляшки. Кількість бляшок корелює з кількістю інфекційних віріонів у зразку та виражається в бляшкоутворюючих одиницях на мілілітр (БОО/мл). Подібні підходи використовуються для підрахунку некротичних плям або зон проліферації в тканинах рослин або тварин, що дозволяє оцінити вірусне навантаження та інфекційність.

Титр вірусів. Титр вірусу — це показник концентрації інфекційних віріонів у зразку. Він визначається шляхом серійного розведення вірусного зразка та інфікування сприйнятливих клітин або організмів. Титр виражається в БОО/мл або в 50% тканинно-культурних інфекційних дозах (TCID₅₀), що відповідає розведенню, при якому 50% культур клітин інфікуються. Визначення титру є важливим для стандартизації вірусних препаратів та оцінки ефективності вакцин.

Метод інфекційних центрів. Метод інфекційних центрів використовується для оцінки кількості клітин, інфікованих вірусом, які здатні передавати інфекцію сусіднім клітинам. Цей підхід дозволяє визначити ефективність передачі вірусу від клітини до клітини та оцінити інфекційність на клітинному рівні.

Метод трансформації. Деякі онкогенні віруси можуть трансформувати нормальні клітини в пухлинні. Метод трансформації передбачає оцінку здатності вірусу спричиняти морфологічні та функціональні зміни в клітинах, що ведуть до їх неконтрольного росту. Цей метод використовується для вивчення онкогенних властивостей вірусів та механізмів вірус-індукованого канцерогенезу.

Прямі тести на інфекційність. Прямі методи визначення інфекційності включають інокуляцію вірусного зразка в сприйнятливі клітини або організми з подальшим спостереженням за розвитком інфекції. До таких методів належать бляшкоутворення, визначення TCID₅₀ та інші біологічні тести, що дозволяють безпосередньо оцінити здатність вірусу спричиняти інфекцію.

Визначення інфекційної та летальної доз вірусу. Інфекційна доза 50 (ID₅₀) — це кількість вірусу, необхідна для інфікування 50% експериментальних тварин або клітинних культур. Летальна доза 50 (LD₅₀) — це кількість вірусу, що

спричиняє загибель 50% піддослідних тварин. Ці показники використовуються для оцінки вірулентності та патогенності вірусів, а також для порівняння штамів та оцінки ефективності антивірусних препаратів.

Виявлення вірусних антигенів. Виявлення вірусних антигенів здійснюється за допомогою імунологічних методів, таких як ІФА, імунофлуоресценція та імуноблотинг. Ці методи дозволяють ідентифікувати специфічні білки вірусу в клінічних зразках, що є важливим для діагностики вірусних інфекцій та моніторингу ефективності лікування.

Реакція кількісної гемаглютинації. Деякі віруси, такі як вірус грипу, мають гемаглютинін, що здатний зв'язуватися з еритроцитами та спричиняти їх аглютинацію. Реакція кількісної гемаглютинації використовується для визначення концентрації вірусу в зразку шляхом оцінки найвищого розведення, при якому відбувається аглютинація еритроцитів. Цей метод є простим та швидким для оцінки вірусного титру.

Кількісна електронна мікроскопія

Кількісна електронна мікроскопія (ЕМ) — це метод, що поєднує візуалізацію вірусних частинок за допомогою трансмісійної електронної мікроскопії з можливістю їх кількісного підрахунку в заданому об'ємі зразка. Він дозволяє не лише підтвердити морфологію вірусу, але й оцінити кількість віріонів у суспензії, що є особливо важливим при стандартизації вірусних препаратів, визначенні ступеня очищення, ефективності інактивації чи продуктивності вірусного виробництва.

Процедура кількісної ЕМ включає кілька етапів: приготування зразка (зазвичай — негативне контрастування з використанням ураніл ацетату або фосфорно-вольфрамової кислоти), нанесення на сітку для мікроскопії, висушування, а потім візуалізацію в електронному мікроскопі. Для підрахунку віріонів у полі зору застосовується попередньо нанесений внутрішній стандарт (наприклад, латексні частинки відомої концентрації) або методика підрахунку частинок на відомій площі сітки.

Отримані результати дозволяють розрахувати концентрацію вірусних частинок у зразку, зазвичай у кількості частинок/мл. Це дає змогу визначити співвідношення між загальною кількістю віріонів і інфекційними одиницями (наприклад, PFU/частинка), що важливо для оцінки інфекційної ефективності вірусу та контролю якості в біотехнологічному виробництві.

Переваги методу: висока точність, можливість оцінити морфологічну цілісність, наявність агрегатів або домішок. Недоліки: потреба в складному і дорогому обладнанні, трудомісткість підрахунку, залежність від якості підготовки препарату. Попри це, кількісна електронна мікроскопія залишається незамінною при роботі з новими вірусами, складними біопрепаратами або у випадках, коли потрібна незалежна оцінка кількості вірусних частинок без прив'язки до їхньої інфекційності.

Практична частина

Тема. Визначення вірусного титру методом бляшкоутворення (англ. *Plaque Assay*) та візуалізація результатів за допомогою біоінформатичних інструментів

Матеріали: відеоматеріали та симуляції (Labster, HHMI Biointeractive, YouTube); демонстраційні дані методу бляшкоутворення (наприклад, для бактеріофага T4); віртуальні лабораторії (Learn.Genetics, VirtualLabs); онлайн-сервіси для побудови графіків (GraphPad Prism, Excel, BioRender, Plotly); теоретичні джерела про методи кількісної оцінки вірусів.

Обладнання: комп'ютер з доступом до Інтернету, Excel або GraphPad Prism, віртуальна лабораторія або відеосимулятор, калькулятор, шаблони таблиць для обчислень.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з методом бляшкоутворення.

Принцип методу. Метод бляшкоутворення ґрунтується на здатності вірусів викликати лізис клітин у культурі, формуючи *бляшки* (зони клітинного руйнування). Кожна бляшка походить від однієї інфекційної вірусної частинки (PFU – plaque-forming unit). Підрахунок кількості бляшок дає змогу розрахувати титр вірусу.

Хід роботи

1. Перегляньте навчальне відео або пройдіть симуляцію plaque assay.
2. Занотуйте формулу розрахунку титру:

$$\text{Титр (PFU/мл)} = \text{кількість бляшок} \times \text{розведення} \times (1/\text{об'єм інокуляту в мл})$$

Завдання 2. Опрацюйте демонстраційні дані.

Примітка. Для розрахунку титру використовуються зразки з кількістю бляшок у межах 20–200, що вважається достовірним.

Хід роботи

1. Опрацюйте такі дані:

Розведення	Кількість бляшок (середнє)
10^{-3}	200
10^{-4}	25
10^{-5}	2

2. Інокульований об'єм: 0,1 мл
3. Розрахуйте титр для розведення 10^{-4} .

Завдання 3. Побудуйте графіки та візуалізуйте результати.

Примітка. Графічне представлення даних дозволяє візуально оцінити залежність між розведенням і кількістю PFU.

Хід роботи

1. Створіть таблицю (приклад):

$\text{Log}_{10}(\text{Розведення})$	PFU
-3	200
-4	25
-5	2

2. Створіть графік (напівлогарифмічна шкала) у Excel, GraphPad або Plotly:

- **X:** $\text{Log}_{10}(\text{розведення})$
- **Y:** Кількість бляшок (PFU)

3. Додайте підписи осей, трендлайн, заголовок графіка. За бажанням використайте:

- Excel (scatter plot),
- GraphPad Prism (bar or scatter with nonlinear fit),
- Plotly для інтерактивних графіків,
- BioRender — для оформлення постеру/візуального пояснення.

Завдання 4. Проведіть порівняльний аналіз методів оцінки вірусної концентрації.

Примітка. Метод бляшкоутворення порівнюється з іншими методами кількісної оцінки вірусів для визначення його практичного значення.

Хід роботи

1. Коротко порівняйте метод бляшкоутворення з іншими методами кількісної оцінки вірусів.

2. Результати запишіть у таблицю.

Метод	Переваги	Обмеження
Бляшкоутворення		
TCID₅₀		
qPCR		
ELISA		

3. Результати дослідження подаються у формі лабораторного звіту (Word або PDF), який включає:

- короткий опис методу,
- таблицю вихідних даних,
- розрахунок вірусного титру,
- побудований графік,
- візуалізація (за бажанням – у вигляді схеми/постера),
- письмовий аналіз (1–2 абзаци).

Контрольні запитання

1. Що таке інфекційність вірусу і які ключові параметри використовують для її кількісного визначення в лабораторних умовах?

2. У чому полягає принцип методу бляшкоутворення і як інтерпретуються результати при підрахунку вірусних бляшок?

3. Яка різниця між вірусним титром, вираженим у PFU/мл, і TCID₅₀, та в яких випадках кожен з них є доцільнішим для використання?

4. Які переваги і обмеження має метод інфекційних центрів у порівнянні з традиційними методами оцінки вірусної інфекційності?
5. Опишіть метод трансформації клітин як підхід до визначення онкогенної активності вірусів. Які морфологічні зміни є показовими для трансформації?
6. Які тести належать до прямих методів визначення інфекційності вірусу, та у чому полягає їх принципова відмінність від непрямих методів?
7. Що таке ID₅₀ та LD₅₀? Як ці показники використовуються у вірусології та токсикології для оцінки патогенності вірусу?
8. Якими методами здійснюється виявлення вірусних антигенів у біологічних зразках, і яку роль відіграють імуноферментні тести у цьому процесі?
9. Як проводиться реакція кількісної гемаглютинації та які віруси доцільно ідентифікувати за допомогою цього методу?
10. У чому полягає суть кількісної електронної мікроскопії? Які переваги вона має для оцінки кількості віріонів у зразку, і які її обмеження?

ЧАСТИНА 3. ОТРИМАННЯ ВІРУСНИХ ПРЕПАРАТІВ

Отримання вірусних препаратів є ключовим етапом у дослідницькій та прикладній вірусології, зокрема при створенні вакцин, фаготерапевтичних засобів, антивірусних препаратів і засобів діагностики. У межах цієї частини практикуму розглядаються методи культивування, титрування та препаративного отримання бактеріофагів, а також виділення, очищення та концентрування вірусів рослин. Особлива увага приділяється критеріям відбору систем-господарів, методам злитного лізису, фільтрації, освітлення екстрактів та механічного зараження індикаторних рослин.

Практичні заняття спрямовані на формування вмінь з підготовки висококонцентрованих вірусних суспензій, оцінки інфекційної активності вірусів і контролю їх стабільності. Студенти отримають досвід роботи з бактеріофагами як моделлю для вивчення молекулярної біології вірусів та з вірусами рослин як об'єктами для діагностики та фітопатологічного аналізу. Це створює фундамент для подальшого засвоєння сучасних технологій виробництва та контролю якості вірусних препаратів у біотехнології.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №11. Культивування, титрування і препаративне отримання бактеріофагів

Мета: ознайомитися з принципами культивування бактеріофагів на специфічних штахтах бактерій-господарів; вивчити критерії вибору бактеріальних систем для ефективної репродукції фагів; опанувати метод злитного лізису як основу для отримання високої концентрації вірусних частинок; засвоїти методики відокремлення бактеріофагів від бактеріальних клітин і домішок різної молекулярної маси; набутти практичних навичок титрування фагів і проведення аналізу можливих генетичних змін у бактеріофагах під час багаторазового пасажування в культурі бактерій.

Теоретичні відомості

1. Критерії відбору бактерій як систем для культивування бактеріофагів.

2. Метод злитного лізису.
3. Відокремлення й очищення бактеріофагів від клітин бактерій, високо - та низькомолекулярних сполук.

Критерії відбору бактерій як систем для культивування бактеріофагів

Вибір бактеріального господаря є одним із ключових етапів у процесі культивування бактеріофагів, оскільки від його характеристик залежить ефективність реплікації фагів, кількість отриманих віріонів та стабільність вірусного препарату. Основним критерієм є специфічність — кожен бактеріофаг має обмежене коло чутливих бактерій, які володіють відповідними рецепторами на поверхні клітинної стінки для адсорбції фагових частинок. Важливу роль відіграє також фізіологічний стан клітин: найбільш сприятливими для фагової інфекції є активно діляться культури в логарифмічній фазі росту.

При відборі штаму-господаря слід враховувати такі фактори: швидкість росту бактерій, здатність утворювати рівномірний моношар на поживному середовищі, стійкість до контамінації, відсутність власних фагів-прогенів або інших мобільних генетичних елементів, які можуть змінювати сприйнятливість до досліджуваного бактеріофага. У промисловості надається перевага штамам з високим рівнем продуктивності, генетично стабільним і добре охарактеризованим. Також враховується сумісність бактерій із використанням середовищем, умовами аерації, температурою та рН культивування.

У контексті досліджень фаготерапії або біоконтролю особливо важливо використовувати клінічно значущі або фітопатогенні штами, до яких фаги демонструють лізогенну активність. Таким чином, правильний вибір бактеріального господаря є фундаментом для успішного культивування та подальшого застосування бактеріофагів.

Метод злитного лізису

Метод злитного лізису (англ. confluent lysis) — це один з ефективних способів культивування бактеріофагів для отримання великої кількості вірусних частинок. Його суть полягає у зараженні бактеріальної культури високим фаговим титром, що призводить до масової інфекції клітин і швидкого їх лізису на всій площі середовища. В результаті утворюється прозора зона — "лізисне поле", в якому майже всі бактеріальні клітини зруйновані, а середовище насичене фаговими частинками.

Для проведення злитного лізису зазвичай використовують агарові чашки або рідке поживне середовище. На першому етапі готують суспензію чутливої бактеріальної культури в лог-фазі росту. До неї додають бактеріофаг у високій концентрації (високий MOI — multiplicity of infection). Після короткої інкубації, що дозволяє фагам інфікувати клітини, суміш наносять на поверхню агарового шару або інкубують у рідкому середовищі. Протягом 4–24 годин відбувається повний лізис культури.

Злитний лізис є зручним методом для препаративного отримання бактеріофагів, оскільки дозволяє швидко отримати фагову суспензію з високим вмістом віріонів. Крім того, метод широко застосовується в фаговому типуванні,

визначенні спектра дії фагів та їх еволюційній стабільності. Важливо контролювати щільність посіву, час інкубації та уникати контамінацій, щоб забезпечити чистоту фагової популяції та ефективність наступного етапу — очищення.

Відокремлення й очищення бактеріофагів від клітин бактерій, високо- та низькомолекулярних сполук

Після культивування бактеріофагів шляхом злитного лізису отриманий лізат містить не лише фагові частинки, але й залишки клітинної маси, бактеріальні токсини, білки, нуклеїнові кислоти та інші домішки. Для подальшого використання, особливо у терапевтичних чи біотехнологічних цілях, необхідне ретельне очищення та концентрування фагової суспензії.

Першим етапом очищення є відокремлення грубих залишків клітин — це досягається шляхом центрифугування при помірній швидкості (5–10 тис. об/хв) або фільтрації через мембрани з порами 0,22 мкм. Наступним кроком є осадження фагів високошвидкісною ультрацентрифугуванням (30–100 тис. об/хв) або осадженням поліетиленгліколем (ПЕГ-8000) із подальшою діалізою для видалення низькомолекулярних речовин.

Для більш глибокого очищення застосовуються методи градієнтної ультрацентрифугації в градієнтах сахарози або цезію хлориду (CsCl), які дозволяють розділити фаги за щільністю. Також ефективною є гель-фільтрація (розділення за розміром), афінна хроматографія (за специфічною взаємодією білків оболонки) та іонообмінна хроматографія. Останнім часом набули поширення мембранні технології (ультрафільтрація, тангенціальна фільтрація) як менш травматичні до віріонів.

Якісне очищення фагової суспензії критично важливе не лише для збереження активності вірусу, але й для зменшення імуногенності, токсичності або інгібування під час подальших аналітичних або терапевтичних процедур. Контроль якості очищення здійснюється методами електронної мікроскопії, спектрофотометрії, ІФА та ПЛР, що дозволяє оцінити ступінь очищення, відсутність бактеріальних домішок і стабільність препарату.

Практична частина

Тема. Аналіз методики культивування, титрування та препаративного отримання бактеріофагів. Моделювання умовного експерименту

Матеріали: наукові джерела (статті, огляди, бази даних PubMed, NCBI Virus, Google Scholar), відеоматеріали з відкритих освітніх платформ (Learn.Genetics, YouTube-канали з вірусології), протоколи стандартного титрування фагів (зокрема метод подвійного шару агарів), довідкові матеріали щодо фаготерапії та фагових препаратів (наприклад, Секстафаг, Інтестібактеріофаг), приклади наукових презентацій, таблиці для розрахунку PFU/мл, доступ до онлайн-інструментів для оформлення звітів та презентацій (Google Docs, Canva, PowerPoint).

Обладнання: комп'ютер або ноутбук з підключенням до Інтернету, проектор або інтерактивна панель (для колективного перегляду інформаційних

ресурсів), лабораторний блокнот для нотаток, шаблони для занесення експериментальних даних (таблиці під PFU-аналіз), матеріали для створення візуального супроводу (інфографіки, слайдів), базовий лабораторний набір для роботи з бактеріями та фагами (чашки Петрі, піпетки, середовища, фільтри, центрифуга).

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Ознайомтеся з критеріями вибору бактерій для культивування бактеріофагів.

1. Проаналізуйте теоретичні джерела щодо критеріїв:

- специфічність фаг–господар,
- фізіологічна активність клітин,
- відсутність фагів-прогенів,
- стабільність і швидкість росту.

2. Зробіть короткий опис вибраного штаму (наприклад, *E. coli* K12).

Завдання 2. Змодельуйте умовний експеримент з культивування фага. Складіть план культивування фага T4:

- **підготовка:** посів *E. coli* на рідке середовище, інкубація до лог-фази,
- **інфікування:** додавання фагової суспензії ($\text{MOI} = 1-10$),
- **інкубація:** при 37 °C протягом 4–8 годин,
- **ознаки:** помутніння, прозорість — ознака лізису.

Завдання 3. Проаналізуйте метод злитного лізису. Опишіть принцип:

- змішування фага та бактеріальної суспензії,
- нанесення на чашку з LB-агаром,
- інкубація до появи суцільного лізисного поля (24 год),
- отримання лізату — вихідного матеріалу для очищення.

Завдання 4. Відтитруйте фаг методом подвійного шару агарів.

- приготування серій розведень ($10^{-1} - 10^{-8}$),
- змішування з 0,7% агаром і бактеріями,
- наливання на попередньо підготовлену чашку,
- інкубація 18–24 год,
- підрахунок кількості бляшок.

Розрахунок PFU/мл:

Приклад: на чашці з розведенням 10^{-6} виявлено 120 бляшок:

$$\text{PFU/мл} = 120 \times 10^6 = 1,2 \times 10^8 \text{ PFU/мл}$$

Завдання 5. Проаналізуйте методи очищення бактеріофагів.

1. Фільтрація: через фільтр 0,22 мкм для видалення бактерій.
2. Центрифугування: для видалення клітинного сміття.
3. Ультрацентрифугування: в градієнті сахарози або CsCl для розділення фагів.

4. Додаткові методи: діаліз, гель-фільтрація, тангенціальна фільтрація.

Завдання 6. Проаналізуйте фаговий препарат. Приклад – Секстафаг:

Параметр	Характеристика
Виробник	ТОВ «Мікроген», Україна

Склад	Фаги до <i>Staphylococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Pseudomonas</i>
Форма випуску	Розчин для перорального або місцевого застосування
Показання	Кишкові інфекції, гнійні процеси, профілактика
Специфічність	Висока, до патогенних штамів

Завдання 7. Зробіть висновки.

1. Висвітліть ключові етапи умовного експерименту з культивування та титрування бактеріофага.
2. Узагальніть критерії безпечного та ефективного використання бактеріофагів.
3. Сформулюйте висновки про можливості застосування фагових препаратів у медицині або біотехнології.

Контрольні запитання

1. Які основні критерії слід враховувати при виборі бактеріального штаму для культивування бактеріофагів?
2. Чому фізіологічний стан бактеріальної культури є критичним фактором для успішної реплікації фагів?
3. Як специфічність взаємодії бактеріофага з клітинним рецептором впливає на вибір бактерії-господаря?
4. Які властивості бактеріального штаму важливі для забезпечення рівномірного росту на поживному середовищі?
5. Які переваги мають генетично стабільні бактеріальні штами у фаговому виробництві?
6. Чому наявність фагів-прогенів у геномі бактерій-господарів є небажаною при культивуванні нових бактеріофагів?
7. Як вибір середовища та фізико-хімічні умови культивування (рН, температура, аерація) впливають на ефективність росту бактерій та реплікацію фагів?
8. У чому полягає особливість вибору бактерій для фаготерапії або біоконтролю фітопатогенів?
9. Яким чином адаптація бактеріофага до конкретного штаму бактерії може покращити продуктивність культивування?
10. Як впливає морфологія колоній та здатність до утворення біоплівки на ефективність фагового лізису та збирання фагових частинок?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №12. Виділення, очистка та концентрування вірусів рослин

Мета: ознайомитися з основними підходами до виділення, очищення та концентрування вірусів рослин; вивчити біологічні особливості вірусів рослин, їхню взаємодію з клітинами-господарями, механізми транспорту та шляхи поширення в рослинному організмі; проаналізувати вплив вірусної інфекції на фізіологічний стан рослин; освоїти методи екстракції вірусів із інфікованих тканин, освітлення екстрактів за допомогою органічних розчинників, а також прийоми концентрування та первинного очищення вірусної суспензії; набутти

практичних навичок механічного зараження рослин-індикаторів для оцінки інфекційної активності вірусу.

Теоретичні відомості

1. Віруси рослин.
2. Особливості взаємодії вірусів рослин з рослинною клітиною.
3. Транспорт та шляхи передачі вірусів рослин.
4. Вплив вірусної інфекції на ріст та розвиток рослинного організму.
5. Рослини - індикатори.
6. Екстракція вірусів з рослин.
7. Освітлення екстракту органічними розчинниками.
8. Концентрування вірусної суспензії та її очистка.

Віруси рослин

Віруси рослин — це неклітинні форми життя, що здатні інфікувати та реплікуватися виключно в живих клітинах рослин. Основною структурною одиницею є віріон — позаклітинна форма вірусу, що містить генетичний матеріал (найчастіше однониткову РНК, рідше ДНК) і білкову оболонку (капсид). Деякі віруси мають також ліпідну оболонку, однак це рідкість для фітовірусів. Вони мають просту, але надзвичайно ефективну організацію, що дозволяє їм швидко адаптуватися до господаря та спричиняти порушення його метаболізму.

У систематиці віруси рослин належать до різних родин, серед яких найвідоміші — *Potyviridae*, *Tombusviridae*, *Geminiviridae*, *Closteroviridae*. Фітовіруси можуть уражати всі частини рослини — листя, стебла, коріння, насіння — і спричиняють широке коло симптомів: мозаїчність, некрози, хлорози, карликовість, скручування листків тощо. У сільському господарстві ці віруси є важливою проблемою, адже можуть суттєво знижувати урожайність і якість продукції. Їх передають переважно комахи (наприклад, попелиці), нематоди, гриби або через механічні ушкодження.

Дослідження вірусів рослин є важливим для діагностики, селекції стійких сортів, розробки біотехнологічних підходів до боротьби з інфекціями, а також для глибшого розуміння вірусної еволюції.

Особливості взаємодії вірусів рослин з рослинною клітиною

Процес інфікування рослинного організму вірусом суттєво відрізняється від аналогічного процесу у тварин. Оскільки рослинні клітини захищені жорсткою целюлозною стінкою, вірусам важко проникнути в них без механічного пошкодження. В природних умовах таке проникнення забезпечують вектори (переважно сисні комахи), які під час живлення переносять вірус у цитоплазму клітини. Інші шляхи — це механічне ушкодження або передача через насіння.

Після потрапляння в клітину вірус вивільняє свій геном, який починає використовувати ресурси клітини для синтезу вірусних білків та нових копій РНК або ДНК. Ці компоненти збираються у нові віріони, які потім поширюються на сусідні клітини через плазмодесми. Віруси здатні синтезувати спеціальні

білки руху, які розширюють пори плазмодесм і полегшують проходження вірусного геному.

На клітинному рівні вірус може викликати зміни у цитоскелеті, пластинах, хлоропластах, а також пригнічення синтезу власних білків і нуклеїнових кислот. Усе це знижує життєздатність клітини, призводить до дегенеративних змін і формування типових симптомів інфекції.

Транспорт та шляхи передачі вірусів рослин

Внутрішньорослинне переміщення вірусів здійснюється двома основними шляхами: міжклітинним (локальне поширення) та системним (довготривале поширення по всій рослині). Міжклітинний транспорт відбувається через плазмодесми — спеціалізовані цитоплазматичні канали між клітинами. Віруси синтезують білки руху (movement proteins), які розширюють діаметр плазмодесм і дозволяють вірусному геному або віріонам переходити з клітини в клітину.

Системне поширення відбувається через провідні тканини, зокрема флоему. Віріони потрапляють у ситоподібні трубки й разом із потоком поживних речовин транспортуються у віддалені частини рослини, включаючи меристему, що може призводити до генеративної передачі вірусу наступному поколінню.

Міжрослинна передача вірусів здійснюється кількома механізмами: через сисних комах (наприклад, попелиць, цикадок), нематод, мікроскопічні гриби, механічним шляхом (через пошкоджені ділянки), а також через насіння або пилок. Тип механізму передачі залежить від виду вірусу й визначає швидкість поширення захворювання в агроценозі.

Вплив вірусної інфекції на ріст та розвиток рослинного організму

Вірусна інфекція значною мірою впливає на фізіологічні процеси рослини, її морфологію, метаболізм і продуктивність. У більшості випадків інфекція веде до зниження фотосинтезу, зміни в гормональному балансі (особливо зменшення рівнів ауксинів та цитокинінів), порушення обміну речовин, пригнічення росту та зниження фертильності.

Найпоширеніші симптоми включають мозаїчність листя (чергування темних і світлих ділянок), хлороз (жовтіння), некрози (мертві ділянки тканин), викривлення листків, карликовість, зморшкуватість і затримку цвітіння. У деяких випадках віруси спричиняють утворення безсимптомних носіїв, які є джерелом інфекції в популяції.

Ураження рослин фітовірусами не лише знижує врожайність, а й змінює якісні характеристики продукції — зокрема, цукристість, забарвлення, стійкість до зберігання. Тому вивчення наслідків вірусної інфекції має важливе значення для агрономії, біотехнології та селекції.

Рослини – індикатори

Рослини-індикатори — це чутливі до певних вірусів види або сорти рослин, які проявляють типовий комплекс симптомів після зараження. Вони застосовуються як біологічний тест для виявлення та попередньої ідентифікації вірусів у досліджуваному матеріалі. Використання індикаторних рослин дозволяє швидко оцінити інфекційність зразка без складних аналітичних методів.

До типових рослин-індикаторів належать тютюн (*Nicotiana tabacum*, *N. glutinosa*), квасоля (*Phaseolus vulgaris*), шпинат (*Spinacia oleracea*), лопатевик (*Chenopodium amaranticolor*). Наприклад, у тютюні після зараження вірусом тютюнової мозаїки з'являються мозаїчні візерунки на листках, у квасолі — некротичні плями, а у шпинаті — системний хлороз.

Цей підхід дозволяє встановити не лише наявність вірусу, але й його інфекційний потенціал, а також порівняти з іншими зразками за ступенем ураження.

Екстракція вірусів з рослини

Виділення вірусів із рослинного матеріалу передбачає механічне руйнування клітинної структури шляхом гомогенізації у буферному середовищі. Як буфер, зазвичай використовують фосфатний, трис-ацетатний або цитратний буфер, до якого додають стабілізатори, антиоксиданти, інгібітори протеаз для збереження вірусної активності.

Процес подрібнення виконується в холоді з використанням стерильного пісочку, скляних гомогенізаторів або автоматичних приладів. Гомогенат фільтрується через марлю або сітку, після чого піддається центрифугуванню при низьких обертах для осадження грубих частинок. Надосадок містить вірусні частинки у зваженому стані та використовується для подальших процедур очищення та аналізу.

Освітлення екстракту органічними розчинниками

Освітлення вірусного екстракту — це процес видалення небажаних домішок (переважно ліпідів, барвників, білків) шляхом обробки органічними розчинниками, які вибірково осаджують або екстрагують ці речовини. Зазвичай для цього використовують хлороформ, н-бутанол або етилацетат.

Процедура виконується шляхом додавання органічного розчинника до екстракту у певному співвідношенні (наприклад, 1:1), з подальшим перемішуванням і відстоюванням у холоді. Після центрифугування утворюються дві фази: верхня органічна (містить жири та пігменти) і нижня водна (містить віруси). Водну фазу обережно збирають для подальших маніпуляцій.

Цей крок є важливим для покращення якості вірусної суспензії перед концентруванням або аналітичними тестами, оскільки домішки можуть маскувати вірусні білки, заважати серологічним реакціям або створювати фон у електронній мікроскопії.

Концентрування вірусної суспензії та її очистка

Після екстракції й освітлення концентрація вірусів у зразку, як правило, є недостатньою для детекції або подальшого використання, тому потрібне їх концентрування. Для цього застосовуються методи осадження (наприклад, за допомогою ПЕГ — поліетиленгліколю), ультрацентрифугування, мембранна фільтрація або ліофілізація.

Очищення вірусних препаратів здійснюється шляхом градієнтної центрифугації в сахарозі або CsCl, гель-фільтрації (за розміром), іонообмінної або афінної хроматографії. Ці методи дозволяють відділити вірусні частинки від білкових домішок, нуклеїнових кислот, полісахаридів.

Концентрований і очищений препарат може бути використаний для серологічних досліджень, електронної мікроскопії, молекулярного аналізу або як стандарт у біотехнології. Контроль якості препарату включає спектрофотометрію, електрофорез, ІФА або біотестування на індикаторних рослинах.

Практична частина

Тема. Методика механічного ураження вірусом рослин-індикаторів різними способами

Матеріали: вірусні зразки (вірус тютюнової мозаїки, Х-вірус картоплі), рослини-індикатори (*Nicotiana tabacum*, *Datura stramonium*, *Chenopodium amaranticolor*, *Phaseolus vulgaris*), фосфатний буферний розчин (рН 7,4), дистильована вода, дезінфекційні розчини, карборунд (абразив), стерильні голки, етикетки та маркери для маркування рослин, скляні палички, наукові джерела (статті з вірусології, протоколи з механічного інфікування рослин), мультимедійні матеріали (відео про техніку інокуляції), шаблони таблиць для фіксації симптомів та порівняльного аналізу.

Обладнання: комп'ютер або ноутбук з підключенням до Інтернету, проектор або інтерактивна панель для демонстрації методики, лабораторний стіл, світлове обладнання, ноутбук або зошит для нотаток, шаблони для заповнення спостережень, матеріали для створення презентації (PowerPoint, Canva), фотокамера або мобільний пристрій для фотофіксації результатів, базовий лабораторний набір для роботи з рослинами та вірусами (пінцети, рукавички, ємності, серветки).

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Промаркуйте рослини.

1. Промаркуйте кожную рослину етикеткою з інформацією:

- назва вірусу (наприклад, ВТМ, Х-вірус картоплі),
- метод ураження (втирання, укол),
- дата інокуляції.

Приклад маркування: «ВТМ, укол в центральну жилку, 23.11.2024».

Завдання 2. Підготовка листкової пластинки.

1. Кожну листкову пластинку умовно поділіть на дві половини:

- **контрольна половина** — для обробки фосфатним буфером,
- **дослідна половина** — для нанесення вірусного препарату.

Завдання 3. Проведіть механічне ураження методом втирання.

1. Посипте листкову пластинку тонким шаром карборунду.

2. На контрольну половину листка нанесіть фосфатний буфер за допомогою скляної палички, злегка втираючи.

3. На дослідну половину нанесіть вірусний препарат і так само злегка втирайте.

4. Через 10 хвилин змийте залишки карборунду та реактивів дистильованою водою, зібравши рідину у склянку з дезрозчином.

Завдання 4. Проведіть механічне ураження методом уколу.

1. За допомогою стерильної голки, змоченої вірусним препаратом, виконайте укол центральної жилки листка

Завдання 5. Інкубуйте рослини.

1. Розмістіть рослини у теплиці або в темному місці на 24 години (для покращення ефективності інфекції).

2. Після інкубації перемістіть рослини до стандартних умов освітлення та догляду.

Завдання 6. Ведіть спостереження.

1. Через 7 днів після інфікування:

- оцініть появу симптомів вірусного ураження: мозаїчність, некрози, деформації, хлороз,

- порівняйте прояви між дослідною і контрольною половинами листка, а також між двома способами ураження.

Завдання 7. Оформіть результати і зробіть висновки.

1. Зафіксуйте в робочому зошиті спостереження для кожної рослини-індикатора, зокрема:

- наявність/відсутність симптомів,
- інтенсивність проявів (візуальна шкала або фотофіксація),
- різницю між втиранням та уколом.

2. Визначте, які рослини-індикатори проявили найбільшу чутливість до досліджуваних вірусів.

3. Оцініть ефективність механічних методів інфікування (втирання vs укол).

4. Зробіть припущення щодо механізмів проникнення вірусів у клітини в кожному з випадків.

Контрольні запитання

1. Що таке віріон і які структурні елементи притаманні вірусам рослин?

2. Які родини вірусів найчастіше зустрічаються серед фітовірусів і які частини рослини вони можуть уражати?

3. Яким чином вірус потрапляє у рослинну клітину, враховуючи особливості її будови?

4. Які білки забезпечують міжклітинне переміщення вірусів у рослинній тканині та як це здійснюється?

5. Які основні симптоми вірусного ураження рослин ви знаєте, і як вони пов'язані з фізіологією зараження?

6. Які механізми міжрослинної передачі вірусів існують у природі?

7. Які види рослин використовують як індикаторні в дослідженнях фітовірусів і які симптоми у них проявляються?

8. У чому полягає суть методу екстракції вірусів із рослинної тканини, та які умови є критичними для збереження інфекційності?

9. Яка роль органічних розчинників у процесі очищення екстракту та як відокремлюється вірусна фаза?

10. Які методи використовують для концентрування та очищення вірусних частинок після екстракції?

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №13. Лабораторні техніки та методики, що використовуються для вивчення вірусів на молекулярному рівні

Мета: ознайомитися з сучасними лабораторними техніками, що застосовуються для дослідження вірусів на молекулярному рівні; вивчити принципи виділення нуклеїнових кислот і білків, проведення ПЛР-аналізів, вестерн-блоту, серологічних та імунологічних методів; проаналізувати застосування siRNA, гістологічних методик і біоінформатичних підходів, включно з рестрикційним аналізом і ДНК-чіпами, для виявлення, вивчення та моделювання вірусних взаємодій; сформувати практичні навички *in silico*-скринінгу потенційних інгібіторів вірусних білків з використанням доступного програмного забезпечення.

Теоретичні відомості

1. Виділення нуклеїнових кислот.
2. Екстракція білка.
3. Методи на основі ПЛР.
4. Вестерн-блот.
5. Серологічні аналізи.
6. Імунопреципітація.
7. Використання малих інтерферуючих (мі) РНК (англ. small interfering RNA, siRNA).
8. Гістологічні методи.
9. Біоінформатика та моделювання *in silico*.
10. Рестрикційний аналіз і ДНК-чіпи.

Виділення нуклеїнових кислот

Виділення нуклеїнових кислот (ДНК або РНК) є ключовим етапом у молекулярній вірусології, оскільки дозволяє аналізувати геном вірусу, проводити ампліфікацію, секвенування, клонування та експресійні дослідження. Сучасні методи базуються на лізисі клітинної структури (вірусних частинок і клітин-господарів), де використовуються детергенти, протеїнази та хімічні агенти для зруйнування мембран і деградації білків.

Після цього нуклеїнові кислоти очищують шляхом органічної екстракції (наприклад, фенол-хлороформ), спиртового осадження або із застосуванням спеціалізованих наборів на основі силікагелевих матриць або магнітних часток. Методи забезпечують високий ступінь чистоти та збереження цілісності НК, що критично для подальших досліджень.

Особливої актуальності набуває виділення вірусної РНК для зворотної транскрипції та ПЛР у діагностиці РНК-вірусів (наприклад, SARS-CoV-2, HCV). Автоматизовані системи, зокрема на основі магнітних часток, дозволяють забезпечити високу пропускну здатність і стандартизацію процедури.

Екстракція білка

Екстракція вірусних білків або білків клітин, які взаємодіють із вірусами, дозволяє дослідити структуру, функцію, посттрансляційні модифікації та імуногенність цих молекул. Процедура починається з механічного або хімічного

лізису клітин із застосуванням буферів, які містять детергенти, протеїнази-інгібітори та солі для стабілізації білків.

Після лізису суміш очищується шляхом центрифугування, фільтрації або діалізу для видалення клітинних залишків та інших домішок. У разі потреби проводять осадження білків сульфатом амонію або поліетиленгліколем.

Отримані білки використовуються у вестерн-блотах, імунопреципітації, ферментативних реакціях або структурному аналізі. У роботі з вірусами часто досліджують структурні білки капсида, ферменти реплікації (наприклад, РНК-полімерази) або білки-гості, які взаємодіють із вірусними компонентами.

Методи на основі ПЛР

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) — це метод ампліфікації специфічних ділянок нуклеїнових кислот, який є незамінним інструментом у вірусології. Стандартна ПЛР використовується для виявлення ДНК-вірусів (наприклад, HSV, CMV), тоді як зворотна транскриптазна ПЛР (RT-PCR) дозволяє аналізувати РНК-віруси (SARS-CoV-2, гепатит С).

Процес ПЛР включає денатурацію ДНК, відпал праймерів і синтез нових ланцюгів за допомогою термостабільної полімерази. Кількісна ПЛР у реальному часі (qPCR) дозволяє оцінити рівень вірусного навантаження або експресію генів. Методи можуть супроводжуватись використанням інтеркалюючих барвників (SYBR Green) або флуоресцентних зондів (TaqMan).

Цей метод є золотим стандартом у діагностиці, контролі якості біопрепаратів, скринінгу нових штамів та аналізі мутацій, пов'язаних з вірусною резистентністю.

Вестерн-блот

Вестерн-блот (імуноблотинг) використовується для специфічного виявлення білків, що є частинами вірусу або відповідають на інфекцію у клітині-господарі. Метод базується на електрофоретичному розділенні білків за розміром у поліакриламідному гелі, перенесенні їх на мембрану (блот) та подальшому імунодетектуванні.

На мембрану наносяться первинні антитіла, специфічні до цільового білка, а потім вторинні антитіла, мічені ферментом (наприклад, пероксидазою хрину), який генерує сигнал при додаванні субстрату. Результати візуалізують у вигляді смуг на мембрані.

Вестерн-блот дозволяє підтвердити експресію вірусного білка, виявити відповідь імунної системи або порівняти ступінь інфекції. Це один із найточніших методів якісного аналізу білкових мішеней.

Серологічні аналізи

Серологічні тести застосовують для виявлення вірусних антигенів або антитіл у сироватці крові. Найбільш поширеними є імуноферментний аналіз (ELISA), радіоімунний аналіз (RIA) та імунохроматографія.

ELISA використовується для кількісного визначення IgM та IgG-антитіл або вірусних антигенів. Результати дозволяють оцінити фазу інфекції, її гостроту, минулу експозицію або ефективність вакцинації.

Швидкі тести на основі імунохроматографії (тест-смужки) дають результати протягом 10–15 хв і широко застосовуються для польової діагностики.

Серологічні методи незамінні в епідеміологічних дослідженнях, імуномоніторингу та популяційному скринінгу, зокрема при інфекціях як ВІЛ, гепатити, кір, краснуха.

Імунопреципітація

Імунопреципітація — це метод селективного виділення певного білка з клітинного лізату за допомогою специфічного антитіла, яке формує осадний комплекс. Метод дозволяє аналізувати білки та їхні комплекси у природному стані.

Застосовується у формі ко-імунопреципітації (англ. Co-IP), де разом з мішенню осаджуються пов'язані білки. Цей підхід особливо корисний у вірусології для ідентифікації взаємодій вірус-господар, вивчення репліказних комплексів, структурних білків, або ефекторів імунної відповіді.

Осаджені білки аналізують за допомогою вестерн-блоту або мас-спектрометрії. Метод потребує високоякісних антитіл та відповідних буферів, але забезпечує велику аналітичну цінність.

Малі інтерферуючі РНК (siRNA)

Малі інтерферуючі РНК (англ. siRNA) — це дволанцюгові молекули РНК довжиною 21–23 нуклеотиди, які застосовуються для специфічного пригнічення експресії вірусних або клітинних генів. Механізм ґрунтується на комплементарному зв'язуванні siRNA з мРНК мішені, що призводить до її деградації.

У вірусології siRNA використовуються як інструмент для вивчення функції генів вірусу або клітини-господаря, що беруть участь у реплікації, імунній відповіді або патогенезі. Також вони мають терапевтичний потенціал, зокрема проти вірусу гепатиту В або SARS-CoV-2.

Метод є високо специфічним, але потребує ретельного дизайну, оптимізації дозування та ефективної доставки до клітин, зокрема через вірусні вектори або наночастинки.

Гістологічні методи

Гістологічні методи дають змогу дослідити морфологічні зміни, викликані вірусною інфекцією, на тканинному рівні. Для цього тканини фіксують, зневоднюють, заливають у парафін, нарізають тонкими зрізами і фарбують (наприклад, гематоксиліном і еозином).

Ці методи дозволяють виявляти цитопатичні ефекти, включення (наприклад, тільця Негрі при сказі), некроз, запалення та інші патологічні прояви. Імуноцитохімічні модифікації дозволяють локалізувати вірусні антигени.

Гістологія широко застосовується в патоморфологічній діагностиці вірусних захворювань, контролі ефективності терапії або вивченні патогенезу вірусів у тваринних і рослинних моделях.

Біоінформатика та моделювання in silico

In silico методи передбачають використання комп'ютерних алгоритмів для аналізу вірусних геномів, білків, передбачення їх функцій, структури, мутацій або пошуку лігандів. Біоінформатика включає секвенування, вирівнювання, побудову філогенетичних дерев, структурування білків (AlphaFold), молекулярне докінгування та динамічне моделювання.

Ці методи застосовуються для скринінгу потенційних інгібіторів вірусних ферментів (наприклад, протеаз, полімероз), ідентифікації епітопів для вакцин або дослідження взаємодій вірус-господар.

Платформи як NCBI, UniProt, RCSB PDB, AutoDock та SwissDock є базовими для подібного аналізу. Ці підходи дозволяють швидко сформулювати гіпотези та знизити витрати на експериментальні дослідження.

Рестрикційний аналіз і ДНК-чіпи

Рестрикційний аналіз полягає у використанні рестриктаз — ферментів, які розрізають ДНК у специфічних ділянках. Це дозволяє порівнювати вірусні ізоляти, визначати мутації, проводити клонування фрагментів ДНК або підтвердження конструкцій вектора.

ДНК-чіпи (мікрочіпи) — це платформи, які містять тисячі зондами, комплементарних до певних генетичних послідовностей. Вони дозволяють виявити одночасно десятки або сотні вірусів у зразку, а також дослідити експресію генів.

Такі платформи мають високу пропускну здатність і зручні для епідеміологічного моніторингу, порівняльної вірусології або створення персоналізованих стратегій терапії. Їх використання поєднує точність, масштабність і автоматизацію аналізу.

Практична частина

Тема. Проведення віртуального (in silico) скринінгу бібліотеки сполук проти цільового вірусного білка

Матеріали: структура цільового білка (3CLpro вірусу SARS-CoV-2, PDB ID: 6LU7), бібліотека лігандів (ZINCPharmer або вбудована бібліотека SwissDock), наукові джерела (статті про докінг, огляди щодо інгібіторів коронавірусу, PDB.org, ZINCPharmer, SwissDock), аналітичні таблиці для оцінки енергії зв'язування та типу взаємодій, графічні матеріали з результатами докінгу, приклади успішних інгібіторів 3CLpro.

Обладнання: комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернету, браузер з підтримкою веб-додатків (SwissDock, ZINCPharmer), програмне забезпечення для створення презентацій (PowerPoint, Canva, Google Slides), блокнот або зошит для нотаток, шаблони таблиць для внесення результатів докінгу, інструменти для збереження скріншотів та візуалізацій (наприклад, Snipping Tool або вбудовані функції SwissDock).

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Завантажте структуру цільового білка.

1. Перейдіть на сайт Protein Data Bank – <https://www.rcsb.org>.

2. Знайдіть та завантажте структуру основної протеази SARS-CoV-2 (PDB ID: **6LU7**) у форматі .pdb.

3. При завантаженні у SwissDock активуйте функцію автоматичного очищення від води та ко-кристалізованих лігандів.

Завдання 2. Проведуть підготовку до докінгу.

1. Виберіть джерело бібліотеки молекул:

- онлайн-база ZINCPharmer,
- або використовуйте попередньо запропоновану бібліотеку у SwissDock.

2. Завантажте файл структури білка у SwissDock.

3. Вкажіть координати активного сайту або скористайтесь автоматичним визначенням.

Завдання 3. Проведіть докінг.

1. Завантажте бібліотеку молекул у SwissDock.

2. Встановіть параметри скринінгу:

- тип взаємодій (гідрофобні, водневі, π -стекінг),
- точність розрахунків (Standard або High Accuracy).

3. Натисніть Start Docking для запуску обчислень.

4. Очікуйте завершення процесу докінгу (тривалість залежить від обсягу бібліотеки).

Завдання 4. Проаналізуйте результати докінгу.

1. Перейдіть до результатів на платформі SwissDock.

2. Відсортуйте комплекси за показником енергії зв'язування (ΔG).

3. Виберіть найбільш перспективні ліганди.

4. Проведіть візуальний аналіз взаємодій за допомогою вбудованої візуалізації SwissDock або PyMOL (опціонально):

- водневі зв'язки,
- гідрофобні взаємодії,
- π -стекінг.

Завдання 5. Збережіть та оформіть результати.

1. Створіть аналітичну таблицю результатів:

Ліганд	Енергія зв'язування (ккал/моль)	Тип взаємодії
--------	---------------------------------	---------------

2. Збережіть зображення найкращих комплексів білок–ліганд для включення до звіту/презентації.

3. Узагальніть отримані результати у вигляді коротких висновків.

Контрольні запитання

1. Яке біологічне значення має виділення нуклеїнових кислот у контексті молекулярної вірусології?

2. Які основні етапи включає процес виділення нуклеїнових кислот із клітинного або вірусного матеріалу?

3. Які хімічні реагенти зазвичай використовуються для лізису клітин і збереження цілісності нуклеїнових кислот?

4. У чому полягають переваги методу фенол-хлороформної екстракції порівняно з комерційними наборами на основі силікагелевих колонок?
5. Як відрізняється процедура виділення ДНК від виділення вірусної РНК, і які додаткові етапи характерні для останнього?
6. Які вимоги пред'являються до якості та чистоти нуклеїнових кислот для подальшого використання у ПЛР та секвенуванні?
7. Які фактори можуть негативно вплинути на вихід або якість РНК при виділенні, і як їх мінімізувати?
8. У яких випадках застосовується спиртове осадження нуклеїнових кислот, і які його основні принципи?
9. Які автоматизовані системи використовуються для виділення нуклеїнових кислот і які їх переваги у високопродуктивній діагностиці?
10. Як оцінити концентрацію та чистоту нуклеїнових кислот після виділення? Які інструменти або методи для цього використовують?

ЧАСТИНА 4. МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ НА ОСНОВІ ВІРУСІВ

Віруси, попри свою патогенну природу, є надзвичайно цінними інструментами в молекулярній біології, біотехнології та біомедичних дослідженнях. Завдяки своїй здатності проникати в клітини, ефективно експресувати генетичний матеріал і демонструвати взаємодії з білками господаря, віруси активно використовуються для розробки новітніх діагностичних, терапевтичних та аналітичних підходів. Одним із найбільш перспективних напрямів такого застосування є технологія фагового дисплею — інструмент для скринінгу мільярдів білкових або пептидних варіантів з метою відбору молекул з високою спорідненістю до цільових структур.

У цій частині навчального курсу розглядаються теоретичні та практичні аспекти використання вірусів як платформ для досліджень, зокрема фагів, що модифікуються для презентації пептидів або фрагментів антитіл на своїй поверхні. Практична робота зосереджена на аналізі отриманих за допомогою фагового дисплею антитіл, що відкриває студентам можливості для розуміння принципів молекулярної селекції, ідентифікації білкових мішеней, а також сучасних підходів до створення терапевтичних і діагностичних засобів *in vitro*.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №14. Технологія фагового дисплею

Мета: ознайомитися з технологією фагового дисплею як потужним інструментом молекулярної біології та біотехнології; вивчити принципи побудови бібліотеки фагового дисплею, основні етапи селекції фагів (пенінг), включно з імобілізацією цільової молекули, інкубацією, промиванням, елюцією та характеристикою індивідуальних клонів; проаналізувати сучасне застосування методу у дослідженні білок-білкових взаємодій, отриманні антитіл *in vitro*, конструюванні вакцин і біоінженерії ферментів; набутти практичних навичок ідентифікації та аналізу послідовностей антитіл, відібраних з бібліотеки фагового дисплею, з використанням сучасних інструментів біоінформатики.

Теоретичні відомості

1. Технологічні основи і загальні принципи фагового дисплею.
2. Схема процедури: конструювання бібліотеки фагового дисплею, імобілізація цільової молекули, інкубація з фаговою бібліотекою, етапи промивання, елюція зв'язаних фагів, ітераційні раунди селекції (пенінг), характеристика та ізоляція індивідуальних фагових клонів.
3. Використання технології фагового дисплею у молекулярній біології та біотехнології.

Технологічні основи і загальні принципи фагового дисплею

Фаговий дисплей (англ. *phage display*) — це потужна біотехнологічна платформа, яка дозволяє вивчати білкові взаємодії та ідентифікувати пептиди або антитіла з високою спорідненістю до цільових молекул. Принцип методу полягає у злитті генетичної інформації, що кодує певний пептид або білок, із геном одного з білків капсидної оболонки бактеріофага (зазвичай білка рІІІ або рVІІІ фага М13). У результаті експресії та збірки віріону цей білок виводиться на поверхню фага, що демонструє фрагмент (пептид/антитіло), зв'язаний із відповідною ДНК усередині вірусної частинки. Таким чином, кожен фаг несе зв'язок «генотип–фенотип», що є фундаментальним для подальшого відбору (селекції) за функціональними ознаками.

Технологія фагового дисплею дозволяє створювати бібліотеки, що містять мільйони або навіть мільярди варіантів білкових або пептидних послідовностей, які можуть бути скрининговані для виявлення тих, що специфічно зв'язуються з біомолекулярними мішенями — білками, ДНК, РНК або навіть цілими клітинами. Завдяки цій технології можливо швидко і ефективно знайти високоспецифічні ліганди, провести аналіз епітопів, створити нові антитіла та дослідити механізми міжмолекулярної взаємодії. У порівнянні з традиційними методами, фаговий дисплей має суттєві переваги: високу гнучкість, ін витро формат експерименту, можливість багаторазової селекції та ампліфікації відібраних фагів.

Схема процедури фагового дисплею

Процедура фагового дисплею складається з низки послідовних етапів, які включають: конструювання бібліотеки, імобілізацію цільової молекули, інкубацію з фагами, промивання, елюцію зв'язаних фагів, кілька раундів селекції (пенінгу), та фінальну ідентифікацію клонів.

Перший етап — **створення фагової бібліотеки** — передбачає вставлення випадкових або відомих послідовностей у ген капсидного білка фага, найчастіше рІІІ (що бере участь у зараженні бактерій). Результатом є колекція фагів, кожен з яких експонує унікальний пептид/антитіло.

Другий етап — **імобілізація цільової молекули** (наприклад, антигену або рецептора) на твердій поверхні (наприклад, пластикових лунках планшету або магнітних кульках), щоб забезпечити можливість специфічного зв'язування.

На третьому етапі **фагова бібліотека інкубується** з імобілізованою мішенню. Фаги з низькою або неспецифічною афінністю змиваються під час

етапів промивання, а ті, що зв'язалися — **елююються** (відокремлюються), наприклад, за допомогою зміни рН або конкуренції.

Після цього виконується **ампліфікація зв'язаних фагів** в бактеріальній культурі (наприклад, *E. coli* TG1 або XL1-Blue), після чого цикл селекції повторюється кілька разів (зазвичай 3–5 разів) для підвищення специфічності — цей процес називається **пенінгом** (*panning*).

Після фінального туру селекції проводять **індивідуальну характеристику клонів** — секвенування вставок, перевірку специфічності до мішені (ELISA, SPR), оцінку спорідненості та можливу експресію у вигляді розчинних білків. Отримані клони можуть бути використані для подальших структурних і функціональних досліджень.

Використання технології фагового дисплею у молекулярній біології та біотехнології

Фаговий дисплей відкрив широкі перспективи в молекулярній біології, біотехнології, біомедицині та фармації. Одним з основних застосувань є **отримання моноклональних антитіл *in vitro*** без необхідності імунізації тварин. Такі антитіла мають високу специфічність та афінність до антигенів і можуть бути легко людизовані для терапевтичного використання. Сьогодні низка ліцензованих біофармацевтичних препаратів отримана саме за допомогою фагового дисплею (наприклад, адалімумаб — Numira®).

Крім того, технологія активно використовується для **дослідження білок-білкових взаємодій**, зокрема у вивченні сигнальних шляхів, ідентифікації доменів зв'язування, епітопів або білків-господарів, з якими взаємодіють вірусні протеїни.

У сфері **вакцинології** фаговий дисплей дозволяє розробляти синтетичні епітопні вакцини або наносити епітопи на фагову оболонку для стимуляції імунної відповіді. Пептидні фагові вакцини мають переваги щодо стабільності, низької імуногенності самого носія та точності мішені.

У **ферментній інженерії** метод дає змогу еволюційно вдосконалювати ферменти шляхом скринінгу варіантів з поліпшеними каталітичними властивостями. Також він застосовується в **діагностиці**, зокрема у створенні біосенсорів, мікрочипів, імунологічних тест-систем з використанням високоафінних зв'язувальних молекул, і в **нанобіотехнологіях** — наприклад, для функціоналізації поверхонь або створення наноструктур.

Таким чином, фаговий дисплей є універсальною технологією, що поєднує гнучкість молекулярної інженерії з ефективністю селекції та має визначальне значення для сучасної науки і медицини.

Практична частина

Тема. Ідентифікація та аналіз послідовностей антитіл, отриманих із бібліотеки фагового дисплею.

Матеріали: послідовності важкого і легкого ланцюгів антитіла (PDB ID: 1CZ8), додаткові приклади антитіл (проти PD-1, IL-6, SARS-CoV-2), бази даних NCBI Protein, UniProt, Protein Data Bank (PDB), онлайн-інструменти BLAST та

IMGT/V-QUEST, аналітичні таблиці для структурування результатів, наукові огляди щодо CDR-аналізу, гуманізації антитіл і фагового дисплею.

Обладнання: комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернету, браузер для роботи з онлайн-сервісами (NCBI BLAST, IMGT, PDB), PowerPoint або Canva для створення презентації, шаблони таблиць для занесення результатів аналізу, текстовий редактор для оформлення письмового звіту, PyMOL (опціонально) для візуалізації структури антитіл.

Порядок виконання роботи

Завдання 1. Проведіть аналіз важкого ланцюга (V_H).

1. BLAST-аналіз:

- перейдіть на сайт [NCBI Protein BLAST](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi),
- вставте амінокислотну послідовність V_H ,
- виберіть базу даних SwissProt,
- запустіть пошук,
- зафіксуйте подібність до відомих антитіл (наприклад, проти VEGF).

2. Ідентифікація CDR-доменів у IMGT/V-QUEST:

- перейдіть на IMGT/V-QUEST,
- вставте V_H -послідовність,
- отримайте результат з визначенням:
 - CDR1: GFTFSTYG
 - CDR2: YISSGSST
 - CDR3: GYYGSSYWY
- визначте фреймворки (FR) та аналізуйте роль CDR3 у специфічності до VEGF.

Завдання 2. Проведіть аналіз легкого ланцюга (V_L).

1. BLAST-аналіз:

- повторіть ті самі дії для послідовності V_L ,
- зафіксуйте результат і порівняйте з базовими даними (збіг із відомими антитілами).

2. Ідентифікація CDR-доменів у IMGT/V-QUEST:

- вставте V_L у IMGT/V-QUEST,
- отримані CDR-ділянки:
 - CDR1: KASQSVSSYL
 - CDR2: GASNQGDSA
 - CDR3: QQYGSSPWTF
- оцініть внесок у специфічність та зв'язування антигену.

Завдання 3. Проведіть структурний аналіз (опціонально).

1. Завантажте PDB ID: 1CZ8 з [Protein Data Bank](https://www.rcsb.org/).
2. Відкрийте його у програмі PyMOL.
3. Ідентифікуйте розташування CDR1–3 в просторі.
4. Визначте, як CDR3 важкого і легкого ланцюгів утворюють контактну поверхню з антигеном (VEGF).

Завдання 4. Проведіть порівняльний аналіз та оцінка.

1. Порівняйте знайдені CDR-ділянки із терапевтичними антитілами (наприклад, Bevacizumab – Avastin).
2. Визначте унікальні амінокислотні залишки у CDR3, важливі для патентної новизни.
3. Обговоріть можливі напрямки оптимізації:
 - заміну лабільних амінокислот,
 - підвищення термостабільності,
 - проведення гуманізації антитіла.

Контрольні запитання

1. У чому полягає принципова відмінність фагового дисплею від традиційних методів відбору пептидів або антитіл?
2. Які компоненти бактеріофага найчастіше використовують для експозиції рекомбінантного пептиду в технології фагового дисплею? Назвіть приклади.
3. Як забезпечується зв'язок між генотипом і фенотипом у системі фагового дисплею, і чому це критично важливо для процедури селекції?
4. Опишіть основні етапи процедури фагового дисплею. Які цілі переслідуються на кожному з них?
5. Що таке «пенінг» у контексті фагового дисплею та яку функцію він виконує у процесі селекції?
6. Яким чином здійснюється іммобілізація цільової молекули під час фагового дисплею? Наведіть приклади використовуваних поверхонь та методів.
7. Які методи використовуються для ідентифікації та аналізу фагових клонів після завершення раундів селекції?
8. У яких напрямках молекулярної біології та біотехнології знайшла широке застосування технологія фагового дисплею? Наведіть не менше трьох прикладів.
9. Чому технологія фагового дисплею є особливо корисною для розробки синтетичних вакцин та біосенсорів?
10. Які переваги має фаговий дисплей над традиційною гібридною технологією у створенні моноклональних антитіл?

ЧАСТИНА 4. БІОБЕЗПЕКА І БІОТЕРОРИЗМ

У сучасному світі, де розвиток біотехнологій відкриває безпрецедентні можливості для медицини, сільського господарства та наукових досліджень, постає й зворотній бік — зростаюча загроза біоризиків. Особливо актуальною ця проблема стає в контексті вірусологічних об'єктів, адже віруси можуть бути не лише збудниками природних інфекцій, але й навмисно використані як інструмент біологічної зброї. Біотероризм, дослідження подвійного використання, порушення протоколів біобезпеки — усе це створює реальні виклики для національної та глобальної безпеки.

Належна підготовка фахівців з вірусології до роботи в умовах біологічних загроз передбачає не лише знання з мікробіології, молекулярної біології чи імунології, а й глибоке розуміння нормативно-правових аспектів біозахисту та біоетики. Четверта частина навчального курсу присвячена формуванню таких

компетентностей. Практичне заняття, що входить до цієї частини, має на меті навчити майбутніх фахівців аналізувати потенційні біоризики, оцінювати загрози, пов'язані з вірусологічними об'єктами, та розробляти ефективні сценарії дій на випадок біоінциденту. Це є критично важливою складовою професійної підготовки в умовах зростання глобальних біологічних викликів.

ПРАКТИЧНЕ ЗАНЯТТЯ №15. Визначення біоризиків і біозагроз при роботі з вірусологічними об'єктами

Мета: ознайомитися з основами біобезпеки та біоетики у сфері вірусології; вивчити нормативно-правову базу України щодо поводження з біологічними агентами; проаналізувати сучасні загрози, пов'язані з біозброєю, біотероризмом, дослідженнями подвійного використання; сформуванню уявлення про стратегії захисту та контролю за науково-технічними дослідженнями у галузі вірусології; набутти практичних навичок оцінки біоризиків та моделювання алгоритму реагування у разі біоінциденту з вивільненням вірусного агента.

Теоретичні відомості

1. Нормативно-правова база щодо біобезпеки та біоетики в Україні.
2. Суть проблеми біозагрози.
3. Сучасні проблеми біобезпеки.
4. Біотероризм, як одна з основних загроз біобезпеки.
5. Віруси як біологічна зброя.
6. Захист від біологічної зброї, контроль озброєнь, контроль науково-технічних досліджень і досягнень та біозахист.
7. Дилема «подвійного використання»: дослідження подвійного використання.

Нормативно-правова база щодо біобезпеки та біоетики в Україні

В Україні правове регулювання у сфері біобезпеки та біоетики здійснюється відповідно до міжнародних зобов'язань, Конституції України та ряду спеціалізованих законодавчих актів. Основними нормативними документами є: Закон України «Про захист населення від інфекційних хвороб», Закон України «Про санітарне та епідемічне благополуччя населення», Закон України «Про біобезпеку та біологічний захист», а також Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження». Ці документи регламентують заходи профілактики та ліквідації біологічних загроз, поводження з патогенними мікроорганізмами, використання генетично модифікованих організмів (ГМО) та захист довкілля.

Крім того, важливу роль відіграють Кодекси біоетики, розроблені на основі міжнародних стандартів, таких як Декларація Ов'єдо, Універсальна декларація ЮНЕСКО з біоетики та прав людини (2005). Вони окреслюють етичні принципи проведення біомедичних досліджень, захист прав пацієнтів, гуманність у поводженні з лабораторними тваринами.

Державні установи, як-от Міністерство охорони здоров'я України, Держпродспоживслужба, Національна комісія з біоетики, забезпечують

реалізацію політики у сфері біобезпеки та контролюють дотримання законодавства. В умовах воєнного стану нормативно-правова база постійно адаптується для запобігання біозагрозам і належного реагування на потенційні спалахи інфекцій.

Суть проблеми біозагрози

Біозагроза — це потенційна або реальна небезпека, пов'язана з умисним чи випадковим вивільненням біологічних агентів, здатних спричинити захворювання, смерть або екологічні катастрофи. Біозагрози можуть виникати внаслідок природних епідемій (наприклад, COVID-19, вірус Ебола), аварій на біологічних об'єктах, або у результаті навмисного використання патогенів як зброї.

Суть проблеми полягає в тому, що сучасні біотехнології, з одного боку, відкривають можливості для лікування хвороб, створення вакцин і підвищення врожайності, але з іншого — можуть бути використані у злочинних або терористичних цілях. Особливо небезпечними є дослідження подвійного використання, які можуть сприяти створенню надзвичайно патогенних варіантів збудників.

Проблема ускладнюється глобалізацією, мобільністю населення та обмеженим контролем над переміщенням біологічних матеріалів. Відсутність належної біоохорони, нестача фінансування на моніторинг і низька культура біозахисту в деяких регіонах створюють умови для неконтрольованого розповсюдження патогенів.

Таким чином, біозагроза — це мультидисциплінарна проблема, яка потребує об'єднання зусиль медицини, біології, права, політики та міжнародної дипломатії для її виявлення, оцінки та мінімізації.

Сучасні проблеми біобезпеки

Сучасні виклики біобезпеці стали особливо актуальними на тлі пандемії COVID-19, поширення нових збудників (наприклад, вірус віспи мавп, H5N1) та загострення військово-політичних конфліктів. Основними проблемами вважаються: недостатній контроль за біологічними лабораторіями, нерівномірний доступ до вакцин і діагностики, високий ризик біотероризму та обмежена міжнародна співпраця.

Важливим фактором є відсутність єдиної глобальної системи швидкого реагування на біозагрози, а також проблеми в комунікації між цивільними, військовими та науковими структурами. Недостатньо прозорі дослідження, особливо у сфері генної інженерії, викликають побоювання щодо можливого створення суперпатогенів.

Крім того, збільшення кількості біобанків, приватних біотехнологічних компаній та аматорських лабораторій з підвищеним рівнем доступу до генетичних даних — це потенційне джерело витоку інформації або патогенів.

Також спостерігається зростання загроз через синтетичну біологію, коли штучно створені патогени можуть мати посилені властивості ураження. Все це свідчить про необхідність перегляду підходів до глобального біозахисту та посилення міждержавного нагляду.

Біотероризм як одна з основних загроз біобезпеки

Біотероризм — це навмисне використання біологічних агентів (вірусів, бактерій, токсинів) з метою завдання шкоди здоров'ю людей, тварин, рослин або дестабілізації соціально-політичної ситуації. У сучасному світі він визнається однією з найбільш небезпечних форм асиметричної загрози.

Низька вартість виробництва біологічної зброї, порівняно з ядерною або хімічною, легкість транспортування, прихований період дії та труднощі виявлення — це фактори, які роблять біотероризм привабливим для терористичних організацій. Історичні приклади — спроби використання сибірки у США (2001), застосування сальмонел в Орегоні (1984), показують, що навіть з обмеженими ресурсами можна створити значну загрозу.

Відсутність негайних симптомів у постраждалих ускладнює виявлення джерела зараження, затримує відповідь і сприяє паніці. Тому біотероризм несе як фізичну, так і психологічну загрозу.

У відповідь на це країни впроваджують системи біомоніторингу, створюють протоколи біозахисту, розробляють резерви вакцин і антивірусних засобів, а також проводять навчання медичного персоналу. На міжнародному рівні координуючу роль відіграє ВООЗ та Конвенція про заборону біологічної зброї.

Віруси як біологічна зброя

Віруси є особливо небезпечною формою біологічної зброї через здатність швидко поширюватися, викликати масові інфекції та залишатися невиявленими до моменту появи симптомів. У минулому до потенційних вірусів-зброї належали віруси віспи, Ебола, Марбурга, віруси геморагічних гарячок, а також віруси, які можуть бути модифіковані в лабораторії.

Основними характеристиками «ідеального» вірусу як зброї є: висока контагіозність, короткий інкубаційний період, висока летальність, відсутність специфічного лікування або вакцини, стійкість до зовнішніх умов. З появою технологій CRISPR, синтетичної біології та генного редагування стало можливим штучно посилювати патогенність вірусів.

Віруси можуть бути застосовані як інструмент масового ураження або для вибіркового атак, спрямованих на стратегічні об'єкти або вразливі групи населення. Їхній вплив виходить за межі фізичного — включає психологічні, економічні, геополітичні наслідки.

З огляду на це, міжнародна спільнота вимагає ретельного контролю за дослідженнями, що можуть мати подвійне призначення, посилення біозахисту на лабораторіях високого рівня та обмеження доступу до чутливих біотехнологій.

Захист від біологічної зброї, контроль озброєнь, контроль науково-технічних досліджень і досягнень та біозахист

Захист від біологічної зброї є комплексом заходів, що охоплює правові, технологічні, медичні та військові аспекти. Основною міжнародною правовою основою є Конвенція про заборону розробки, виробництва та накопичення запасів бактеріологічної (біологічної) і токсичної зброї та про їх знищення (1972), до якої приєдналась і Україна.

Контроль науково-дослідницької діяльності здійснюється через етичні комітети, систему біоетики, ліцензування лабораторій та незалежний моніторинг. Важливо не лише забезпечити фізичну безпеку (біоконтейнмент), а й передбачити біоетичні наслідки технологічних відкриттів, наприклад, у сфері генетичної інженерії.

Біозахист включає створення системи раннього виявлення, моніторинг патогенів, розробку вакцин, антивірусних засобів, захисного одягу, ізоляційних процедур. У багатьох країнах працюють військові й цивільні центри біозахисту, які забезпечують оперативне реагування на загрози.

Науково-технічний прогрес вимагає впровадження принципу «відповідального науковця», коли кожен дослідник зобов'язаний оцінювати потенційні ризики свого проєкту та дотримуватися норм біоетики.

Дилема «подвійного використання»: дослідження подвійного використання

Дослідження подвійного використання (англ. Dual Use Research of Concern — DURC) стосуються наукових робіт, результати яких можуть бути використані як у благих, так і в злочинних або військових цілях. Дилема полягає в тому, що дослідження, спрямовані на покращення здоров'я чи захист від хвороб, можуть бути переорієнтовані для створення біологічної зброї.

Прикладом є експерименти з модифікації вірусу грипу H5N1 для підвищення його трансмісивності. Хоча це дає змогу передбачити потенційні пандемії, одночасно зростає ризик несанкціонованого використання таких даних або витоку штаму.

Вирішення цієї проблеми потребує розробки чітких міжнародних стандартів щодо публікацій, рецензування, доступу до біологічних матеріалів. Багато країн запровадили політику оцінки DURC через наукові етичні комітети та агентства біобезпеки.

Роль освіти у формуванні культури відповідального поведіння з біотехнологіями є ключовою. Дослідники мають бути обізнаними щодо потенційних загроз і брати участь у програмах з біоетики та біобезпеки.

Практична частина

Тема. Створення сценарію дій на випадок біоінциденту з вивільненням вірусного агента

Матеріали: наукові та нормативні джерела (керівництва CDC, WHO, настанови з біобезпеки в лабораторіях BSL-3), протоколи з ліквідації аварійних ситуацій, інформаційні бази про високпатогенні віруси (грип H5N1, SARS-CoV-2 тощо), шаблони оцінки біоризиків, відеоматеріали щодо аварійного реагування, приклади сценаріїв з тренувань з біобезпеки, навчальні постери та інфографіка щодо дій у разі біозагроз.

Обладнання: комп'ютер або ноутбук з доступом до Інтернету, програмне забезпечення для створення схем і презентацій (PowerPoint, Canva, Lucidchart), інтерактивна панель або проектор (за потреби), шаблони для опису сценарію, таблиці для оцінки ризику та наслідків, засоби для моделювання

інфографіки або інструкцій, зошит або блокнот для фіксації ключових етапів сценарію.

Завдання 1. Ідентифікація інциденту.

1. Опишіть, як ви виявите біоінцидент:
 - Які ознаки можуть свідчити про вивільнення вірусу?
 - Які заходи ви вживете для швидкої оцінки ризику (аналіз систем моніторингу, зовнішній вигляд пошкодженого контейнера)?
2. Створіть список першочергових дій:
3. Активуйте лабораторну тривогу.
4. Зупиніть роботу вентиляції для запобігання поширенню аерозолю.
5. Попередьте всіх присутніх про небезпеку.

Завдання 2. Локалізуйте інцидент.

1. Оцініть заходи для локалізації:
 - опишіть, як герметизувати приміщення,
 - розробіть план дезінфекції поверхонь та повітря.
2. Підготуйте перелік необхідних засобів:
 - засоби індивідуального захисту (ЗІЗ): маски, рукавички, комбінезони,
 - дезінфектанти для обробки приміщення.

Завдання 3. Медичне реагування.

1. Опишіть дії щодо персоналу:
 - як організувати ізоляцію співробітників?
 - які заходи вжити для моніторингу здоров'я (тестування на інфекцію, медичний огляд)?
2. Розробіть план надання медичної допомоги:
 - що робити у випадку виявлення симптомів зараження?

Завдання 4. Комунікація з відповідними службами.

1. Складіть список служб, які потрібно повідомити (локальні органи охорони здоров'я, МОЗ, екстрені служби).
2. Опишіть, яку інформацію передати:
 - деталі інциденту,
 - тип вірусу,
 - заходи, які вже вжито.

Завдання 5. Проведіть аналіз наслідків та профілактику.

1. Запропонуйте критерії оцінки масштабів інциденту:
 - скільки осіб могли постраждати?
 - який радіус потенційного зараження?
2. Розробіть рекомендації для запобігання подібним інцидентам:
 - покращення протоколів безпеки,
 - проведення додаткового навчання персоналу.

Завдання 6. Оформіть звіт.

1. Створіть детальний звіт, який включає:
 - ваш сценарій дій на кожному етапі,
 - список ресурсів, необхідних для ліквідації інциденту,
 - рекомендації для майбутнього запобігання біоінцидентам.

Контрольні запитання

1. Які основні законодавчі акти України регламентують сферу біобезпеки та біоетики?
2. У чому полягає роль Закону України «Про біобезпеку та біологічний захист» у регулюванні поводження з патогенами та ГМО?
3. Які міжнародні документи слугують етичною основою біобезпеки в Україні? Назвіть приклади.
4. Які державні органи в Україні відповідальні за реалізацію політики у сфері біобезпеки?
5. Що таке Кодекс біоетики і яке його значення в контексті біомедичних досліджень?
6. Як нормативно-правова база адаптується в умовах надзвичайних ситуацій або воєнного стану?
7. У чому полягає принцип етичного регулювання досліджень із залученням тварин в Україні?
8. Яке місце посідає Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» у системі біоетики?
9. Які механізми контролю наукових досліджень подвійного використання передбачені в українському праві?
10. Чому міждисциплінарний підхід є необхідним у забезпеченні біобезпеки на національному рівні?

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Blair E. D., Ring C. J. A. Genetically engineered viruses: development and applications. London : Garland Science, 2023. 296 p.
- Chung Y. H., Cai H., Steinmetz N. F. Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications. Advanced drug delivery reviews. 2020. Vol. 156. P. 214–235.
- Coffey A. Bacterial viruses: exploitation for biocontrol and therapeutics. Norfolk : Caister Academic Press, 2020. 704 p.
- Federico M. Lentivirus Gene Engineering Protocols. New York : Humana Press, 2010. 240 p.
- Gleba Y. Plant viral vectors. Heidelberg : Springer, 2014. 194 p.
- Goldsmith C. S., Miller S. E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. Clinical microbiology reviews. 2009. Vol. 22, No 4, P. 552–563.
- Gunter J., Lindskog E., Karol Ł., Galliher P. Biopharmaceutical processing: development design and implementation of manufacturing processes. Amsterdam : Elsevier, 2018. 1275 p.
- Hakeem K. R., Kamli M., Sabir J. S. M., Alharby H. F. Diverse applications of nanotechnology in the biological sciences: essential tool in agri-business and health care systems. New York : Apple Academic Press, 2022. 368 p.
- Hassan Z., Khan G. Molecular Techniques for Viruses. Singapore : Springer, 2024. 91 p.
- Hurst C. J. Biological Role of a Virus. Cham: Springer; 2022. 383 p

Khudyakov Y. E., Pumpens P. Viral nanotechnology. Boca Raton : CRC Press, 2016. 524 p.

Manchester M., Steinmetz N. F. Viruses and nanotechnology. Berlin : Springer-Verlag, 2009. 144 p.

Manfredsson F. P Benskey M. J. Viral vectors for gene therapy: methods and protocols. Springer New York : Humana Press, 2019. 328 p.

Matthews Q. L., Gu L., Krendelchikov A., Li Z. C. Viral vectors for vaccine development. Novel gene therapy approaches. InTech, 2013. 406 p.

Malysheva, K., Spasyuk, I., Pavlenko, O., Stoika, R., & Korchynskyi, O. Generation of optimized preparations of bone morphogenetic proteins for bone regeneration. The Ukrainian Biochemical Journal. 2016. Vol. 88, No 6. P. 87-97.

Pokorski J. K., Steinmetz N. F. The art of engineering viral nanoparticles. Molecular pharmaceutics. 2011. Vol. 8, No. 1. P. 29–43.

Shegokar R., Pathak Y. Viral drug delivery systems: advances in treatment of infectious diseases. Cham : Springer, 2023. 409 p.

Steinmetz N. F. Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine. 2010. Vol. 6, No 5. P. 634–641.

Tennant P., Fermin G., Foster J. E. Viruses: molecular biology host interactions and applications to biotechnology. London : Academic Press, 2018. 392 p.

Varanda C., Materatski P. The application of viruses to biotechnology. Basel Switzerland : Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. 306 p.

Vanniasinkam T., Tikoo S. K., Samal SK. Viral vectors in veterinary vaccine development: a textbook. Cham : Springer, 2021. 230 p.

Wang S., Liang B., Wang W., Li L., Feng N., Zhao Y., Wang T., Yan F. Yang S., Xia X. Viral vectored vaccines: design, development, preventive and therapeutic applications in human diseases. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2023. Vol. 8, No. 149.

Yang L., Gu X., Yu J., Ge S., Fan X. Oncolytic Virotherapy: From Bench to Bedside. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2021. Vol. 9, 790150.

Yildiz I., Shukla S., Steinmetz, N. F. Applications of viral nanoparticles in medicine. Current opinion in biotechnology. 2011. Vol. 22, No 6. P. 901–908.

РЕКОМЕНДОВАНА ЛІТЕРАТУРА

Будзанівська І.Г., Шевченко Т.П., Коротєєва Г.В., О.В. Молчанець, Харіна А.В., Компанець Т.А., Андрійчук О.М., Шевченко О.В., Кондратюк О.А. Вірусологія: підручник. Київ : ВПЦ «Київський університет», 2019. 351 с.

Гудзь С. П., Перетятко Т. Б., Павлова Ю. О. Загальна вірусологія : навч. посіб. Львів : Видавничий центр ЛНУ імені Івана Франка, 2010. 264 с.

Поліщук В. П., Будзанівська І. Г., Шевченко Т. П., Андрійчук О. М., Компанець Т. А., Кондратюк О. А., Коротєєва Г. В., Молчанець О. В., Харіна А. В., Шевченко О. В. Вірусологія : навч. посіб. Київ : ЦП «Компринт», 2017. 242 с.

Сидоров Ю. І., Влязло Р. Й., Новіков В. П. Процеси і апарати мікробіологічної та фармацевтичної промисловості : навч. посіб. Львів : Інтелект-Захід, 2008. 736 с.

Чуєшов В. І., Гладух Є. В., Сайко І. В., Ляпунова О. О., Січкара А. А., Крутських Т. В., Рубан О. А. Технологія ліків промислового виробництва : підруч. для студ. вищ. навч. закл. : в 2-х ч. Харків : НфаУ Оригінал, 2012. Ч. 1. 694 с.

Чуєшов В. І., Гладух Є. В., Сайко І. В., Ляпунова О. О., Січкара А. А., Крутських Т. В., Рубан О. А. Технологія ліків промислового виробництва : підруч. для студ. вищ. навч. закл. : в 2-х ч. Харків : НфаУ Оригінал, 2013. Ч. 2. 638 с.

Шамрай С. М., Леонт'єв Д. В. Вірусологія : підручник. Харків : Харківський національний педагогічний університет імені Г. С. Сковороди, 2020. 241 с.

Шмараков І. О., Марченко М. М., Співак М. Я. Основи вірусології : підруч. для студ. біол. спец. / за ред. В. С. Підгорського. Чернівці : Чернівецький національний університет, 2011. 320 с.

Шевченко Т. П., Будзанівська І. Г., Поліщук В. П. Віруси мікроорганізмів : курс лекцій. Київ : ЦОП «Глобус», 2013. 148 с.

Blair E. D., Ring C. J. A. Genetically engineered viruses: development and applications. London : Garland Science, 2023. 296 p.

Chung Y. H., Cai H., Steinmetz N. F. Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications. Advanced drug delivery reviews. 2020. Vol. 156. P. 214–235.

Coffey A. Bacterial viruses: exploitation for biocontrol and therapeutics. Norfolk : Caister Academic Press, 2020. 704 p.

Federico M. Lentivirus Gene Engineering Protocols. New York : Humana Press, 2010. 240 p.

Gleba Y. Plant viral vectors. Heidelberg : Springer, 2014. 194 p.

Goldsmith C. S., Miller S. E. Modern uses of electron microscopy for detection of viruses. Clinical microbiology reviews. 2009. Vol. 22, No 4, P. 552–563.

Gunter J., Lindskog E., Karol Ł., Galliher P. Biopharmaceutical processing: development design and implementation of manufacturing processes. Amsterdam : Elsevier, 2018. 1275 p.

Hakeem K. R., Kamli M., Sabir J. S. M., Alharby H. F. Diverse applications of nanotechnology in the biological sciences: essential tool in agri-business and health care systems. New York : Apple Academic Press, 2022. 368 p.

Hassan Z., Khan G. Molecular Techniques for Viruses. Singapore : Springer, 2024. 91 p.

Hurst C. J. Biological Role of a Virus. Cham: Springer; 2022. 383 p

Khudyakov Y. E., Pumpens P. Viral nanotechnology. Boca Raton : CRC Press, 2016. 524 p.

Manchester M., Steinmetz N. F. Viruses and nanotechnology. Berlin : Springer-Verlag, 2009. 144 p.

Manfredsson F. P Benskey M. J. Viral vectors for gene therapy: methods and protocols. Springer New York : Humana Press, 2019. 328 p.

Matthews Q. L., Gu L., Krendelchtchikov A., Li Z. C. Viral vectors for vaccine development. Novel gene therapy approaches. InTech, 2013. 406 p.

Malysheva, K., Spasyuk, I., Pavlenko, O., Stoika, R., & Korchynskyi, O. Generation of optimized preparations of bone morphogenetic proteins for bone regeneration. *The Ukrainian Biochemical Journal*. 2016. Vol. 88, No 6. P. 87-97.

Pokorski J. K., Steinmetz N. F. The art of engineering viral nanoparticles. *Molecular pharmaceutics*. 2011. Vol. 8, No. 1. P. 29–43.

Shegokar R., Pathak Y. Viral drug delivery systems: advances in treatment of infectious diseases. Cham : Springer, 2023. 409 p.

Steinmetz N. F. Viral nanoparticles as platforms for next-generation therapeutics and imaging devices. *Nanomedicine : nanotechnology, biology, and medicine*. 2010. Vol. 6, No 5. P. 634–641.

Tennant P., Fermin G., Foster J. E. Viruses: molecular biology host interactions and applications to biotechnology. London : Academic Press, 2018. 392 p.

Varanda C., Materatski P. The application of viruses to biotechnology. Basel Switzerland : Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2021. 306 p.

Vanniasinkam T., Tikoo S. K., Samal SK. Viral vectors in veterinary vaccine development: a textbook. Cham : Springer, 2021. 230 p.

Wang S., Liang B., Wang W., Li L., Feng N., Zhao Y., Wang T., Yan F. Yang S., Xia X. Viral vectored vaccines: design, development, preventive and therapeutic applications in human diseases. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2023. Vol. 8, No. 149.

Yang L., Gu X., Yu J., Ge S., Fan X. Oncolytic Virotherapy: From Bench to Bedside. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2021. Vol. 9, 790150.

Yildiz I., Shukla S., Steinmetz, N. F. Applications of viral nanoparticles in medicine. *Current opinion in biotechnology*. 2011. Vol. 22, No 6. P. 901–908.

ІНФОРМАЦІЙНІ РЕСУРСИ

Львівська національна наукова бібліотека України імені В. Стефаника. URL: <https://www.lsl.lviv.ua/index.php/uk/golovna2/>

Львівська обласна універсальна наукова бібліотека. URL: <http://www.lounb.org.ua/>

Національна бібліотека України ім. В. І. Вернадського. URL: <http://www.nbuv.gov.ua/>

The National Center for Biotechnology Information. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

WorldCat. The world's largest library catalog. URL: <https://www.worldcat.org/>

Wiley. Online Library. URL: <https://onlinelibrary.wiley.com/>

World Health Organization. URL: <https://www.who.int/> Viral Genomes. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/viruses/>

ViralZone. URL: <https://viralzone.expasy.org/>

Coursera. Foundations in Virology and Vaccinology. URL: <https://www.coursera.org/specializations/foundations-in-virology-and-vaccinology>

Virology Articles. URL: <https://www.nature.com/subjects/virology/nature>

Nature Reviews Microbiology. URL: <https://www.nature.com/nrmicro/>

Frontiers in Microbiology. URL:
<https://www.frontiersin.org/journals/microbiology>
IntechOpen. URL: <https://www.intechopen.com/>
Journal of Virology. URL: <https://journals.asm.org/journal/jvi> ScienceDirect.
URL: <https://www.sciencedirect.com/>
Moodle. Використання вірусів у біотехнологічних виробництвах. URL:
<http://moodle.lvet.edu.ua/moodle/course/view.php?id=2983>