

**Міністерство освіти і науки України
Львівський національний університет ветеринарної
медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького**

Кафедра мікробіології та вірусології

О.С. Калініна

**Лабораторні заняття
і тематична самостійна робота
з навчальної дисципліни
«ВІРУСОЛОГІЯ»**

Частина 1. Загальна вірусологія

**Навчально-методичний посібник
для студентів ІІІ курсу ФВГЕП**



Львів – 2020

**Міністерство освіти і науки України
Львівський національний університет ветеринарної
медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького**

Кафедра мікробіології та вірусології

**Лабораторні заняття
і тематична самотійна робота
з навчальної дисципліни
«ВІРУСОЛОГІЯ»**

Частина 1. Загальна вірусологія

**Навчально-методичний посібник
для студентів III курсу ФВГЕП**

Студент _____
Прізвище, ім'я, по-батькові

підгрупа _____ **курс** _____

факультет _____

Викладач _____
Прізвище, ім'я, по-батькові

_____ **навчальний рік**

УДК 619:578(076.5)

Рецензент: *Падовський А.І.*, доцент кафедри епізоотології
ЛНУВМБ імені С.З.Гжицького, кандидат
ветеринарних наук

Укладач:

Калініна О.С.

Лабораторні заняття і тематична самостійна робота з навчальної дисципліни «Вірусологія». Розділ 1. Загальна вірусологія. Навчально-методичний посібник для студентів III курсу ФВГЕП. Львів: ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького, 2020. 93 с.

Навчально-методичний посібник складено згідно з програмою навчальної дисципліни «Вірусологія». Викладено методологію лабораторних досліджень за вірусних хвороб тварин.

Рекомендовано до видання на засіданні кафедри мікробіології та вірусології 27 червня 2019 р., протокол № 17.

Рекомендовано до видання на засіданні методичної комісії факультету ветеринарної гігієни, екології та права ЛНУВМБ імені С.З. Гжицького «21» січня 2020 р., протокол № 5.

© О.С. Калініна, 2020

Інформація про пропуски занять

План			Пропущено		
Лекції	Лабор.	Всього	Лекції	Лабор.	Всього
5-й семестр					
16 год 2 год – 12,5%	32 год 2 год – 6,3%	48 год 2 год – 4,2%	___ год ___ %	___ год ___ %	___ год ___ %

Успішність

Назви розділів	Поточні оцінки, САЗ	Поточний контроль (ПК)
5-й семестр		
Розділ 1. Фундаментальні властивості вірусів та методи індикації їх у патологічному матеріалі від хворих і загиблих тварин		
Розділ 2. Особливості патогенезу вірусних інфекцій та протівірусного імунітету, серологічні реакції		

Дата: _____

Підпис викладача _____

Список умовних скорочень

в/в	– внутрішньовенно
в/м	– внутрішньом'язово
ВРХ	– велика рогата худоба
в/ч	– внутрішньочеревно
в/ш	– внутрішньошкірно
ГАО	– гемаглютинувальна одиниця
ЕД50	– 50 %-ва ефективна доза
ЕМ	– електронна мікроскопія
ЗІЕФ	– зустрічний імуноелектрофорез
ІЕМ	– імуноелектронна мікроскопія
і/н	– інтраназально
і/т	– інтратрахеально
і/ц	– інтрацеребрально
ІФА	– імуноферментний аналіз
ІХА	– імунохроматографічний аналіз
мкг	– мікрограм
мкм	– мікромметр
нм	– наномметр
НСК	– нормальна сироватка кроля
ОД	– одиниця дії
пг	– пікограм
ПЛР	– полімеразна ланцюгова реакція
п/ш	– підшкірно
РГА	– реакція гемаглютинації
РГАд	– реакція гемадсорбції
РДП	– реакція дифузійної преципітації
РЗГА	– реакція затримки гемаглютинації
РЗГАд	– реакція затримки гемадсорбції
РЗК	– реакція зв'язування комплекменту
РІФ	– реакція імунофлуоресценції
РН	– реакція нейтралізації
РНГА	– реакція непрямой гемаглютинації
РНІФ	– реакція непрямой імунофлуоресценції
ФБР	– фосфатно-буферний розчин
ХАО	– хоріон-алантоїсна оболонка
ЦНС	– центральна нервова система
ЦПД	– цитопатогенна дія
pH	– показник концентрації водневих іонів

Т е м а 1

Організація та обладнання вірусологічної лабораторії. Техніка безпеки і правила роботи з вірусомісним матеріалом. Загальні принципи лабораторного дослідження за вірусних хвороб тварин

Кількість годин: 2

Мета заняття. Вивчити природу вірусів та їхні основні властивості. Ознайомитися зі структурою, обладнанням та режимом роботи вірусологічної лабораторії. Вивчити правила роботи з вірусомісним матеріалом. Засвоїти загальні принципи лабораторного дослідження за вірусних хвороб тварин.

Матеріальне забезпечення. Ламінарний бокс, автоклав, сушильна шафа, термостат, холодильник, вакуум-насос, водяна баня, центрифуга, фільтрувальні установки з набором фільтрів, стерилізатор, магнітна мішалка, світловий і люмінесцентний мікроскопи, аналітична вага, рН-метр, мікротитратор Такачі, скляний посуд, пластикові планшети для серологічних реакцій, фарфорова ступка, набір інструментів, гумові пробки та груші, гумові рукавиці, середовища і розчини для культури клітин, 0,9%-й розчин NaCl, 50%-й розчин гліцерину, живильні середовища (МПА, МПБ, МППБ, середовище Сабуро), спиртівка, набори діагностичних препаратів.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Природа вірусів

*Віруси є облигатними (абсолютними) внутрішньоклітинними паразитами на генетичному рівні. Це неклітинна форма життя, що існує в неактивному стані у вигляді **віріонів**. Віріон складається з молекули нуклеїнової кислоти (ДНК або РНК) і білкової оболонки – **капсиду**, а в складних вірусів є ще зовнішня ліпопротеїнова оболонка – **суперкапсид**. На відміну від інших організмів, генетичний апарат яких представлений дволанцюговою ДНК, носієм генетичної інформації у вірусів можуть бути як ДНК, так і РНК. Відповідно віруси поділяються на *ДНК-геномні* та *РНК-геномні*, причому ~ 80% вірусів тварин містять РНК. Нуклеїнові кислоти вірусів надзвичайно *різноманітні*: одно- і дволанцюгові, лінійні та кільцеві, фрагментовані й навіть роз'єднані. Разом з тим, генетичний код є універсальним – однаковим для бактерій, грибів, найпростіших, тварин, рослин і вірусів.*

Кардинальною відмінністю вірусів від інших організмів, навіть найпримітивніших, є *відсутність у них власних білок-синтезувальних*

систем. Синтез вірусних білків здійснюється на рибосомах клітин. Тому віруси можуть розмножуватися тільки в живих клітинах, паразитуючи в них своєю нуклеїновою кислотою. Після проникнення віріона в клітину розпадаються його оболонки, звільняється вірусний геном, ДНК клітини блокується, всі інші органели функціонують за генетичною інформацією вірусу. Заражена клітина зі своїх сировинних матеріалів та своїми системами синтезує вірусні компоненти – численні молекули вірусної нуклеїнової кислоти і вірусних білків, які під дією міжмолекулярних сил об'єднуються, формуючи віріони потомства. Цей унікальний спосіб розмноження вірусів називається *диз'юнктивною (роз'єднаною) репродукцією*.

Отже, **віруси** – це автономні генетичні структури, які здатні функціонувати та репродукуватися лише в чутливих до них клітинах тварин, рослин, грибів, найпростіших, бактерій та архей.

У лабораторних умовах віруси культивують на чутливих *тест-об'єктах*: лабораторних тваринах, курячих ембріонах і культурі клітин, яка знімає видові обмеження та є найдосконалішою біологічною системою для культивування вірусів.

Структура і режим роботи вірусологічної лабораторії

Основні завдання вірусологічної лабораторії – здійснювати діагностику вірусних хвороб, контролювати захворюваність тварин, стан і напруженість постінфекційного й поствакцинального імунітету, брати участь в організації та проведенні профілактичних заходів і в ліквідації вірусних хвороб тварин.

Вірусологічна лабораторія повинна мати такі окремі приміщення:

- 1) для прийому патматеріалу;
- 2) для попередньої обробки патматеріалу;
- 3) для знищення інфекційного матеріалу;
- 4) віварій;
- 5) ізолятор для заражених лабораторних тварин;
- 6) склад лабораторного обладнання і реактивів;
- 7) для миття посуду;
- 8) автоклавна;
- 9) для стерильного посуду;
- 10) для апаратури;
- 11) для приготування живильних середовищ і розчинів;
- 12) термостатна кімната;
- 13) для серологічних досліджень;
- 14) окремі бокси для отримання культури клітин, для зараження культури клітин, курячих ембріонів і лабораторних тварин.

При роботі з вірусомісним матеріалом треба забезпечити виконання таких *вимог*: 1) не допускати розсіювання вірусів у навколишньому середовищі; 2) попередити контамінацію вірусомісного матеріалу сторонньою мікрофлорою; 3) забезпечити особисту техніку безпеки.

У боксі працюють у стерильному халаті, масці, шапочці, а в деяких випадках надівають захисні окуляри, гумові рукавиці та фартух. Обов'язково змінюють взуття. Заборонено виходити за межі лабораторії в спецодязі. Піпетки, предметні скельця і посуд, які використовують при роботі з інфекційним матеріалом, складають у банки з дезрозчином, інструменти кип'ятять. Після закінчення роботи столи обробляють дезрозчином і вмикають бактерицидну лампу (стерилізація УФ-променями). Відпрацьований інфекційний матеріал, трупи дрібних тварин і залишки курячих ембріонів поміщають у пакети з вощеного паперу та *автоклавають* у металевих контейнерах 30 хв при тиску 1–1,5 атм. Трупи великих тварин загортають у папір і переносять у трупоспалювач. Халати, шапочки та маски автоклавають; гумові рукавиці, фартух і спецвзуття знезаражують 5%-м розчином хлораміну; захисні окуляри занурюють у 70%-й спирт. Не рідше одного разу на тиждень проводять дезінфекцію боксів *парами формаліну* (30 г калію перманганату + 200 см³ формаліну). Крім того, щоденно роблять вологе прибирання із застосуванням дезрозчинів. Для *дезінфекції* використовують розчини формальдегіду, хлораміну (0,5–5%-ві), фенолу, лізолу (3–5%-ві), натрію гідроксиду (2–3%-й) та ін.

Штами вірусів, які надходять до лабораторії для виробничих цілей або виділяють із досліджуваного матеріалу, зберігають у холодильнику під замком із пломбою або печаткою за *низьких температур* (–20°C, –30°C і –70°C). Для збереження інфекційної активності вірусів за глибокого заморожування впродовж кількох років до вірусовмісної суспензії додають *стабілізатори*: 10–30% інактивованої сироватки крові, 0,5–1,5% желатини, 20–50% знежиреного молока, 1–5% пептону та ін. Культуральну рідину, яка містить 2–10% сироватки крові або гідролізату лактоальбуміну, заморожують без додавання стабілізаторів. Найкращим способом консервування вірусовмісного матеріалу є *ліофілізація*, яка полягає у висушуванні вірусу в замороженому стані в умовах вакууму. Цей метод забезпечує стандартність препарату і тривале збереження його біологічної активності.

Загальні принципи лабораторного дослідження за вірусних хвороб тварин

Постановка діагнозу на вірусні хвороби тварин складається з *двох етапів*: клініко-епізоотологічний і лабораторний.

Клініко-епізоотологічна діагностика проводиться безпосередньо в господарстві на основі аналізу клінічних симптомів хвороби, патологоанатомічних змін органів і тканин та епізоотологічних даних (відомості про види й вікові групи захворілих тварин, швидкість поширення інфекції, захворюваність, летальність тощо). Аналіз усіх цих даних дає змогу поставити лише попередній діагноз, тому що при багатьох вірусних хворобах вони можуть бути подібними. Крім того, трапляються випадки атипичного перебігу захворювання, латентних та асоційованих (змішаних) інфекцій.

Вирішальне значення в постановці остаточного діагнозу належить **лабораторній діагностиці**, яка проводиться в спеціалізованій лабораторії на основі дослідження патматеріалу від хворих і загиблих тварин. Враховуючи попередній діагноз, складають план лабораторного дослідження патматеріалу.

Лабораторна діагностика вірусних хвороб тварин базується на таких методах: 1) *експрес-методи*; 2) *вірусологічні методи*; 3) *методи серологічної (ретроспективної) діагностики*. Вибір конкретного методу вирішується в кожному окремому випадку залежно від характеру захворювання, підозрюваного збудника і можливостей лабораторії.

Експрес-методи оснований на швидкому виявленні вірусу або його компонентів безпосередньо в патматеріалі. До цієї групи належать такі методи: 1) виявлення *віріонів* вірусів методами електронної мікроскопії, а також імуноелектронної та світлової мікроскопії (вірусоскопія); 2) виявлення внутрішньоклітинних *тілець-включень* вірусів методом світлової мікроскопії; 3) виявлення вірусних *антигенів* у серологічних реакціях (РІФ, ІФА, РЗК, РДП, РЗГА, РНГА, ІХА та ін.); 4) виявлення вірусних *нуклеїнових кислот* молекулярно-генетичними методами (метод ДНК-зондів і ПЛР).

Вірусологічні методи ґрунтуються на виділенні вірусу з патматеріалу шляхом зараження чутливих лабораторних об'єктів та його наступній ідентифікації в серологічних реакціях. Для виділення вірусу використовують *лабораторних тварин, курячі ембріони і культури клітин*. Якщо за первинного зараження досліджуваним матеріалом лабораторні об'єкти не реагують на вірус, це зовсім не

означає, що збудника нема. Відсутність реакції на зараження за наявності вірусу в патматеріалі можна пояснити двома причинами: 1) недостатньою адаптацією вірусу до лабораторної моделі; 2) низькою концентрацією вірусу в патматеріалі. У такому разі проводять 3–4 «сліпі» пасажі (последовні перезараження лабораторних об'єктів), перш ніж проявиться інфекційна дія вірусу. Ідентифікують виділений вірус у серологічних реакціях (РН, РІФ, ІФА, РЗГА, РНГА, РЗГАд, РДП, РЗК та ін.). Вірусологічні методи в лабораторній діагностиці вірусних хвороб є найголовнішими, проте вони потребують багато часу, особливо в разі проведення «сліпих» пасажів.

Серологічна (ретроспективна) діагностика оснований на виявленні антитіл у парних сироватках крові в серологічних реакціях (РН, РЗГА, РЗК, РДП та ін.). *Парні сироватки крові* беруть в одних і тих самих тварин двічі: на початку і наприкінці хвороби з інтервалом 2–3 тижні. Зростання титру антитіл у другій пробі сироватки в 4 рази і більше свідчить про перенесену інфекцію. Недоліком методів серологічної діагностики є їхня ретроспективність, тому що до моменту постановки діагнозу тварини знаходяться на стадії реконвалесценції (видужування).

Самостійна робота. Ознайомитися з обладнанням вірусологічної лабораторії. Відпрацювати навички роботи з піпеткою і гумовою грушею.

Результат: _____

Контрольні запитання

1. Що таке віруси? 2. Які властивості клітинних форм життя притаманні вірусам? 3. У чому полягають докорінні відмінності вірусів від клітинних форм життя? 4. Вірус і віріон – це синоніми? 5. Яка роль вірусів у інфекційній патології тварин, рослин і людини? 6. Які основні завдання вірусологічної лабораторії? 7. Охарактеризуйте структуру вірусологічної лабораторії. 8. Назвіть обладнання вірусологічної лабораторії. 9. Який режим роботи вірусологічної лабораторії? 10. Яких основних вимог необхідно дотримуватися при роботі з вірусомісним матеріалом? 11. Які методи дезінфекції застосовують у вірусологічній лабораторії? 12. Як зберігають вірусні штами в лабораторії? 13. Як культивують віруси в лабораторних умовах? 14. Як ставлять діагноз на вірусні хвороби тварин? 15. Як проводять клініко-епізоотологічну діагностику вірусних хвороб тварин? 16. Які ви знаєте методи лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин? 17. Охарактеризуйте експрес-методи лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин. 18. У чому полягають вірусологічні методи лабораторної діагностики вірусних хвороб тварин? 19. У чому суть серологічної (ретроспективної) діагностики вірусних хвороб тварин?

Т е м а 2

Відбір патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин для лабораторного дослідження

Кількість годин: 2

Мета заняття. Вивчити правила відбору патматеріалу для лабораторного дослідження на вірусних хвороб тварин. Засвоїти методи консервування патматеріалу і транспортування його в лабораторію. Освоїти техніку первинної обробки вірусомісного матеріалу.

Матеріальне забезпечення. Флакони з пробамі патматеріалу, стерилізатор зі стерильними інструментами, фарфорові ступки, кварцовий пісок, піпетки, гумові груші, 0,9%-й розчин NaCl, антибіотики (пеніцилін, стрептоміцин), живильні середовища (МПА, МПБ, МППБ, середовище Сабуро), дезрозчин, пробірки, гумові пробки, центрифуга, фільтри, спиртівка.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Відбір клінічного і патологоанатомічного вірусомісного матеріалу

У лабораторній діагностиці вірусних хвороб тварин точність діагнозу залежить передусім від правильного відбору патматеріалу від хворих, загиблих або вимушено забитих тварин і швидкого транспортування його в лабораторію. *Загальне правило* – патматеріал

потрібно брати по можливості *стерильно*, якнайскоріше після появи чітких клінічних ознак хвороби, коли концентрація вірусу є максимальною, або не пізніше 2–4 год після загибелі, щоб уникнути дисемінації кишкової мікрофлори (внаслідок послаблення бар'єрної функції кишечника) та посмертних змін тканин.

Патматеріал беруть із урахуванням *тропізму вірусу* (тобто здатністю репродукуватися в певних типах клітин) і шляхів виділення його з організму в різні стадії хвороби. За тропізмом віруси поділяються на *5 основних груп*: 1) пневмотропні – уражають клітини слизової оболонки верхніх дихальних шляхів і легень (віруси грипу); 2) нейротропні – уражають нервові клітини (збудник сказу); 3) дерматропні (епітеліотропні) – уражають клітини шкіри і слизових оболонок (віруси віспи); 4) політропні – розмножуються в багатьох типах клітин (збудник інфекційного ринотрахеїту ВРХ); 5) пантропні – розмножуються в усіх типах клітин (збудник класичної чуми свиней).

Від *хворих* тварин відбирають такий патматеріал: секрети (носовий, вагінальний, цервікальний); змиви зі слизових оболонок; слина; стінки і вміст везикул, пустул, афт; зіскрібки зі шкіри і слизових оболонок; кал; сеча; кров (цільна дефібринована; «лакова» – в суміші з дистильованою водою 1:1; цільна з антикоагулянтом – гепарином або натрію цитратом; зсіла). Кров використовують для ізоляції вірусів (насамперед пантропних, а також політропних). Від *загиблих* тварин беруть паренхіматозні органи, лімфовузли, слизові оболонки респіраторного і травного трактів, шматочки новоутворень, головний та спинний мозок. Для *ретроспективної діагностики* беруть парні сироватки крові (без антикоагулянту, з інтервалом 2–3 тижні).

Консервування і транспортування патматеріалу

Узятий патматеріал потрібно якнайскоріше законсервувати, щоб зберегти вірус, оскільки його титр за відсутності живих клітин швидко знижується. Найкращим методом консервування патматеріалу є використання термосів з *охолоджувальними сумішами*: 1) танучий лід (2–4°C, за респіраторних інфекцій); 2) 3 частини льоду та 1 частина кухонної солі (–15–20°C, найбільш поширений метод); 3) суміш рівних об'ємів сухого льоду (твердої вуглекислоти) й етилового спирту (–70°C); 4) сухий лід (–79°C); 5) рідкий азот (–196°C, за хвороби Марека).

Для консервування шматочків органів і тканин можна застосовувати 50%-й розчин *гліцерину* або *стабілізувальне середовище*, яке складається з 0,9%-го розчину NaCl, антибіотиків і білкового стабілізатора (0,5% желатини або 0,5–1% альбуміну сироватки крові ВРХ). При такому методі консервування патматеріал посилають за температури танучого льоду (2–4°C). Треба мати на увазі, що патматеріал, консервований 50%-м гліцерином, не придатний для дослідження в РІФ, консервування вірусовмісних рідин і зараження лабораторних об'єктів.

Пробірки і флакони з пробами патматеріалу етикетують, поміщають у металевий контейнер, який кладуть у термос і обкладають мішечками з охолоджувальною сумішшю. Проби, консервовані гліцерином або стабілізувальним середовищем, посилають за температури танучого льоду (2–4°C). Термос опечатують, прикріплюють етикетку з картону або фанери, на якій вказують господарство, вид тварини, перелік матеріалу і дату. На патматеріал пишуть супровідну, де подають повну інформацію про тварину, від якої взяті проби, епізоотологічні дані господарства, вид матеріалу, попередній діагноз, прізвище спеціаліста і дату. Цими даними керуються при виборі напрямку лабораторного дослідження.

Доставлені в лабораторію проби треба негайно використати для виділення вірусу. Якщо через якісь причини дослідження відкладається, патматеріал потрібно зберігати при –20–70°C. Слід уникати багаторазового заморожування й відтавання патматеріалу, оскільки це призводить до інактивації вірусу.

Підготовка вірусовмісного матеріалу для дослідження

Для отримання 10%-ї вірусовмісної суспензії тканину ретельно подрібнюють ножицями, розтирають у ступці з додаванням стерильного кварцового піску, розводять ФБР або розчином Хенкса з розрахунку 1:10, центрифугують при 2–3 тис. об/хв упродовж 15–30 хв. Надосадову рідину (вірусовмісну суспензію) переносять у флакони і додають антибіотики для деконтамінації: пеніцилін 100–1000 ОД/мл і стрептоміцин 100–1000 мкг/мл (доза залежать від виду тканини). Після експозиції 30–60 хв за кімнатної температури ставлять *бактеріологічний контроль*: на середовища для аеробів, анаеробів та плісневих грибів (МПА, МПБ, МППБ, середовище Сабуро). За негативного результату бактеріологічного контролю вірусовмісну суспензію використовують для зараження лабораторних об'єктів, а в разі позитивного результату її повторно обробляють

антибіотиками і знову перевіряють на стерильність. У рідкісних випадках вірусомісну суспензію звільняють від мікрофлори пропусканням через бактеріальні фільтри (фарфорові, азбестові, мембранні), що пов'язано з частковою адсорбцією на них вірусу. Вірусомісну суспензію зберігають при $-20-70^{\circ}\text{C}$.

Підготовка патматеріалу інших видів (секрети, змиви, кал, сеча, кров тощо) включає центрифугування, обробку антибіотиками та постановку бактеріологічного контролю.

Самостійна робота. Оформити супровідну документацію на патматеріал. Приготувати вірусомісну суспензію.

Результат: _____

Контрольні запитання

1. З якою метою відбирається патматеріал від хворих і загиблих тварин? **2.** Які основні вимоги за відбору патматеріалу для лабораторного дослідження за вірусних хвороб тварин? **3.** Що таке тропізм вірусів? **4.** Як поділяються віруси за тропізмом? **5.** Які ви знаєте пневмотропні віруси? **6.** Які ви знаєте нейротропні віруси? **7.** Які ви знаєте дерматропні (епітеліотропні) віруси? **8.** Які ви знаєте політропні віруси? **9.** Які ви знаєте пантропні віруси? **10.** Дайте перелік клінічного вірусомісного матеріалу. **11.** Дайте перелік патологоанатомічного вірусомісного матеріалу. **12.** Який патматеріал відбирають за респіраторних хвороб тварин? **13.** Який патматеріал відбирають за нейроінфекцій тварин? **14.** Який патматеріал відбирають за хвороб, що супроводжуються ураженням шлунково-кишкового тракту? **15.** Який патматеріал відбирають за хвороб, спричинених дерматропними (епітеліотропними) вірусами? **16.** Який патматеріал відбирають за хвороб, спричинених політропними вірусами? **17.** Який патматеріал відбирають за хвороб, спричинених пантропними вірусами? **18.** З якою метою у тварин беруть кров? **19.** Що таке парні сироватки крові та яка мета їхнього дослідження? **20.** Назвіть методи консервування вірусомісного матеріалу. **21.** Як проводять етикетування і транспортування патматеріалу в лабораторію? **22.** Як оформляється супровідна документація? **23.** У чому полягає первинна обробка вірусомісного матеріалу? **24.** Як позбавляють вірусомісну суспензію від бактеріальної мікрофлори? **25.** Як перевіряють вірусомісну суспензію на стерильність?

С у п р о в і д н а

У _____
лабораторію ветеринарної медицини

Адреса: _____

При цьому направляється для _____ дослідження
патологічний матеріал _____

від (вид і вік тварини) _____
яка належить (назва господарства, прізвище власника тварини)

Дата початку захворювання тварини _____

Дата загибелі _____

Клінічна картина _____

Дані патологоанатомічного розтину _____

Попередній діагноз _____

Дата відправлення патматеріалу _____

Посада і прізвище лікаря ветеринарної медицини _____

_____ Підпис _____

Тема 3

Індикація вірусів у патологічному матеріалі за наявністю віріонів і тілець-включень

Кількість годин: 2

Мета заняття. Засвоїти методи вірусоскопії та індикації тілець Бабеша–Негрі. Ознайомитися з будовою та принципом роботи електронного мікроскопа. Вивчити методи виготовлення препаратів для електронної мікроскопії.

Матеріальне забезпечення. Препарати з віріонами вірусу віспи курей і тільцями Бабеша–Негрі, світлові мікроскопи, імерсійна олія, електронний мікроскоп, електронограми віріонів вірусів різних родин.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Морфологія вірусів

Віріон – це неактивна форма існування вірусів. Розміри віріонів коливаються в широких межах: від 15 до 1400 нм ($1 \text{ нм} = 10^{-6} \text{ мм}$). **Віріон** – це метаболічно інертна вірусна частка, в якій *нуклеїнова кислота*, що представляє геном (*ДНК* або *РНК*), оточена білковою оболонкою – *капсидом*. Капсид складається зі структурних одиниць, кожна з яких містить одну або декілька молекул білка (в останньому випадку структурна одиниця поділяється на білкові субодиниці). Група структурних одиниць утворює морфологічну одиницю – *капсомер*, яку можна виявити в електронному мікроскопі. Капсомери розміщені навколо молекули нуклеїнової кислоти за спіральним або кубічним (ікосаедральним, у вигляді 20-гранника) типами симетрії.

Нуклеїнова кислота разом із капсидом утворює *нуклеокапсид*. У просто організованих вірусів віріони представлені лише нуклеокапсидами (рис. 1а). У складно організованих вірусів нуклеокапсид оточений зовнішньою ліпопротеїновою оболонкою – *суперкапсидом* (або *пеплосом*), який містить ліпіди і вуглеводи клітини-хазяїна (рис. 1б). Глікопротеїни суперкапсиду формують морфологічні субодиниці – *пепломери*, видимі в електронному мікроскопі.



Рис. 1. Віріони простих (а) і складних (б) вірусів

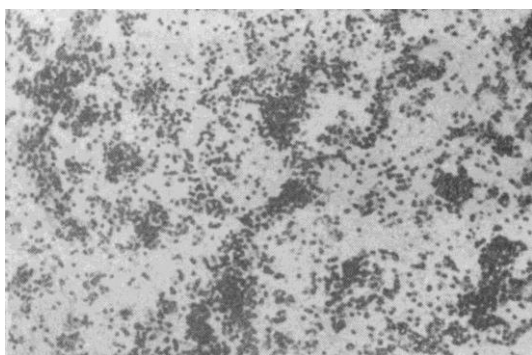
Деякі складно організовані віруси, крім суперкапсиду, мають ще одну проміжну оболонку – *білкову мембрану*, утворену матриксним (мембранним) білком, яка оточує центрально розміщений нуклеокапсид і формує разом з ним *серцевину (нуклеоїд)*. Окремі віруси, незалежно від складності їхньої організації, містять серцевину, представлену нуклеїновою кислотою в комплексі з внутрішніми білками.

Виявлення віріонів вірусів методом світлової мікроскопії (вірусоскопія)

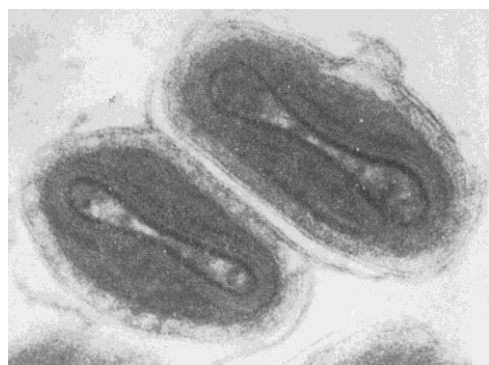
Вірусоскопія використовується для індикації в патматеріалі віріонів вірусів віспи ссавців і птиці з родини *Poxviridae*, розміри яких досягають $300\text{--}450 \times 170\text{--}260$ нм. Мазки готують із папул, везикул, пустул або кірок, у птиці – із віспяних бородавок, висушують на повітрі й перед фарбуванням поміщають на 3 хв у дистильовану воду.

Для фарбування віріонів найчастіше використовують *метод Морозова*: 1) рідина Руге – 1 хв; промивання дистильованою водою; 2) розчин таніну – 1–2 хв; промивання; 3) розчин аміачного срібла – 1–2 хв при легкому підігріванні; промивання.

Висушені препарати розглядають у світловому мікроскопі під імерсійною олією. Про присутність у досліджуваному матеріалі віріонів вірусів віспи свідчить наявність на жовтому фоні препарату великої кількості дрібних темно-коричневих тілець округлої форми, які розміщені у вигляді скупчень, рядами або дифузно (рис. 2а). Найчіткіші результати отримують при дослідженні мазків зі свіжих везикул і везикулярної рідини (до нагноєння).



а



б

Рис. 2. Віріони вірусу віспи корів за світлової (а) та електронної (б) мікроскопії

Електронна мікроскопія

Електронна мікроскопія є важливим методом ідентифікації вірусів, який дає змогу диференціювати їх за морфологією. Особливе значення цього методу при дослідженні вірусів, які важко культивуються в лабораторних умовах, а також при виділенні нових вірусів і діагностиці асоційованих інфекцій.

Електронний мікроскоп складається з вертикальної колони, в якій розміщена електронна гармата й система електромагнітних лінз, і пульта керування. Всередині колони створюється вакуум 10^{-4} – 10^{-5} мм рт. ст. Джерелом електронів є вольфрамова нитка – *катод*, при нагріванні якої струмом у декілька сотень мікроампер відбувається *термоелектронна емісія*. Потік електронів фокусується *першою електромагнітною конденсорною лінзою* в пучок, який проходить через досліджуваний об'єкт. При цьому електрони відхиляються від початкових траєкторій через різну електронну щільність частин об'єкта. Чим щільніші ділянки об'єкта, тим більша їхня розсіювальна здатність, отже, тим темнішим буде їхнє зображення на екрані. Такий змінений потік електронів фокусується і збільшується *другою електромагнітною лінзою об'єктива*, внаслідок чого формується первинне проміжне зображення об'єкта. Це зображення ще раз збільшується *третьою електромагнітною проєкційною лінзою* і потрапляє на флуоресціюючий екран, де виникає остаточне зображення об'єкта, яке можна фотографувати. Розгляд і фотографування об'єкта відбувається при збільшенні в 30–100 тис. разів. Надалі при фотодрукуванні зображення ще раз збільшується в 5–10 разів.

Досліджувані об'єкти для електронної мікроскопії мають бути у вигляді вірусомісних суспензій або ультратонких зрізів, які поміщають на *мідні предметні сітки*, покриті колодієвими, формваровими або вуглецевими *плівками-підкладками*. Для створення контрасту між досліджуваним об'єктом та фоном препарату застосовують *методи негативного і позитивного контрастування*. За негативного контрастування контрастувальна речовина високої електронної щільності оточує віріони, що мають меншу щільність, і вони виглядають світлішими на темному фоні (рис. 3). За позитивного контрастування, навпаки, віріони виглядають темнішими на світлому фоні (рис. 2б, 4).

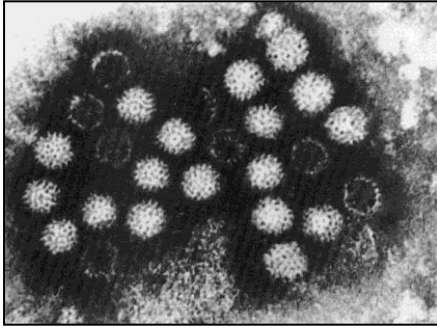


Рис. 3. Віріони вірусу африканської чуми коней, негативне контрастування



Рис. 4. Віріони вірусу фіброми кролів, позитивне контрастування

Підготовка вірусовмісного матеріалу для електронної мікроскопії залежить від концентрації вірусу, його чистоти від сторонніх баластних речовин та морфології. Електронна мікроскопія дає позитивні результати, якщо вміст віріонів у 1 см³ вірусовмісної суспензії становить не менше 10⁵–10⁶. Здебільшого потрібне попереднє очищення і концентрація вірусу.

Імуноелектронна мікроскопія (ІЕМ) ґрунтується на виявленні в електронному мікроскопі комплексів віріонів з антитілами. При взаємодії вірусу з антитілами утворюються агрегати віріонів, оточених ореолом з антитіл, які легше виявити в електронному мікроскопі, ніж поодинокі вірусні частки. Метод ІЕМ чутливіший від електронної мікроскопії в 10–100 разів. ІЕМ використовується не тільки для індикації та ідентифікації вірусів у досліджуваному матеріалі, але й для їхньої серотипізації, а також для виявлення і титрування антитіл у сироватках реконвалесцентів.

Виявлення тілець-включень вірусів

У патматеріалі хворих і загиблих тварин за багатьох вірусних хвороб виявляють *тілець-включення*. Вони локалізуються в ядрі або цитоплазмі заражених клітин, розрізняються за морфологією й тинкторіальними властивостями (базофільні, ацидофільні). *Природа* тілець-включень різноманітна залежно від виду вірусу: 1) скупчення віріонів потомства (зрілих або на стадії формування); 2) накопичення вірусних білків, що не увійшли до складу віріонів потомства; 3) клітинний матеріал, змінений унаслідок репродукції вірусу. У більшості випадків тілець-включення являють собою *вірусні «фабрики»* – місця синтезу вірусних білків і нуклеїнових кислот та складання віріонів потомства. У вірусних «фабриках» виявляють

клітинні структури (рибосоми, мембрани, мікротрубочки, осміофільні волокна).

Деякі тільця-включення отримали назви на честь авторів, які вперше виявили їх: за сказу – *тільця Бабеша–Негрі*, натуральної віспи й вісповакцини – *тільця Гварнієрі*, віспи птиці – *тільця Боллінгера*, інфекційного ларинготрахеїту птиці – *тільця Зейфреда*, чуми м'ясоїдних – *тільця Ленца*, інфекційного гепатиту м'ясоїдних – *тільця Рубарта*. Морфологія, тинкторіальні властивості та локалізація тілець-включень специфічні для кожного вірусу. Тому виявлення їх у патматеріалі хворих або загиблих тварин має певне діагностичне значення, особливо за такої хвороби, як сказ.

Тільця Бабеша–Негрі з'являються в 65–85% випадків хвороби за 3–4 доби до появи перших клінічних ознак. Вони представляють собою скупчення нуклеокапсидів ліссавірусу сказу (без суперкапсидної оболонки) в поєднанні з продуктами клітинної реакції на вірусну інфекцію. Їх виявляють у цитоплазмі заражених клітин: за *буйної* форми сказу частіше всього в клітинах амонових рогів, а за *паралітичної* форми – в довгастому і спинному мозку. Найчастіше трапляються тільця округлої форми, діаметром 4–10 мкм. Вони оточені оболонкою й містять зернисті включення (від 1 до 15).

Для індикації в патматеріалі тілець Бабеша–Негрі готують гістозрізи з різних відділів головного мозку (кора великих півкуль, мозочок, довгастий мозок, амонів ріг), які фарбують за *Муромцевим* або *Селлером* і розглядають у світловому мікроскопі під імерсійною олією. Тільця Бабеша–Негрі зафарбовуються відповідно в рожево-фіолетовий або пурпурово-червоний колір, а внутрішня зернистість – у темно-синій. Така зерниста структура дає змогу диференціювати тільця Бабеша–Негрі від інших внутрішньо-клітинних включень.

Самостійна робота. Провести мікроскопію готових препаратів із віріонами вірусу віспи курей і тільцями Бабеша–Негрі. Розглянути електроннограми вірусів різних родин.

Результат: _____

Контрольні запитання

1. Що таке віріон, яка його структура? **2.** У чому полягає відмінність між просто і складно організованими вірусами? **3.** Який принцип будови капсиду віріона? **4.** Що таке нуклеокапсид? **5.** Що таке серцевина (нуклеоїд) віріона? **6.** Що представляє собою вірусний геном? **7.** У чому полягає вірусоскопія? **8.** Розкажіть суть методу фарбування віріонів за Морозовим. **9.** З якою метою використовується електронна мікроскопія в лабораторній діагностиці вірусних хвороб тварин? **10.** Розкажіть принцип роботи електронного мікроскопа. **11.** Як виготовляють препарати для електронної мікроскопії? **12.** У чому суть позитивного і негативного контрастування препаратів для електронної мікроскопії? **13.** Яка перевага імуноелектронної мікроскопії? **14.** Що таке тільця-включення вірусів, яка їхня природа? **15.** Що являють собою тільця-включення вірусів за більшості вірусних хвороб тварин? **16.** Які ви знаєте тільця-включення вірусів? **17.** Що таке тільця Бабеша–Негрі, як їх виявляють?

Т е м а 4

Індикація в досліджуваному матеріалі вірусних нуклеїнових кислот молекулярно-генетичними методами

Кількість годин: 2

Мета заняття. Засвоїти суть методу ДНК-зондів і ПЛР.

Матеріальне забезпечення. Тест-системи для методу ДНК-зондів і ПЛР.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Метод ДНК-зондів використовують із метою виявлення вірусних ДНК- і РНК-геномів безпосередньо в досліджуваному матеріалі (патматеріал від хворих і загиблих тварин, проби з об'єктів довкілля і харчових продуктів). Він ґрунтується на молекулярній гібридизації нуклеїнових кислот – здатності одноланцюгових молекул з'єднуватися у дволанцюгові за умови їхньої комплементарності. Цей метод незамінний для ідентифікації вірусів, що не культивуються в лабораторних умовах, а також персистувальних вірусів і провірусів

(інтегровані вірусоспецифічні нуклеотидні послідовності в складі клітинних геномів).

Суть *молекулярної гібридизації* полягає в тому, що молекулу 2-нитчастої ДНК денатурують на два окремі нуклеотидні ланцюги під дією температури 80–100°C або лугу, а потім у разі тривалої експозиції при 55–65°C 1-ланцюгові ДНК взаємодіють та утворюють 2-нитчасту молекулу, ідентичну вихідній. Реакція молекулярної гібридизації може відбутися між будь-якими двома 1-ланцюговими нуклеїновими кислотами – ДНК – ДНК, ДНК – РНК, РНК – РНК, але за обов'язкової умови: якщо вони мають комплементарні нуклеотидні послідовності.

1-ланцюгові ДНК, за допомогою яких у досліджуваному матеріалі виявляють комплементарні нитки, називаються *ДНК-зондами*. Їх виготовляють на основі вектора – плазмідної ДНК, в яку вбудовують висококонсервативний фрагмент вірусної ДНК або ДНК-копію необхідного фрагмента вірусної РНК, що отримують зворотною транскрипцією. Рекомбінантну ДНК мітять радіоактивним фосфором (P^{32}) або біотином і денатурують при 80–100°C. У результаті отримують дві 1-ланцюгові молекули ДНК із вірусоспецифічними нуклеотидними послідовностями, які є ДНК-зондами.

Методика індикації вірусних нуклеїнових кислот у досліджуваному матеріалі методом ДНК-зондів складається з таких етапів:

1) отримання і мічення зонда (P^{32} або біотином);

2) виділення з досліджуваного матеріалу нуклеїнових кислот та їхня денатурація (центрифугат суспензії з досліджуваного матеріалу обробляють спочатку протеїназою К, потім фенолом із хлороформом, які руйнують білки; після їхнього видалення нуклеїнові кислоти осаджують при -70°C , осад відмивають спиртом і піддають денатурації кип'ятінням або обробкою лугом);

3) контакт 1-ланцюгових нуклеїнових кислот із зондом при 55–65°C упродовж 2 год, що призводить до утворення 2-ланцюгових молекул у разі їхньої комплементарності (молекулярна гібридизація);

4) видалення всіх негібридизованих молекул нуклеїнових кислот (обробкою натрію додецилсульфатом і натрію цитратом);

5) індикація утворених 2-ланцюгових молекул нуклеїнових кислот за міткою зонда (P^{32} виявляють методом авторадіографії або підрахунком імпульсів у гамма-лічильнику, а наявність біотину встановлюють колориметричним методом).

Метод ДНК-зондів є високочутливою реакцією, яка дає змогу встановити в досліджуваному матеріалі нуклеїнові кислоти в низьких концентраціях (1 –10 пг; 1 пг – 10^{-12} г). Проте чутливість методу часто недостатня для виявлення провірусів, якщо заражено небагато клітин в організмі. У такому разі проводять ампліфікацію певних фрагментів ДНК у ПЛР, а потім ідентифікують ДНК за допомогою міченого зонда.

Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) полягає в багатократному збільшенні *in vitro* копій геному вірусу, який треба ідентифікувати в досліджуваному матеріалі. Реакція здійснюється в автоматичному режимі – *ампліфікаторі*. При цьому використовують *праймери* – короткі 1-ланцюгові ДНК, які комплементарні певним ділянкам кожної з ниток вірусної ДНК-матриці та слугують затравкою для синтезу нового ланцюга ДНК. Праймери фізично вбудовуються у фрагменти ДНК-матриці, а добудовує їх до заданого розміру вірусного геному бактеріальний фермент Таq-ДНК-полімераза.

Реакційна суміш, де відбувається ПЛР, має містити в достатній кількості нуклеотиди («будівельні блоки»), специфічні олігонуклеотидні праймери і досліджуваний матеріал у вигляді ізольованої з нього ДНК або ДНК-копії РНК-геному, яку отримують зворотною транскрипцією. ДНК-матрицю виділяють із досліджуваного матеріалу за вищевказаною методикою (п. 2).

ПЛР складається з 3-х процесів, що циклічно повторюються:

1) денатурація досліджуваної 2-ланцюгової ДНК нагріванням реакційної суміші до 90–100°C;

2) відпалювання праймерів (гібридизація праймерів із комплементарними ділянками 1-ланцюгової ДНК при 55–65°C);

3) елонгація (добудова) праймерів до заданого розміру вірусного геному під дією Таq-ДНК-полімерази при 72°C.

Весь цикл ампліфікації триває всього 5–10 хв і може повторюватися до 20–40 разів. За кожний цикл відбувається подвоєння кількості молекул ДНК. За 40 циклів ампліфікації кількість копій ДНК зростає в 10^{13} разів, причому довгі необмежені копії ДНК синтезуються лише з вихідних батьківських ланцюгів ДНК. Таку кількість вірусної ДНК тепер можна ідентифікувати будь-яким методом: 1) електрофорез в агарозі або поліакриламідному гелі з фарбуванням бромідом етидію; 2) колориметричний, флуориметричний чи радіоізотопний методи з використанням ДНК-зондів. Збільшення кількості вірусної ДНК у 10^6 разів цілком

достатньо для виявлення її методом ДНК-зондів без попереднього накопичення вірусу в культурі клітин.

ПЛР у поєднанні з методом ДНК-зондів успішно використовують для діагностики хвороби Ауескі, чуми ВРХ, вірусної діареї ВРХ, інфекційного ринотрахеїту ВРХ, класичної та африканської чуми свиней, хвороби Марека та ін. Особливо важливе значення цих методів при ідентифікації вірусів, для яких ще не знайдені чутливі культури клітин або не розроблені серологічні тести, а також при дослідженні проб з об'єктів довкілля і харчових продуктів, що сильно контаміновані мікроорганізмами і не придатні для зараження культури клітин.

Самостійна робота. Ознайомитися з тест-системами для методу ДНК-зондів і ПЛР.

Результат: _____

Контрольні запитання

1. Які ви знаєте молекулярно-генетичні методи дослідження і з якою метою їх використовують? **2.** У чому суть методу ДНК-зондів? **3.** Який принцип отримання ДНК-зондів? **4.** Як виділяють із досліджуваного матеріалу нуклеїнові кислоти? **5.** Назвіть етапи індикації вірусних нуклеїнових кислот методом ДНК-зондів. **6.** У чому суть ПЛР? **7.** Що таке праймери? **8.** Назвіть етапи індикації вірусних нуклеїнових кислот у ПЛР. **9.** Які переваги методу ДНК-зондів і ПЛР?

Т е м а 5

Культивування вірусів у організмі лабораторних тварин

Кількість годин: 2

Мета заняття. Ознайомитися з метою використання лабораторних тварин у вірусологічній практиці та вимогами до них. Засвоїти методи експериментального зараження лабораторних тварин. Вивчити техніку розтину лабораторних тварин.

Матеріальне забезпечення. Лабораторні тварини (кролі, мурчаки, білі пацюки, білі миші), стерилізатор зі стерильними інструментами, вірусомісна суспензія, спирт, вата, ватні тампони в паперовій упаковці, ефір, спиртівка, дошка і цвяхи для фіксації трупа тварини, чашки Петрі, пробірки, піпетки, гумова груша.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми Біопроба на лабораторних тваринах

Мета використання лабораторних тварин у вірусології: 1) первинне виділення вірусів із патматеріалу; 2) підтримання вірусних штамів у лабораторії в активному стані впродовж тривалого часу; 3) накопичення великої кількості вірусомісного матеріалу при виробництві вакцин і діагностиків; 4) отримання імунних сироваток; 5) титрування вірусів; 6) як тест-об'єкт у реакції нейтралізації; 7) постановка біопроби з характерними клінічними ознаками.

Вимоги до лабораторних тварин: 1) мають бути абсолютно здоровими; 2) мають бути чутливими до даного вірусу (відповідного виду і віку); 3) повинні мати стандартну чутливість до вірусу (одного віку, статі, маси, по 4 тварини на одну пробу досліджуваного матеріалу). У науково-дослідній роботі використовують тварин *інбредних ліній*, що отримані внаслідок близькородинного спаровування (впродовж не менше 20 поколінь), які практично однаково реагують на той чи інший вірус. Для деяких вірусологічних досліджень (наприклад, при виділенні вірусу з нез'ясованими патогенними властивостями) потрібно застосовувати *гнотобіотів*. Це стерильні тварини, які одержують шляхом кесарева розтину або ампутації матки й утримують у стерильних умовах.

Лабораторних тварин потрібно періодично контролювати на наявність латентних інфекцій. Для цього убивають кількох тварин, із певних органів виготовляють суспензію та заражають відповідними методами тварин цієї ж групи (наприклад, суспензію з мозку вводять і/ц). У разі безсимптомного вірусноносійства зараження призводить до загострення інфекційного процесу. Крім того, латентні інфекції можна виявити за допомогою обробки тварин імунодепресантами (зокрема кортизоном).

У вірусологічній практиці найчастіше використовують наступні *методи експериментального зараження* лабораторних тварин (рис. 5).

1) *Підшкірний*. Захоплюють шкірну складку в ділянці спини, черева або на боці та в її основу паралельно до поверхні тіла вводять голку.

2) *Внутрішньошкірний*. У ділянці черева, спини або на боці паралельно до поверхні шкіри вводять голку, щоб вона

просвічувалася крізь епідерміс. У місці введення матеріалу утворюється бугорок. Дрібних тварин заражають у плантарну поверхню задньої кінцівки.

3) *У скарифіковану шкіру.* У ділянці спини, черева або на боці роблять декілька поверхневих подряпин голкою чи пастерівською піпеткою, наносять матеріал, який втирають шпателем або скляною паличкою.

4) *Внутрішньом'язовий.* Голку вводять у м'язи стегна перпендикулярно до поверхні тіла.

5) *Внутрішньочеревний.* Тварину фіксують вертикально вниз головою, відтягують задню кінцівку і в ділянку паху вводять голку.

6) *Внутрішньовенний.* Кролів заражають у крайову вену вуха, яке масажують і перетискають біля основи. Голку вводять у судину в напрямку до голови. Білих мишей і пацюків заражають у бокові вени хвоста. Хвіст розтирають ксилолом або витримують у гарячій воді, перетискають біля основи і вводять голку. При інокуляції матеріалу судина на всьому проміжку біліє.

7) *Інтраназальний.* Проводять під легким ефірним наркозом (за винятком кролів). Тварину фіксують ніздрями догори і в кожному з них вводять матеріал за допомогою шприца або пастерівської піпетки.

8) *Інтрацеребральний.* У молодих кролів і мурчаків проколюють шкіру і череп у надочному жолобі туберкуліною голкою з обмежувачем (на 5 мм). Дорослих кролів заражають через трепанаційний отвір, який роблять на 2 см вище поперекової лінії, умовно проведеної між зіницями. У мишей і пацюків голкою з обмежувачем (на 1–2 мм) проколюють шкіру в точці, що лежить у центрі квадрата, утвореного середньою сагітальною лінією і перпендикуляром до неї по зовнішньому краю очниць.

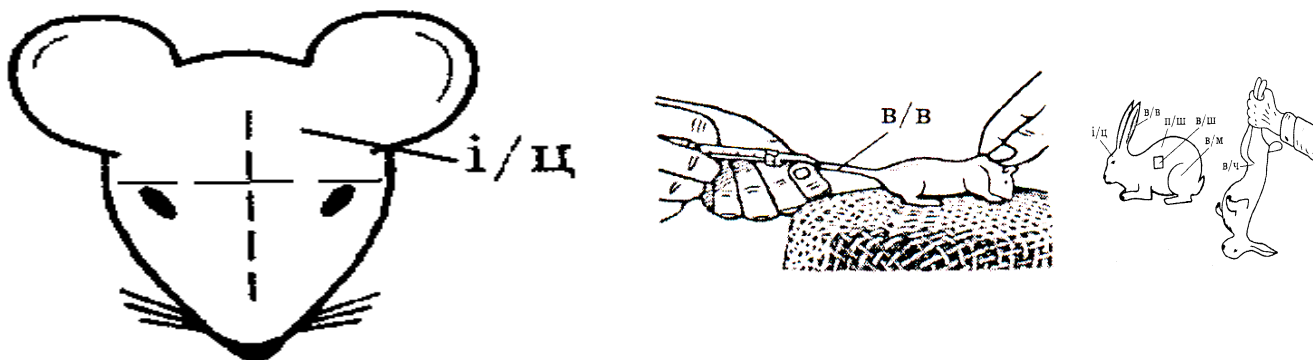


Рис. 5. Методи експериментального зараження лабораторних тварин

Метод зараження визначається тропізмом вірусу. Так, для ізоляції нейротропних вірусів тварин заражають найчастіше і/ц, пневмотропних вірусів – і/н, дерматропних (епітеліотропних) вірусів – в/ш або у скарифіковану шкіру, політропних і пантропних вірусів – п/ш, в/ч або в/в. Дози зараження залежать від виду лабораторної тварини і методу зараження.

Перед зараженням тварину фіксують, місце введення матеріалу ретельно обробляють: вистригають і виголюють шерсть, шкіру протирають 3%-м спиртовим розчином йоду.

Індикація вірусів у організмі лабораторних тварин

Заражених тварин розміщують в ізоляторах і ведуть щоденне спостереження. *Ознаками розмноження вірусів* у організмі лабораторних тварин є клінічні симптоми, патологоанатомічні зміни і загибель. Треба мати на увазі, що загибель тварин у перші дні після зараження можуть спричинити токсичні фактори або травма. Клінічні ознаки в заражених лабораторних тварин найчастіше мають неспецифічний характер (наприклад, пригнічення, зниження апетиту, задуха тощо). Проте в окремих випадках біопробою на лабораторних тваринах можна відтворити типову клінічну картину захворювання, зокрема хвороби Ауескі на кролях та ящуру на мурчаках. Якщо тварини не реагують на зараження, їх убивають через проміжок часу, що дорівнює двом інкубаційним періодам, беруть при розтині відповідний матеріал (з урахуванням тропізму досліджуваного збудника) і проводять наступний пасаж.

Розтин заражених лабораторних тварин роблять зразу після загибелі з метою аналізу патологоанатомічних змін і відбору вірусомісного матеріалу. Розтин проводять із дотриманням правил асептики та антисептики.

Техніка розтину (рис. 6). Труп тварин фіксують голками (або цвяхами) на дошці в спинному положенні. Шкіру обробляють спиртом або дезрозчином, розрізають по середній лінії та в напрямку до кінцівок, препарують і фіксують голками. Роблять розріз *черевної стінки* по середній лінії до мечоподібного відростка і під лінією діафрагми. Утворені трикутники черевної стінки відводять убік і фіксують. Пінцетом відтягують кишечник уліво до появи паренхіматозних органів. При розтині *грудної порожнини* розрізають ребра і видаляють їх разом із грудною кісткою. Для розтину *черепної порожнини* тварину кладуть на черево, фіксують передні кінцівки і голову. Шкіру розрізають у ділянці шиї та в напрямку до очниць,

препарують і стягують уперед. Розріз черепної коробки проводять від великого мозкового отвору в напрямку до очниць і між ними, видаляють черепну кістку.

Патматеріал від заражених тварин беруть згідно з тропізмом вірусу і використовують для ідентифікації виділеного збудника. При необхідності проводять наступний пасаж. Патматеріал зберігають у замороженому стані при $-20-70^{\circ}\text{C}$.

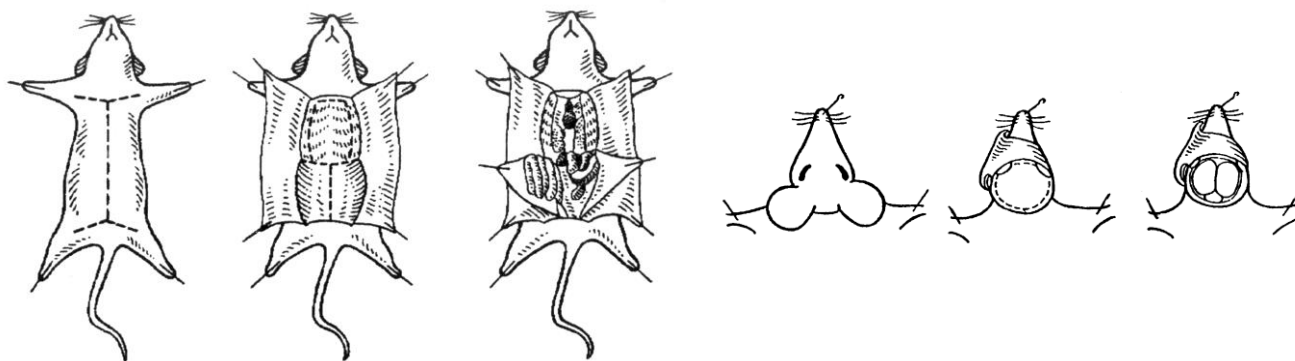


Рис. 6. Розтин миші

Самостійна робота. Відпрацювати прийоми фіксації й різні методи експериментального зараження лабораторних тварин. Провести розтин лабораторних тварин, відібрати вірусомісний матеріал.

Результат: _____

Контрольні запитання

1. З якою метою використовують лабораторних тварин у вірусології?
2. Які вимоги ставляться до лабораторних тварин?
3. Як виявити серед лабораторних тварин латентних вірусоносіїв?
4. Як досягається стандартна чутливість лабораторних тварин до вірусів?
5. Які ви знаєте методи експериментального зараження лабораторних тварин?
6. Як проводять підшкірне зараження?
7. Як проводять внутрішньошкірне зараження?
8. Як проводять зараження в скарифіковану шкіру?
9. Як проводять внутрішньом'язове зараження?
10. Як проводять внутрішньочеревне зараження?
11. Як проводять внутрішньовенне зараження?
12. Як проводять інтраназальне зараження?
13. Як проводять інтрацеребральне зараження?
14. Які ознаки розмноження вірусів у організмі лабораторних тварин?
15. З якою метою проводять розтин заражених лабораторних тварин?
16. Розкажіть техніку розтину

лабораторних тварин. **17.** Які віруси культивують в організмі лабораторних тварин? **18.** За яких вірусних інфекцій біопробу на лабораторних тваринах можна відтворити типові клінічні ознаки хвороби?

Т е м а 6

Культивування вірусів у курячих ембріонах

Кількість годин: 2

Мета заняття. Ознайомитися з метою використання курячих ембріонів у вірусологічній практиці й вимогами до них. Вивчити будову курячого ембріона. Засвоїти методи експериментального зараження і техніку розтину курячих ембріонів. Вивчити методи індикації вірусів у курячих ембріонах.

Матеріальне забезпечення. Курячі ембріони, овоскоп, штативи для курячих ембріонів, пробійник, йодований спирт, стерилізатор зі стерильними інструментами, вірусовмісна суспензія, ватні тампони на паличках і в паперовій упаковці, парафіновані палички, лейкопластир, простий олівець, чашки Петрі, пробірки, піпетки, гумова груша, спиртівка, дезрозчин, предметні скельця, 5%-ва суспензія еритроцитів курей, 0,9%-й розчин NaCl.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Біопроба на курячих ембріонах

Курячі ембріони використовуються у вірусології з метою первинного виділення вірусів із патматеріалу, підтримання вірусних штамів у лабораторії, накопичення вірусів при виробництві вакцин і діагностикумів, титрування вірусів та як тест-об'єкт у реакції нейтралізації.

Курячі ембріони мають істотні переваги порівняно з лабораторними тваринами: висока чутливість до вірусів, стерильність, економічність. Для зараження використовують курячі ембріони віком від 5 до 12 днів із благополучних щодо інфекційних захворювань господарств. У лабораторії курячі ембріони інкубують у термостаті за температури 37°C, вологості 60–70% і відкритих вентиляційних отворах.

Будова курячого ембріона (рис. 7). Зовні ембріон вкритий твердою пористою *шкаралупою*, до якої прилягає *підшкаралупна оболонка*. Біля тупого кінця яйця вона розділяється на два листки, де утворюється *повітряна камера*. До підшкаралупної оболонки прилягає *хоріон-алантоїсна оболонка (ХАО)*, що пронизана кровоносними судинами і виконує функцію органа дихання ембріона.

ХАО обмежує *алантоїсну порожнину*, в якій накопичуються продукти обміну. Зародок знаходиться в *амніотичній порожнині*, що заповнена навколоплідною рідиною й оточена оболонкою. Зародок пуповиною зв'язаний із *жовтковим мішком*, який є резервуаром поживних речовин. У гострому кінці яйця знаходиться залишок білка, який містить лізоцим, що захищає зародок від стафілококової та інших інфекцій.

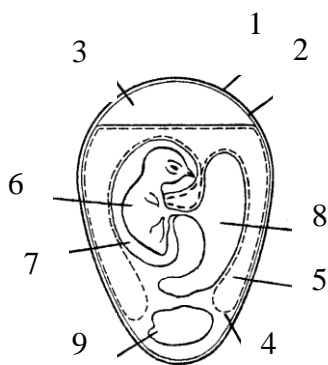


Рис. 4. Будова курячого ембріона:

- 1 – шкаралупа;
- 2 – підшкаралупна оболонка;
- 3 – повітряна камера;
- 4 – хоріон-алантоїсна оболонка;
- 5 – алантоїсна порожнина;
- 6 – зародок;
- 7 – амніотична порожнина;
- 8 – жовтковий мішок;
- 9 – білок.

Перед зараженням курячі ембріони розглядають на овоскопі в темному приміщенні. При цьому встановлюють їхню життєздатність: судини ХАО наповнені кров'ю, зародок рухомий. На шкаралупі простим олівцем відмічають межу повітряної камери і місцезнаходження зародка. Шкаралупу перед зараженням обробляють 2%-м спиртовим розчином йоду. Зараження в ту чи іншу структуру курячого ембріона проводять у період її максимального розвитку, коли кількість чутливих клітин є найбільшою. Репродукція вірусів відбувається в клітинних структурах курячого ембріона. Вибір методу зараження визначається тропізмом вірусу. Кожною пробою досліджуваного матеріалу заражають по 4 курячі ембріони в дозі 0,1–0,2 мл. Працюють із дотриманням правил асептики та антисептики.

Розроблено **6 методів експериментального зараження** курячих ембріонів (рис. 8).

1) В *алантоїсну порожнину* (9–11-й день інкубації). Ембріон розміщують вертикально. У шкаралупі роблять отвір на 5–6 мм вище межі повітряної камери. Голку вводять вертикально на глибину 10–12 мм.

2) На *ХАО* (через штучну повітряну камеру, 10–12-й день інкубації). Ембріон розміщують горизонтально. У шкаралупі роблять два отвори: невеликий – над центром повітряної камери і більший – на боці. Обережно проколюють підшкаралупну оболонку. Гумовою

грушею відсмоктують повітря з природної повітряної камери. При цьому ХАО переміщається й утворюється штучна повітряна камера. Через боковий отвір наносять на ХАО вірусомісний матеріал.

Зараження на ХАО можна проводити через природну повітряну камеру: на шкаралупі вирізають отвір діаметром 1,5–2 см, пінцетом знімають підшкаралупну оболонку і наносять на ХАО вірусомісний матеріал.

3) У жовтковий мішок (5–7-й день інкубації). Ембріон розміщують вертикально. Роблять отвір у шкаралупі над центром повітряної камери. Голку вводять на глибину 3,5–4 см під кутом 45° до вертикальної осі в напрямку, протилежному місцезнаходженню зародка.

4) В амніотичну порожнину (відкритий спосіб; 6–10-й день інкубації). Ембріон розміщують вертикально. У шкаралупі над повітряною камерою вирізають отвір діаметром 1–1,5 см. Пінцетом знімають підшкаралупну оболонку, захоплюють амніотичну оболонку разом із ХАО, підтягують до отвору і голку вводять в амніон.

5) У зародок (7–12-й день інкубації). Заражають так само, як в амніон відкритим способом. Через отвір у шкаралупі підтягують зародок. Голку вводять у різні ділянки тіла зародка або в головний мозок.

6) У кровоносні судини ХАО (11–12-й день інкубації). Ембріон розміщують вертикально, зрізають шкаралупу над повітряною камерою. На підшкаралупну оболонку наносять декілька крапель спирту, оболонка стає прозорою. Голку вводять у велику судину.

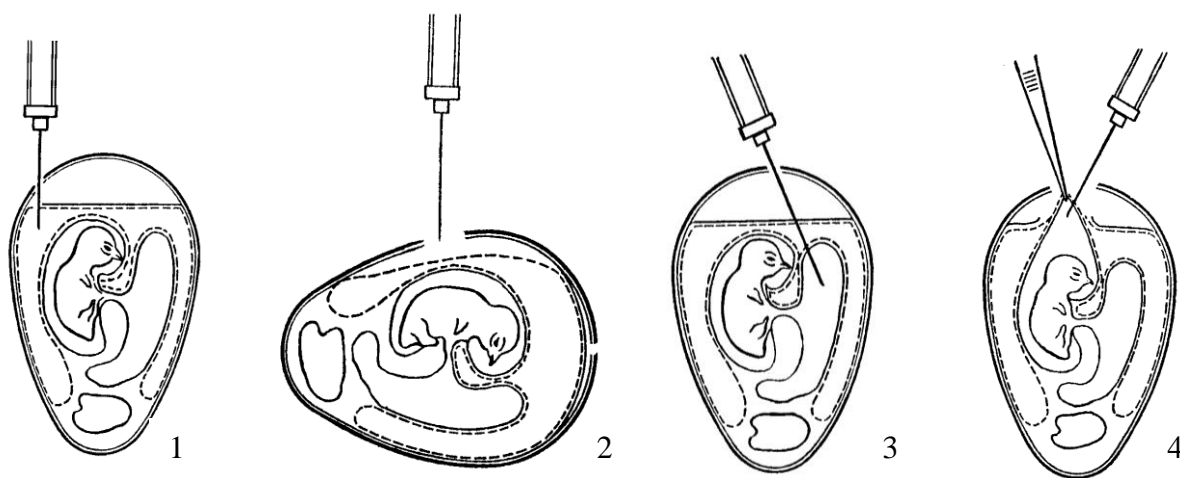


Рис. 8. Методи експериментального зараження курячих ембріонів: 1 – в алантоїсну порожнину; 2 – на ХАО; 3 – у жовтковий мішок; 4 – в амніотичну порожнину.

Такі методи зараження курячих ембріонів, як у зародок і в кровоносні судини ХАО, у вірусологічній практиці застосовують рідко. Інокуляція вірусомісного матеріалу в зародок часто супроводжується неспецифічною загибеллю внаслідок травмування, а зараження в кровоносні судини ХАО є технічно складним методом.

Після введення вірусомісного матеріалу отвори на шкаралупі закривають краплею розплавленого парафіну або лейкопластиром (залежно від величини).

Індикація вірусів у курячих ембріонах

Заражені ембріони підписують простим олівцем, кладуть у термостат і щодня розглядають на овоскопі. Загиблі ембріони переносять у холодильник і витримують 16–18 год при 4°C або 1–2 год при –10–20°C. Це значно полегшує їхній наступний розтин унаслідок ущільнення тканин та звуження судин і дає можливість отримати чисті ембріональні рідини. Загибель ембріонів у перші 24 год після зараження зумовлена частіше всього бактеріальним чи грибковим забрудненням при нестерильній роботі або травмуванням зародка при зараженні. Така загибель вважається неспецифічною. Проте існують віруси, які можуть спричинити швидку загибель ембріонів (наприклад, високовірулентні штами вірусу грипу А птиці або ньюкаслської хвороби). Якщо ембріони не гинуть, їх інкубують до моменту максимального накопичення збудника (кожний вірус має певний цикл репродукції), а потім умертвляють і розтинають.

Розтин курячих ембріонів проводять у стерильних умовах із метою відбору вірусомісного матеріалу та аналізу патологоанатомічних змін.

Техніка розтину (рис. 9). Шкаралупу протирають 2%-м спиртовим розчином йоду і зрізають вище межі повітряної камери. Проколюють підшкаралупну оболонку разом із ХАО, пінцетом притримують структури ембріона і пастерівською піпеткою відбирають до 10 мл алантоїсної рідини. Піпетку вводять в амніон під шию зародка і відбирають до 1 мл амніотичної рідини. Зрізають верхню частину ХАО, виймають зародок, жовтковий мішок, білок і частину ХАО, що залишилася на шкаралупі. ХАО поміщають у чашку Петрі з 0,9%-м розчином NaCl, промивають до отримання прозорої рідини і розглядають на темному фоні. Жовтковий мішок після витискання вмісту переносять у чашку Петрі з 0,9%-м розчином NaCl і промивають.

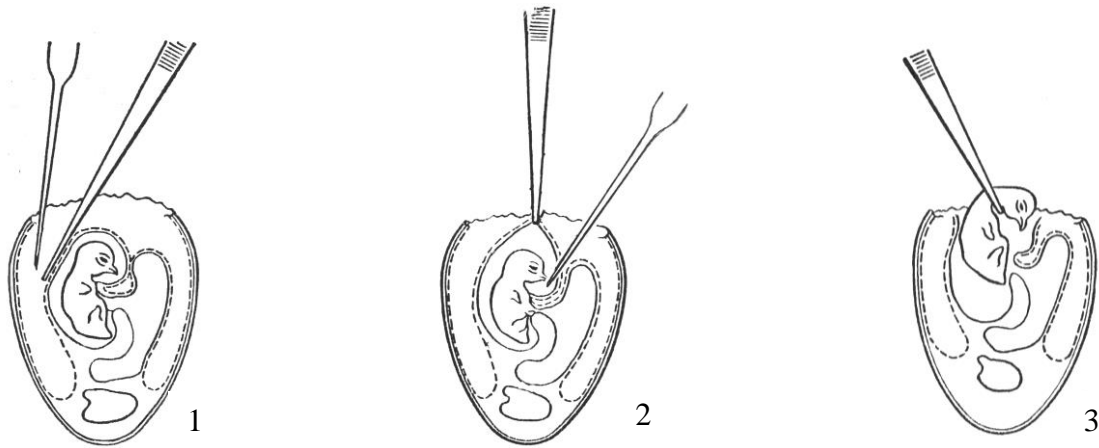
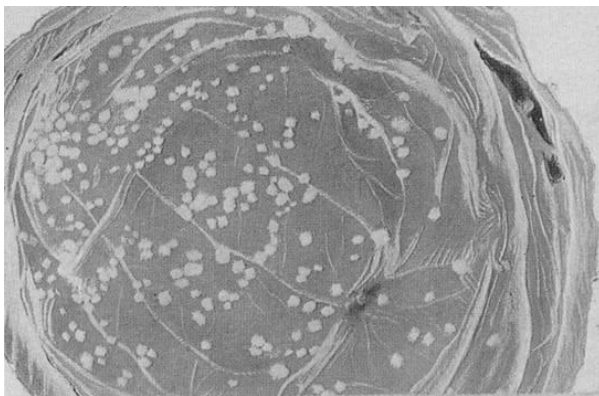


Рис. 9. Розтин курячого ембріона:

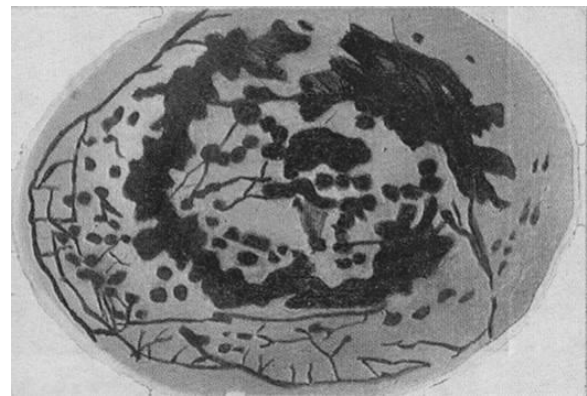
1 – відбір алантоїсної рідини; 2 – відбір амніотичної рідини;
3 – отримання зародка.

Як вірусовмісний матеріал використовують алантоїсну та амніотичну рідини, ХАО, жовтковий мішок, зародок (залежно від тропізму вірусу). Отриманий матеріал перевіряють на стерильність (посіви на МПА, МПБ, МППБ, середовище Сабуро) і застосовують для ідентифікації виділеного збудника. При необхідності проводять наступний пасаж. Зберігають вірусовмісний матеріал при $-20-70^{\circ}\text{C}$.

Ознаками розмноження вірусів у курячих ембріонах є загибель (у характерні для кожного виду вірусу строки), патологоанатомічні зміни і гемаглютинація з ембріональними рідинами. З патологоанатомічних змін найбільш типові – це помутніння і набряк ХАО, утворення на ХАО некротичних вузликів – віспин (рис. 10), вогнищ клітинної проліферації – пустул, або бляшок (рис. 11), гіперемія, крововиливи і набряки на зародку, карликовість та муміфікація зародка (рис. 12), вогнища некрозу в паренхіматозних органах, зміна кольору печінки.



а



б

Рис. 10. Сіро-білі (а) та геморагічні (б) віспини на ХАО курячого ембріона

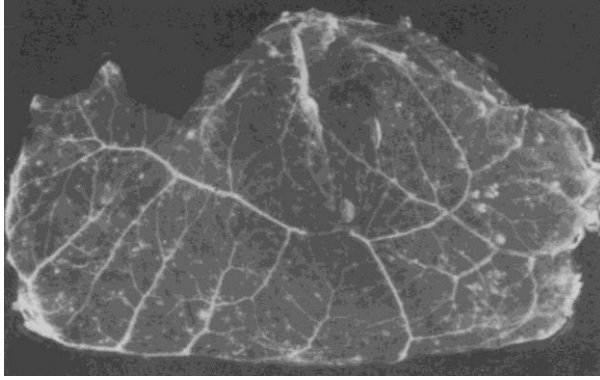


Рис. 11. Пустули на ХАО
курячого ембріона

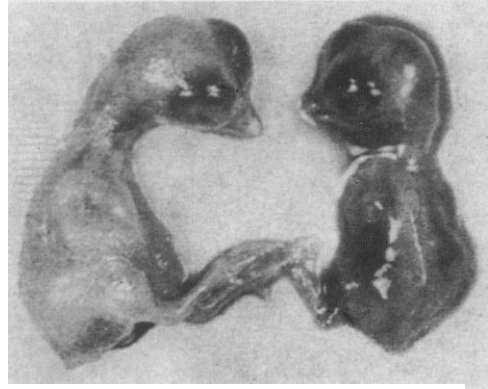


Рис. 12. Карликовість
і муміфікація зародка
курячого ембріона

Важливим методом індикації вірусів у курячих ембріонах є *реакція гемаглютинації (РГА)*, що ґрунтується на здатності вірусів склеювати еритроцити певного виду. Особливо цінна ця реакція при виявленні вірусів, які розмножуються в курячих ембріонах, але не зумовлюють жодних змін (наприклад, збудник парагрипу-3 ВРХ, слабовірулентні штами збудника ньюкаслської хвороби). Для постановки РГА на склі змішують краплю ембріональної рідини (алантоїсної або амніотичної) з краплею 5%-ї суспензії еритроцитів певного виду. За наявності гемаглютинувального вірусу через 5–10 хв випадають пластівці склеєних еритроцитів.

Самостійна робота. Провести овоскопію курячих ембріонів. Відпрацювати різні методи експериментального зараження курячих ембріонів. Провести розтин курячих ембріонів, відібрати вірусомісний матеріал. Поставити РГА.

Результат: _____

Контрольні запитання

1. З якою метою використовують курячі ембріони у вірусології? 2. У чому полягають переваги курячих ембріонів порівняно з лабораторними тваринами? 3. Які вимоги ставляться до курячих ембріонів? 4. Які умови утримання курячих ембріонів? 5. Розкажіть будову курячого ембріона. 6. Назвіть функції різних структур курячого ембріона. В якому віці проводять зараження в ці структури? 7. Що роблять із курячими ембріонами перед зараженням? 8. Які ви знаєте методи експериментального зараження курячих ембріонів? 9. Як проводять зараження в алантоїсну порожнину? 10. Як проводять зараження на ХАО? 11. Як проводять зараження в жовтковий мішок? 12. Як проводять зараження в амніотичну порожнину? 13. Як проводять зараження в зародок? 14. Як проводять зараження в кровоносні судини ХАО? 15. Як спостерігають за курячими ембріонами після зараження? 16. З якою метою проводять розтин заражених курячих ембріонів? 17. Розкажіть техніку розтину курячих ембріонів. 18. За якими ознаками проводять індикацію вірусів у курячих ембріонах? 19. Які патологоанатомічні зміни виявляють у заражених курячих ембріонах? 20. У чому полягає РГА? 21. Які віруси культивують у курячих ембріонах?

Т е м а 7

Культивування вірусів у культурах клітин

Кількість годин: 6

Мета занять. Оцінити значення культури клітин для розвитку вірусології. Ознайомитися з класифікацією тканинних культур і принципом їхнього отримання. Ознайомитися з розчинами і живильними середовищами для культури клітин. Засвоїти методику отримання первинно-трипсинізованої культури клітин і субкультури. Вивчити методи індикації вірусів у культурі клітин.

Матеріальне забезпечення. Вихідна тканина для отримання первинно-трипсинізованої культури клітин (курячі ембріони або нирка теляти); розчини Хенкса, Ерла, трипсину, версену; середовища 199, Ігла, гідролізат лактоальбуміну; сироватка крові ВРХ; антибіотики (пеніцилін, стрептоміцин); стерилізатор зі стерильними інструментами, спиртівка, спирт, вата, магнітна мішалка, центрифуга, світловий мікроскоп, камера Горяєва, 0,1%-й розчин кристалвіолету, стерильний посуд (пробірки з гумовими пробками, матраци, центрифужні пробірки, піпетки, флакони, колба з магнітом), марлеві фільтри, фольга, лотки для пробірок, гумова груша, лід, дезрочин, фіксовані препарати з культурою клітин (незараженою, з ЦПД і гемадсорбцією), матраци з бляшками.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Класифікація тканинних культур і принцип їхнього отримання

Метод культури клітин запроваджено у вірусологічну практику в 1950-х роках, і це стало справжньою революцією в розвитку вірусології. Культура клітин є найдосконалішою лабораторною системою для культивування вірусів. У культурі клітин було виділено та ідентифіковано сотні нових, невідомих до того часу вірусів, які не розмножуються ні в організмі лабораторних тварин, ні в курячих ембріонах. Було встановлено вірусну етіологію багатьох хвороб тварин і людини. На моделі культури клітин досліджено взаємодію вірусів із чутливими клітинами, детально вивчено етапи репродукції вірусів. Метод культури клітин дав можливість створити високоефективні вірусні вакцини.

У вірусологічній практиці культура клітин використовується з цією ж метою, що й інші біологічні об'єкти: для первинного виділення вірусу з патматеріалу, підтримання вірусних штамів у лабораторії, накопичення вірусів при виготовленні вакцин і діагностикумів, титрування вірусів та як тест-об'єкт у реакції нейтралізації.

Культура клітин має істотні переваги порівняно з лабораторними тваринами та курячими ембріонами. Вона знімає видові обмеження культивування вірусів, оскільки *in vitro* можна вирощувати будь-які клітини різних видів тварин. *In vitro* досягається зараження всіх клітин, що дає можливість отримати вірусомісний матеріал із найвищою концентрацією вірусу при найменшому вмісті баластних білків. У культурі клітин одержують готову суспензію вірусу (у вигляді культуральної рідини), вільну від бактерій і грибів. Культура клітин дає широкі можливості безперервного контролю за ходом інфекційного процесу, а також втручання в нього в будь-який момент без порушення цілісності біологічної системи.

Культура тканин – це збірне поняття, що означає систему, в якій клітини, тканини чи органи зберігають життєздатність або властивість розмножуватися *in vitro* понад 24 год. Культура тканин поділяється на *органну і клітинну культури*.

Органна культура – це підтримання *in vitro* фрагментів тканин, цілих органів або їхніх частин при збереженні їхньої структури і функції. Органні культури не здатні до розмноження. В органних культурах успішно вирощують шматочки слизової оболонки носа і

трахеї, шкіри, легень, печінки, селезінки, кишечника, нирок та інших органів.

Культура клітин – це клітини, отримані внаслідок диспергування тканин, які живуть і розмножуються *in vitro* (без утворення тканини). Культура клітин втрачає гістологічну та біохімічну диференціацію, характерну для вихідної тканини. Культура клітин поділяється на *одношарову і суспензійну*.

Одношарова (або моношарова) культура клітин – це клітини *in vitro*, які прикріплюються до субстрату і розмножуються, утворюючи моношар (на склі пробірок, флаконів, матраців). Одношарові культури клітин поділяються на *первинні, субкультури, перещеплювані й диплоїдні*.

Первинні (або первинно-трипсинізовані) культури клітин отримують з органів і тканин, які взяті безпосередньо з організму. Краще культивуються *in vitro* клітини ембріональних тканин, а також тварин раннього віку, оскільки вони мають вищу потенцію росту.

Для отримання первинної культури клітин від здорової тварини не пізніше 2–3 год після забою беруть відповідні органи або тканини (наприклад, нирки, сім'яники, легені, шкіру), подрібнюють і для дезагрегації тканини обробляють протеолітичним ферментом, найчастіше – трипсином. Фермент руйнує міжклітинні речовини, і тканина диспергується на окремі клітини. Їх суспендують у живильному середовищі, розливають по пробірках або матрацах, поміщають у термостат при 37°C.

У своєму розвитку культура клітин проходить 3 фази. Перша фаза – *адаптації*, триває 2–24 год і характеризується *адгезією* клітин, тобто прикріпленням їх до скла. Друга фаза – *логарифмічного росту*, супроводжується діленням клітин, які поступово покривають поверхню скла. Третя фаза – *стаціонарна*, характеризується формуванням через 3–5 діб моношару внаслідок *контактної інгібіції* клітин, тобто припинення їхнього поділу при контакті. Моношар зберігає життєздатність упродовж 1–3 тижнів (при періодичній зміні середовища, яке забруднюється продуктами метаболізму клітин). З часом клітини старіють, і настає їхня *неспецифічна дегенерація*: вони округлюються, відриваються від скла і гинуть.

Первинні культури позбавлені багатьох клітин, які присутні у вихідній тканині, оскільки не всі клітини здатні прикріпитися до субстрату і вижити в умовах *in vitro*. Проте клітини первинних культур гетерогенні, і в них найповніше представлені типи клітин тієї

тканини, звідки вони отримані. Первинні культури високочутливі до вірусів, онкогенно безпечні. *Недоліком* їх є значна трудомісткість одержання, а також можливість контамінації латентними вірусами і мікоплазмами, що персистують в організмі тварин, тканини яких використовують для трипсинізації.

Субкультури (або вторинні культури клітин) отримують із первинних, вирощених у матрацах, після формування моношару. Клітини знімають зі скла розчином трипсину або версену, ресуспендують у новому живильному середовищі та пересівають у матраци або пробірки. Через 2–3 доби формується моношар вторинної культури клітин. За чутливістю до вірусів субкультури не відрізняються від первинних. Проте при субкультивуванні кількість клітин збільшується в 2–2,5 рази. Крім того, з'являється можливість виявити контамінацію клітин вірусами і мікоплазмами, а також отримати одноріднішу популяцію клітин. Субкультури можна одержати при 2–5 пересівах, зрідка – до 8–10. Наступні пасажі призводять до зміни морфології клітин та їхньої загибелі. Якщо клітинні культури пройшли понад 10 пасажів, вони перебувають на стадії переходу до диплоїдних або перещеплюваних.

Перещеплювані культури клітин (син.: стабільні, або постійні, клітинні лінії) отримують із первинних шляхом тривалих пересівів (не менше 70 разів із триденними інтервалами). Такі клітини, як правило, мають змінений каріотип порівняно з вихідною культурою (гетероплоїдний набір хромосом), необмежений строк життя, і багато з них проявляють онкогенні властивості.

Перещеплювані культури клітин можна отримати як із нормальних, так і пухлинних тканин тварин і людини. Серед них широко застосовуються такі клітинні лінії, як **HeLa** (з карциноми шийки матки жінки), **Нер-2** (з карциноми гортані людини), **KB** (з карциноми ротової порожнини людини), **L** (з підшкірної сполучної тканини миші), **ВНК-21** (з нирки сірійського хом'яка), **Vero** (з нирки африканської зеленої мавпи) та багато інших.

Перещеплювані культури клітин мають *переваги* порівняно з первинними. Їхнє застосування вирішує проблему сировини, виключає необхідність постійного постачання свіжими тканинами. Перещеплювані культури складаються з відносно однорідних клітин (епітеліоїдних, фібробластоїдних), що забезпечує стандартні умови репродукції вірусів. Окрім того, при пересівах з'являється можливість виявити контамінацію культури вірусами і мікоплазмами.

Проте перещеплювані культури мають серйозний *недолік*: схильність до малігнізації, тобто злякисного переродження. Це в певній мірі обмежує їхнє використання у виробництві живих вакцин, особливо в медичній практиці.

Диплоїдні культури клітин (*син.: диплоїдні клітинні лінії*) – це морфологічно однорідні популяції клітин, стабілізовані в процесі культивування *in vitro*, які зберігають каріотип, властивий вихідній тканині, мають обмежений строк життя (40–60 пасажів), вільні від контамінантів і не виявляють онкогенної активності при трансплантації хом'якам.

Диплоїдні культури клітин отримані з різних тканин ембріона людини (легені, нирки, серце, шкірно-м'язова тканина) і тварин (нирки ембріонів корів, овець, свиней; нирки телят, ягнят, поросят та ін.).

Диплоїдні культури мають *переваги* порівняно з первинними і перещеплюваними. Вони стерильні щодо контамінації вірусами і мікоплазмами, позбавлені онкогенної активності, здатні роками зберігатися в замороженому стані, забезпечують стандартні умови для репродукції вірусів. Тому диплоїдні культури клітин є оптимальною системою для культивування вірусів при діагностиці вірусних хвороб та виробництві вірусних препаратів (вакцин, антигенів).

Диплоїдні та перещеплювані клітинні лінії консервують шляхом заморожування в рідкому азоті (-196°C). При цьому клітини мають майже необмежений строк зберігання за повної відсутності ризику механічного пошкодження.

Суспензійні культури клітин – це клітини, які розмножуються *in vitro* в завислому стані завдяки постійному перемішуванню живильного середовища. Як правило, вони зберігають властивість утворювати моношар на склі в стаціонарних умовах. *Перевага* цього методу культивування клітин полягає в тому, що він дає змогу отримувати великі кількості клітин без застосування диспергувальних речовин. У суспензійних культурах добре культивуються лише перещеплювані клітини. Суспензійні культури дають більший вихід вірусів порівняно з моношаровими, що відкриває великі можливості в промисловому виробництві вакцин і діагностикумів, у біотехнології (при виробництві інтерферонів, гормонів).

Розчини і живильні середовища для культури клітин

Робота з культурою клітин вимагає абсолютної стерильності, ретельної підготовки посуду, відповідних розчинів, живильних середовищ та високої якості води.

Для виготовлення живильних середовищ і при різних маніпуляціях із культурою клітин (відмивання тканини від кров'яних елементів, відмивання культури від ростового середовища, розведення вірусу) використовують *збалансовані сольові розчини Хенкса та Ерла*. Вони містять солі натрію, калію, магнію й кальцію, а також глюкозу, що забезпечує збереження рН, осмотичного тиску в клітинах і відповідну концентрацію необхідних неорганічних речовин. Для контролю рН до складу розчинів Хенкса та Ерла часто включають індикатор феноловий червоний (0,002%).

Диспергувальний 0,25%-й розчин трипсину застосовують для дезагрегації тканини на окремі клітини і для зняття клітин зі скла при пересіві. *Диспергувальний 0,02%-й розчин версену* використовують для зняття клітин зі скла.

Для вирощування культури клітин широкого застосування набули *синтетичні середовища 199 та Ігла*. До складу середовища 199 входять понад 60 компонентів: 20 амінокислот, 16 вітамінів, складові частини нуклеїнових кислот (пурини, піримідини), коферменти, відновники, джерела ліпідів і вуглеводів, 7 мінеральних солей, глюкоза. Середовище Ігла складається з 13 амінокислот, 8 вітамінів, 6 мінеральних солей, глюкози. Крім того, використовують *напівсинтетичні середовища*, що є ферментативними гідролізатами різних білкових речовин, найчастіше *0,5%-й розчин гідролізату лактоальбуміну* (середовище ГЛА).

До всіх живильних середовищ додають *індикатор феноловий червоний* (0,002%) для контролю рН. При нейтральному значенні рН колір середовища червоно-оранжевий. У міру підкислення середовища продуктами метаболізму клітин рН знижується, і середовище поступово жовтіє, що слугує сигналом для його заміни. При зрушенні рН у лужний бік середовище набуває малинового кольору. Це, як правило, буває тоді, коли пробірки або матраци, де культивуються клітини, нещільно закриті гумовими пробками.

Для знищення бактеріальної мікрофлори до середовищ і розчинів додають *антибіотики*: 100 ОД/мл пеніциліну і 100 мкг/мл стрептоміцину. За потреби використовують ністатин 50 ОД/мл для пригнічення плісняви.

За призначенням живильні середовища поділяються на дві групи: *ростові* та *підтримувальні*. Ростові середовища застосовують у перші дні культивування клітин; вони забезпечують життя і розмноження клітин. До складу ростових середовищ входить 2–10% сироватки крові (частіше ВРХ або коня), що містить фактори адгезії та росту, без яких клітини не можуть прикріпитися до скла і ділитися. Підтримувальні середовища не містять сироватки крові; вони забезпечують життєдіяльність клітин і використовуються після формування моношару та зараження культури клітин вірусом.

Самостійна робота. Розглянути у світловому мікроскопі фіксовані препарати з незараженою культурою клітин. Ознайомитися з розчинами і живильними середовищами для культури клітин.

Результат: _____

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Отримання первинно-трипсинізованої культури клітин і субкультури

Методика отримання первинно-трипсинізованої культури клітин

1. Тканину подрібнюють ножицями на шматочки розміром 2–5 мм, промивають декілька разів розчином Хенкса до одержання прозорої рідини.

2. Тканину переносять у колбу з магнітиком, додають 0,25%-й розчин трипсину в співвідношенні 1:10, поміщають на магнітну мішалку і трипсинізують.

3. Трипсинізацію можна проводити такими методами:

а) *Метод теплої трипсинізації* частіше використовують для диспергування ембріональних тканин. Трипсинізацію проводять дробно при 37°C кілька разів по 5–30 хв (залежно від типу тканини).

Першу порцію трипсину виливають. Трипсин із клітинами, що відділилися, зливають через 2–3 шари марлі в колбу, яку поміщають на лід або в холодильник для припинення дії ферменту. До тканини, що залишилася в колбі, додають свіжу порцію трипсину і знову трипсинізують. Трипсинізацію проводять 3–5 разів до повного виснаження тканини.

б) *Метод холодної трипсинізації* використовують для диспергування тканин дорослих тварин; проводять у холодильнику при 4–6°C 12–16 год.

4. Суспензію клітин розливають по центрифужних пробірках (флаконах) і центрифугують при 1000 об/хв 10–15 хв. Надосадову рідину виливають, до осаду клітин додають невелику кількість ростового середовища.

5. Підраховують кількість клітин у камері Горєва, використовуючи 0,1%-й розчин кристалвіолету. Підраховують нефарбовані клітини з чіткими контурами та ядрами і за відповідною формулою визначають кількість клітин у 1 мл суспензії.

6. Суспензію клітин розводять ростовим середовищем до оптимальної посівної концентрації (200–500 тис. клітин у 1 мл), розливають по пробірках (по 1 мл), мікропланшетах (по 0,2 мл) або матрацах (10–15% від об'єму), щільно закривають гумовими пробками (для попередження залуження середовища). На пробірках восковим олівцем проводять поздовжню лінію, кладуть ряскою догори в лотки з кутом нахилу 5° і поміщають у термостат при 37°C.

7. Після формування моношару ростове середовище змінюють на підтримувальне і використовують культуру клітин для зараження вірусами або для пересіву.

Методика отримання субкультури

1. З матраців із сформованим моношаром клітин зливають ростове середовище, вносять розчин трипсину або версену, підігрітий до 37°C, у такій кількості, щоб вкрити моношар.

2. Витримують у термостаті при 37°C 15–30 хв (до появи перших ознак відшарування клітин).

3. Матраци струшують, суспензію клітин розливають по центрифужних пробірках і центрифугують при 1000 об/хв 5–10 хв.

4. Надосадову рідину виливають, осад клітин розводять ростовим середовищем до посівної концентрації, яку визначають, підраховуючи кількість клітин у камері Горєва.

5. Після формування моношару ростове середовище змінюють на підтримувальне.

Самостійна робота. Відпрацювати методику отримання первинно-трипсинізованої культури клітин нирки теляти або фібробластів курячого ембріона та субкультури.

Результат: _____

Дата: _____

Індикація вірусів у культурі клітин

Методика зараження культури клітин

1. Із пробірок, лунок мікропланшетів або матраців із сформованим моношаром клітин видаляють ростове середовище, культуру промивають 1–2 рази розчином Хенкса.

2. У пробірки і лунки мікропланшетів вносять по 0,1–0,2 мл вірусомісного матеріалу (кожною пробєю заражають по 4–10 пробірок або лунок із культурою клітин), у матраці – 1–1,5% від об'єму. Залишають для контакту на 1–2 год за кімнатної температури або при 37°C.

3. Вірусомісний матеріал видаляють і вносять підтримувальне середовище: в пробірки – по 1 мл, у лунки мікропланшетів – по 0,2 мл, у матраці – 10–15% від об'єму. Ставлять у термостат при 37°C і щодня розглядають під малим збільшенням мікроскопа.

Основною ознакою розмноження вірусу в культурі клітин є ***цитопатогенна дія (ЦПД), або цитопатичний ефект (ЦПЕ)***. Це будь-які морфологічні зміни клітин, які виникають унаслідок репродукції вірусу. Розрізняють 3 основні форми ЦПД:

1) ***округлення клітин*** (рис. 14) – під дією вірусу клітини, що в нормі розпластані на склі, втрачають зв'язки між собою, зморщуються, округлюються, відділяються від скла, переходять у культуральну рідину і гинуть;

2) *фрагментація клітин* (рис. 15) – під дією вірусу клітини розпадаються на окремі фрагменти, відділяються від скла і переходять у культуральну рідину у вигляді клітинного детриту;

3) *утворення симпластів* (син.: *синцитії, полікаріоцити*) (рис. 16) – під дією вірусу плазматичні мембрани сусідніх клітин зливаються і виникають гігантські багатоядерні клітини.

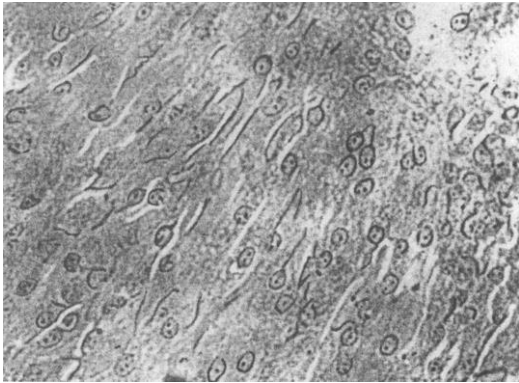


Рис. 13. Первинна культура клітин сім'яників теляти

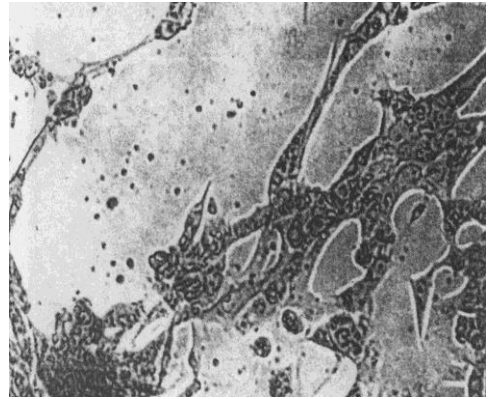


Рис. 14. ЦПД – округлення клітин

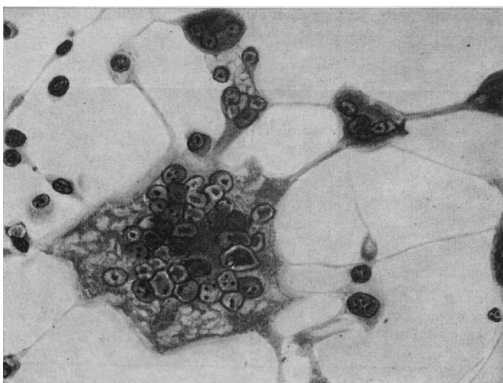


Рис. 15. ЦПД – фрагментація клітин

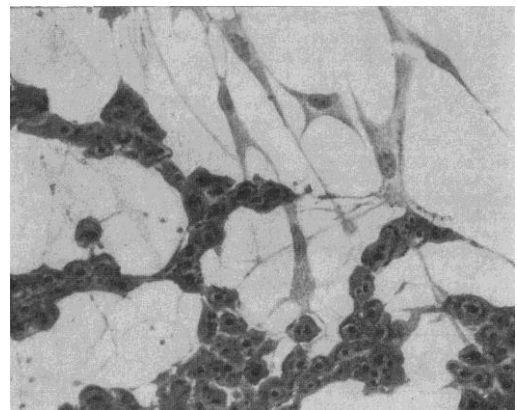


Рис. 16. ЦПД – утворення симпластів

Характерним для ЦПД багатьох вірусів є утворення *внутрішньоклітинних тілець-включень*, які виявляють фарбуванням зараженої культури клітин гематоксилін-еозином.

ЦПД проявляється через 3–14 діб (залежно від виду вірусу і типу культури клітин) та оцінюється в плюсах:

- + (25%) – деструкція окремих клітин культури;
- ++ (50%) – деструкція половини клітин культури;
- +++ (75%) – деструкція більшості клітин культури, утворення пустот у моношарі внаслідок відривання клітин від скла;
- ++++ (100%) – деструкція всіх клітин культури, на склі залишаються невеликі вогнища змінених клітин.

Для отримання максимальної концентрації вірусу пробірки та матраци із зараженою культурою клітин виймають із термостату на кінцевих стадіях ЦПД (3–4 плюси). ЦПД вірусів потрібно відрізнити від неспецифічної дегенерації клітин, що спостерігається при старінні культури. Тому для контролю залишають 4–6 пробірок із незараженою культурою (рис. 13), в яких лише змінюють середовище.

Деякі онкогенні віруси (зокрема вірус саркоми Рауса) можуть спричинити в культурі клітин **цитопроліферативний (або трансформувальний) ефект** (рис. 17). Він полягає в утворенні фокусів трансформації, що складаються зі скупчень кількох шарів округлих клітин, які під впливом вірусу втратили властивість контактної інгібіції та набули здатності до безперервного поділу.

Індикацію вірусів у культурі клітин можна провести за явищем **гемадсорбції** (рис. 18). Це прикріплення еритроцитів до поверхні клітин, заражених гемаглютинувальним вірусом (наприклад, збудниками грипу, парагрипу-3 ВРХ, ньюкаслської хвороби). Гемадсорбція виникає за рахунок вірусного білка гемаглютиніну, який модифікує клітинну плазмолему, і вона стає спорідненою з рецепторами еритроцитів. Кожний вірус здатний спричинити гемадсорбцію еритроцитів того виду, який він аглютинує, причому гемадсорбція проявляється швидше, ніж ЦПД.

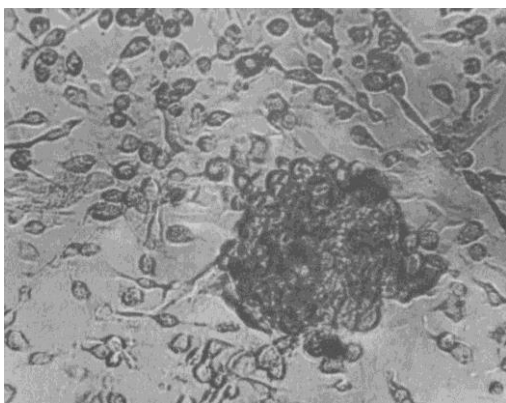


Рис. 17. Трансформувальний ефект

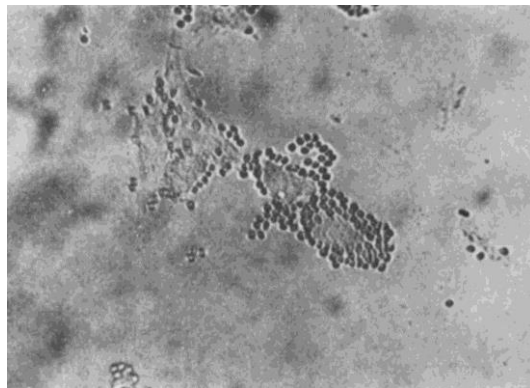


Рис. 18. Гемадсорбція

Для постановки *реакції гемадсорбції (РГАд)* в 2–4 пробірки з інфікованою культурою клітин через 3–5 днів після зараження вносять по 0,2 мл 0,4–0,5%-ї суспензії еритроцитів певного виду (в лунки мікропланшетів – по 0,05 мл). Пробірки витримують у горизонтальному положенні 10–15 хв за кімнатної температури або 30–40 хв при 4°C (залежно від виду вірусу), злегка струшують і

розглядають під малим збільшенням мікроскопа. Для контролю такі самі маніпуляції проводять із незараженою культурою клітин. Реакція вважається позитивною, якщо в пробірках з інфікованою культурою еритроцити прикріпилися до поверхні клітин, а в контрольних – гемадсорбція відсутня. Гемадсорбція буває дифузною, вогнищевою або тільки по периферії моношару у вигляді «намиста», що залежить від виду вірусу і культури клітин.

Для індикації вірусів у культурі клітин можна застосовувати **метод бляшок** (рис. 19). Це обмежені вогнища загиблих під дією вірусу клітин у суцільному моношарі культури. Для отримання бляшок культуру клітин, вирощену в матрацах, заражають вірусом (у невисокій концентрації) і вносять спеціальне агарове покриття такого складу: агар, розчин Ерла, сироватка крові ВРХ, натрію гідрокарбонат, антибіотики та індикатор нейтральний червоний. Через 30–60 хв після застигання середовища матраци поміщають у термостат при 37°C, загорнувши в світлонепроникливий матеріал. Інкубацію проводять клітинами догори. Спостерігають за появою бляшок упродовж 4–12 діб.

За цей час вірус проходить повний цикл репродукції з формуванням віріонів потомства, які можуть уражати лише сусідні клітини, оскільки агарове покриття обмежує поширення вірусу. Тому в суцільному моношарі живих клітин виникають осередки зруйнованих клітин як наслідок репродукції вірусу. Над живими клітинами середовище підкислюється продуктами метаболізму і стає червоно-рожевого кольору. Над вогнищами загиблих клітин середовище безбарвне. Це і є бляшки. Кожна бляшка – результат розмноження одного віріона, але за умови інфікування культури високими розведеннями вірусу, щоб виключити множинність зараження клітин. За високої концентрації вірусу бляшки зливаються.

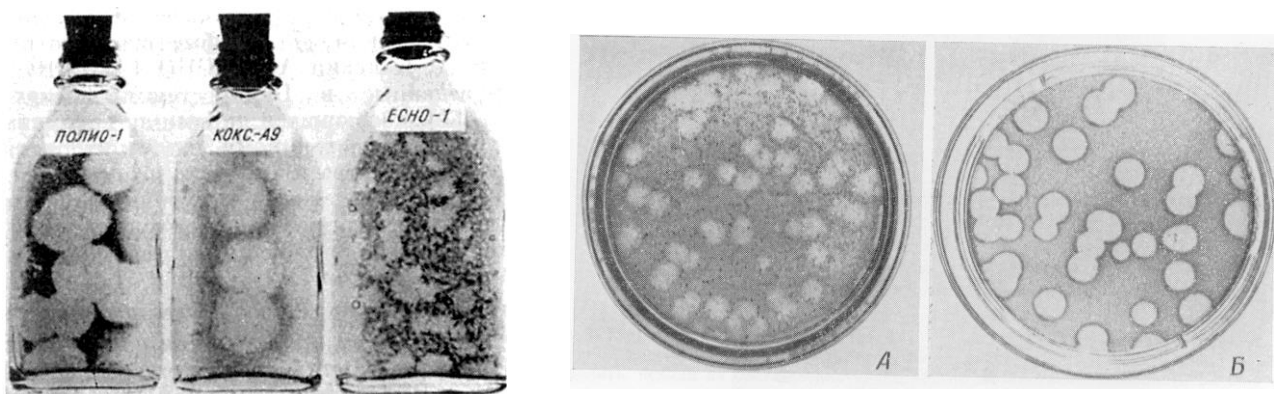


Рис. 19. Бляшки

Метод бляшок технічно складний для виконання, тому використовується в основному для титрування вірусів, а також із метою отримання генетично однорідних популяцій вірусів (клонів) при дослідженні їхніх генетичних властивостей.

Орієнтовним методом виявлення вірусів у культурі клітин є **кольорова проба**. Вона полягає в тому, що в незаражених культурах під впливом продуктів метаболізму клітин середовище, яке містить індикатор феноловий червоний, підкислюється і стає жовтого кольору. У той час у заражених культурах клітини гинуть під дією вірусу, і середовище зберігає червоний колір. Найчіткіші результати дають віруси з високою швидкістю репродукції при культивуванні їх у культурах, які повільно ростуть. Достовірність кольорової проби невисока, тому цей метод використовується у вірусологічній практиці нечасто.

Самостійна робота. Розглянути у світловому мікроскопі фіксовані препарати із зараженою культурою клітин (із різними формами ЦПД та гемадсорбцією). Розглянути матраци з бляшками і пробірки з кольоровою пробою.

Результат:_____

Контрольні запитання

1. У чому полягає значення культури клітин для розвитку вірусології?
2. З якою метою використовують культури клітин у вірусологічній практиці?
3. Назвіть переваги культури клітин порівняно з лабораторними тваринами і курячими ембріонами.
4. Як класифікуються тканинні культури?
5. Що таке органна культура?
6. Що таке культура клітин?
7. Що таке моношарова культура клітин?
8. Що таке суспензійна культура

клітин, які її переваги? **9.** Охарактеризуйте первинно-трипсинізовану культуру клітин, її переваги та недоліки. **10.** Охарактеризуйте субкультуру, її переваги та недоліки. **11.** Охарактеризуйте перещеплювану культуру клітин, її переваги та недоліки. **12.** Охарактеризуйте диплоїдну культуру клітин, її переваги та недоліки. **13.** Які ви знаєте стадії розвитку культури клітин? **14.** Які розчини використовуються при отриманні культури клітин? **15.** Які живильні середовища використовуються для вирощування культури клітин? **16.** Як поділяються живильні середовища за призначенням? **17.** З якою метою до розчинів і живильних середовищ додають антибіотики та індикатор феноловий червоний? **18.** Як консервують культури клітин? **19.** Розкажіть методику отримання первинно-трипсинізованої культури клітин. **20.** Розкажіть методику отримання субкультури. **21.** Розкажіть методику зараження культури клітин. **22.** Як проводять індикацію вірусів у культурі клітин? **23.** Що таке ЦПД? Охарактеризуйте форми ЦПД. **24.** Що таке трансформувальний ефект? **25.** Що таке гемадсорбція? Техніка постановки РГАд. **26.** Що таке бляшки? Техніка отримання їх. **27.** Що таке кольорова проба? **28.** Що таке неспецифічна дегенерація культури клітин?

Т е м а 8

Титрування вірусів

Кількість годин: 3

Мета занять. Засвоїти методи титрування вірусів за інфекційною активністю (зі статистичним та одиничним ефектами). Вивчити техніку постановки РГА.

Матеріальне забезпечення. Завдання для визначення інфекційного титру вірусу в ЕД₅₀ за методом Ріда і Менча; вірусомісна суспензія, 0,9%-й розчин NaCl, 1%-ва суспензія еритроцитів, пластикові планшети, предметні скельця, піпетки, гумова груша, дезрозчин.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Загальні принципи титрування вірусів

В умовах лабораторії та біофабричного виробництва при роботі з вірусами постійно виникає необхідність їхнього кількісного визначення. Це потрібно, зокрема, при отриманні вірусних вакцин, імунних сироваток і діагностичних препаратів; при зараженні лабораторних об'єктів; при постановці серологічних реакцій.

Титр вірусу – це його кількість, що міститься в одиниці об'єму вірусомісного матеріалу. Віруси титрують за інфекційною та гемаглютинувальною активністю і визначають відповідно *інфекційний* та *гемаглютинувальний титри*.

Титрування вірусів за інфекційною активністю

Титрування вірусів за інфекційною активністю зі статистично оцінюваним ефектом

Оскільки чутливість біологічних систем до вірусів (навіть високо-вірулентних штамів) коливається в широких межах, інфекційний титр у переважній більшості випадків можна визначити як статистичну величину. За одиницю інфекційного титру прийнята **50%-ва ефективна доза – ЕД₅₀**. Це така доза вірусу, яка спричинює інфекційний ефект у 50% заражених біологічних систем. Залежно від виду тест-об'єкта і форми прояву інфекційної дії вірусу ЕД₅₀ називається по-різному в кожному конкретному випадку (див. таблицю 1).

Т а б л и ц я 1. Значення ЕД₅₀.

Тест-об'єкти	Інфекційна дія вірусу	Назва ЕД ₅₀
Лабораторні тварини	Загибель	ЛД ₅₀ – 50%-ва летальна доза
	Клінічні ознаки або патологоанатомічні зміни	ІД ₅₀ – 50%-ва інфекційна доза
Курячі ембріони	Загибель	ЕЛД ₅₀ – 50%-ва ембріональна летальна доза
	Патологоанатомічні зміни	ЕІД ₅₀ – 50%-ва ембріональна інфекційна доза
Культура клітин	Цитопатичний ефект	ТЦД ₅₀ – 50%-ва тканинна цитопатична доза

Методика визначення ЕД₅₀

1. Готують послідовні 10-разові розведення вірусу на 0,9%-му розчині NaCl, розчині Хенкса або середовищі для культури клітин (залежно від виду тест-об'єкта). У кінцевих розведеннях інфекційна дія вірусу не повинна проявлятися.

2. Кожним розведенням вірусу в однаковому об'ємі заражають рівну кількість чутливих тест-об'єктів (не менше 4).

3. Спостерігають упродовж 5–12 діб, враховують результати дії вірусу (загибель, клінічні ознаки, патологоанатомічні зміни чи ЦПД).

4. Розведення вірусу, яке спричинює 50%-й інфекційний ефект, розраховують статистичним методом Ріда і Менча.

5. Визначають, скільки ЕД₅₀ містить такий самий об'єм нерозведеного вірусу і перераховують кількість ЕД₅₀ на 1 мл вірусомісного матеріалу.

Розрахунок ЕД₅₀ за методом Ріда і Менча

Приклад: протитрувати вірус ектромелії (віспи мишей) на білих мишках, заражаючи їх внутрішньочеревно в об'ємі по 0,5 мл по 6 мишок на одне розведення вірусу; титр вірусу визначити в ЛД₅₀.

Метод Ріда і Менча ґрунтується на інтерполяції фактичних результатів титрування й отриманні кумулятивних даних. Це дає змогу штучно збільшити кількість тест-об'єктів і відповідно зменшити погрішність розрахунку ЕД₅₀. Виходять із логічного припущення, що мишка, яка вижила при зараженні високою дозою вірусу, тим більше виживе від меншої дози. І навпаки, тварина, що загинула від низької дози вірусу, тим більше загине від високої дози.

Виходячи з таких міркувань, підсумовують фактичні дані (див. таблицю 2). Спочатку отримують кумулятивні дані щодо тварин, які вижили, додаючи їхню кількість від більших доз вірусу до менших (↓).

Таблиця 2. Титрування вірусів за методом Ріда і Менча

Розведення вірусу	Фактичні дані		Кумулятивні дані			
	Вижило ↓	Загинуло ↑	Вижило	Загинуло	Відношення загиблих до заражених	% леталь- ності
10 ⁻¹	0	6	0	17	17:17	100
10 ⁻²	1	5	1	11	11: 12	91,7
10 ⁻³	2	4	3	6	6 : 9	66,7
10 ⁻⁴	4	2	7	2	2 : 9	22,2
10 ⁻⁵	6	0	13	0	0 : 13	0
10 ⁻⁶	6	0	19	0	0 : 19	0

Від розведення вірусу 10⁻¹ жодна мишка не вижила, а від розведення 10⁻² вижила одна. Ці цифри переписують у відповідну графу кумулятивних даних, оскільки нема що підсумовувати. Від розведення 10⁻³ фактично вижило 2 мишки плюс 1, що вижила від більшої дози вірусу (10⁻²), разом буде 3. Від розведення 10⁻⁴ фактично вижило 4 мишки плюс 1 і 2, які вижили від більших доз

(10^{-2} і 10^{-3}), разом буде 7. Від розведення 10^{-5} фактично вижило 6 мишок плюс 1, 2, і 4, які вижили від більших доз (10^{-2} , 10^{-3} і 10^{-4}), разом буде 13. А при розведенні 10^{-6} , якщо скласти всі дані, отримаємо 19 мишок.

Так само отримують кумулятивні дані щодо тварин, які загинули, підсумовуючи їхню кількість від менших доз вірусу до більших (\uparrow). Потім вираховують відсоток летальності для кожного розведення вірусу, користуючись отриманими кумулятивними даними.

Розведення вірусу, яке містить 1 ЛД₅₀, визначають за формулою:

$$\lg \text{ЛД}_{50} = \lg B - \frac{b - 50}{b - a} \times \lg d$$

$\lg \text{ЛД}_{50}$ – ступінь розведення вірусу, що містить 1 ЛД₅₀;

B – розведення вірусу, яке дає ефект більше 50% (10^{-3});

b – відсоток, що відповідає розведенню B (66,7);

a – відсоток, що відповідає розведенню, яке дає ефект менше 50% (22,2);

d – коефіцієнт розведення вірусу (10).

$$\lg \text{ЛД}_{50} = \lg 10^{-3} - \frac{66,7 - 50}{66,7 - 22,2} \times \lg 10 = -3 - \frac{16,7}{44,5} \times 1 = -3 - 0,37 = -3,37$$

Отже, 0,5 мл вірусу, розведеного в $10^{-3,37}$ разів, містить 1 ЛД₅₀. Тоді в 0,5 мл нерозведеної вірусомісної суспензії міститься $10^{3,37}$ ЛД₅₀. Значить, титр вірусу становить:

$T = 10^{3,37} \text{ ЛД}_{50}/0,5 \text{ мл}$, або $2 \times 10^{3,37} \text{ ЛД}_{50}/\text{мл}$, або, якщо перевести в абсолютне число, 4688 ЛД₅₀/мл.

Титрування вірусів за інфекційною активністю, оцінюваною за одиничним ефектом

Інфекційну активність вірусів можна оцінити за *одиничним ефектом* – появі в тест-об'єктів локальних уражень, а саме: утворення бляшок у культурі клітин і віспин на ХАО курячого ембріона. Відповідно інфекційний титр вірусу визначають у *бляшкотвірних одиницях (БТО)* і *віспотвірних одиницях (ВТО)*. **1 БТО** – це доза вірусу, яка спричинює утворення однієї бляшки в культурі клітин. **1 ВТО** – це доза вірусу, що спричинює утворення однієї віспини на ХАО курячого ембріона.

Для визначення інфекційного титру вірусу в БТО або ВТО певним розведенням вірусомісного матеріалу в однаковому об'ємі заражають декілька матраців із культурою клітин або курячих ембріонів на ХАО. Через відповідний час підраховують кількість

бляшок або віспин, виводять середнє арифметичне і роблять перерахунок на 1 см³ нерозведеної вірусомісної суспензії.

Визначення інфекційної активності вірусу за бляшкоутворенням є достовірним методом, на 1–2 порядки чутливішим від титрування за цитопатичним ефектом. Проте він зустрічає технічні труднощі, пов'язані з отриманням бляшок. Стосовно віспин, то використання їх для титрування вірусів обмежується досить нечисленною групою вірусів, здатних утворювати некротичні осередки на ХАО курячого ембріона.

Самостійна робота. Розрахувати інфекційний титр вірусу за методом Ріда і Менча.

Результат: _____

Розведення вірусу	Фактичні дані		Кумулятивні дані			

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Титрування вірусів за гемаглютинувальною активністю

Гемаглютинація – це здатність вірусів склеювати еритроцити за рахунок білка *гемаглютиніну*, який входить до складу капсидної або суперкапсидної оболонки вірусів (залежно від складності їхньої організації). Механізм гемаглютинації полягає в адсорбції віріонів на поверхні еритроцитів та утворенні «містків» між ними, внаслідок чого еритроцити склеюються й осідають на дно пробірки або лунки планшета у вигляді «*парасольки*». Неаглютиновані еритроцити осідають у вигляді «*гудзика*». Процес гемаглютинації є оборотним. Віруси, що адсорбувалися на еритроцитах, можуть звільнитися з їхньої поверхні під дією вірусного ферменту *нейрамінідази*.

Кожний гемаглютинувальний вірус здатний склеювати еритроцити тварин певних видів, за відповідної температури і рН середовища. РГА дає змогу швидко виявити гемаглютинувальні віруси в патматеріалі від хворих тварин і заражених лабораторних тварин, в алантоїсній та амніотичній рідині курячих ембріонів і в культуральній рідині. У РГА визначають *гемаглютинувальний титр* вірусу.

Постановка РГА

1. Готують дворазові розведення вірусу на 0,9%-му розчині NaCl в однаковому об'ємі (0,5 мл, 0,2 мл, 0,1 мл, найчастіше – 0,05 мл, 0,025 мл або 0,02 мл).

2. До кожного розведення вірусу додають рівний об'єм 1%-ї суспензії еритроцитів певного виду.

3. В останню лунку вірус не вносять, а залишають для контролю еритроцитів на спонтанну гемаглютинацію.

4. Планшети струшують і витримують певний час при відповідній температурі (4°C, 18–22°C або 37°C) залежно від виду вірусу. Найчастіше експозиція становить 60 хв за кімнатної температури.

5. Результати реакції оцінюють у плюсах після повного осідання еритроцитів у контрольній лунці (рис. 20):

++++ – всі еритроцити аглютиновані й утворюють суцільний шар у вигляді «парасольки» з опалими краями;

+++ – всі еритроцити аглютиновані й утворюють «парасольку» з рівними краями;

++ – більшість еритроцитів аглютинована й утворює «парасольку», по краях якої відмічається тонке кільце з неаглютинованих еритроцитів;

+ – більшість еритроцитів не аглютинована й утворює осад у вигляді «гудзика», по краях якого є незначна «парасолька» (або по краях «парасольки» розміщується широке кільце з неаглютинованих еритроцитів);

– – всі еритроцити не аглютиновані й осіли у вигляді «гудзика» з рівними краями.

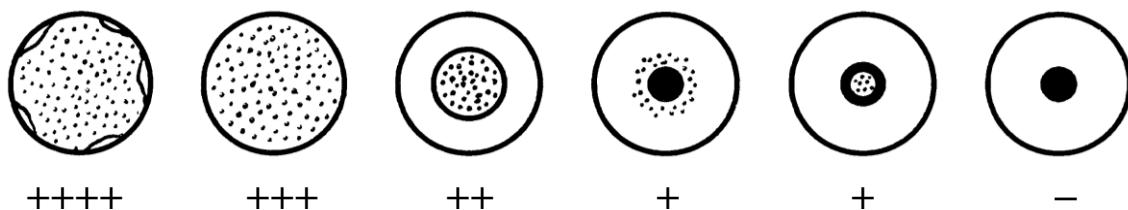


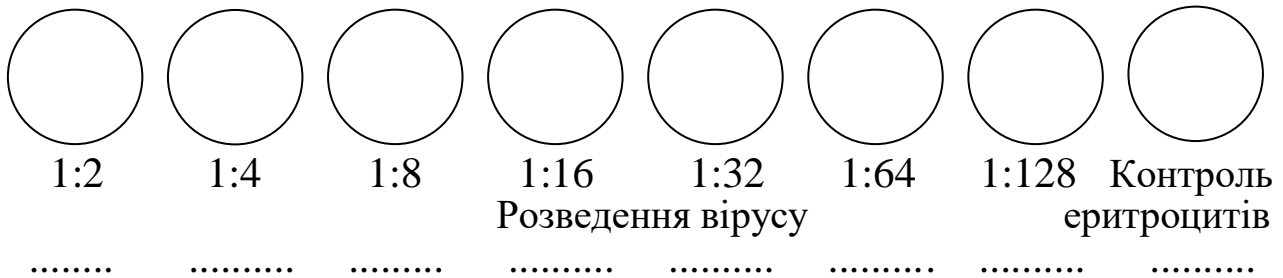
Рис. 20. Оцінка результатів РГА

За *одну гемаглютинувальну одиницю (1 ГАО)* приймають найбільше розведення вірусу, яке спричинює чітко виражену гемаглютинацію (не менше ніж на 2 плюси). Кількість ГАО в нерозведеному вірусомісному матеріалі виражає титр вірусу. Показником гемаглютинувального титру вірусу є число, обернено пропорційне його розведенню. Наприклад, якщо 1 ГАО міститься в розведенні вірусу 1:128, то його титр становить 128 ГАО. При позначенні гемаглютинувального титру вірусу об'єм вірусомісного матеріалу можна не вказувати, оскільки об'єм титрування не має суттєвого впливу на результати РГА (завжди змішують рівні об'єми вірусу та 1%-ї суспензії еритроцитів).

Самостійна робота. Поставити РГА, оцінити результати реакції, визначити гемаглютинувальний титр вірусу. Зробити рисунки.

Результат: _____

Результат РГА



Оцінка реакції в плюсах

Титр вірусу _____

Контрольні запитання

1. Яке практичне значення титрування вірусів?
2. Що таке титр вірусу?
3. Які ви знаєте титри вірусу?
4. Назвіть одиниці виміру інфекційного титру вірусу.
5. Що таке ЕД₅₀?
6. Що таке ЛД₅₀?
7. Що таке ІД₅₀?
8. Що таке ЕЛД₅₀?
9. Що таке ЕІД₅₀?
10. Що таке ТЦД₅₀?
11. Що таке БТО?
12. Що таке ВТО?
13. Як визначають інфекційний титр вірусу в ЕД₅₀?
14. На чому ґрунтується метод Ріда і Менча?
15. Як визначають інфекційний титр вірусу в БТО?
16. Як визначають інфекційний титр вірусу у ВТО?
17. Що таке гемаглютинація?
18. Що таке ГАО?
19. Розкажіть методику постановки РГА.
20. Як оцінюють результати РГА і вираховують титр вірусу в ГАО?

Т е м а 9 Серологічні реакції

Кількість годин: 7

Мета занять. Ознайомитися з метою використання серологічних реакцій у вірусології. Засвоїти суть і методику постановки серологічних реакцій, найбільш актуальних для вірусологічної практики: РН, РЗГА, РНГА, РЗГАд, РДП, РЗК, РІФ, ІФА.

Матеріальне забезпечення. Біофабричні набори діагностикумів, досліджувані сироватки крові, вірусомісний матеріал, 0,9%-й розчин NaCl, дезрозчин, агар (для РДП), суспензія еритроцитів (для РЗГА і РЗК), пробірки, планшети, піпетки, гумова груша, фіксовані препарати з культурою клітин (незараженою, з ЦПД і гемадсорбцією), світлові мікроскопи, люмінесцентний мікроскоп, фотографії РІФ та ІФА, демонстрація результатів РЗГА, РНГА, РЗК, РДП та ІФА.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Загальні принципи серологічних реакцій

В основі *серологічних реакцій* лежить специфічна взаємодія *вірусних антигенів* (вірусних білків) та *антитіл*. Серологічні реакції мають дуже важливе значення в лабораторній діагностиці вірусних хвороб тварин. Вони використовуються:

- 1) для *експрес-діагностики* – швидкого виявлення вірусних антигенів безпосередньо в патматеріалі від хворих і загиблих тварин;
- 2) для *ідентифікації вірусу*, виділеного на лабораторних тваринах, курячих ембріонах або в культурах клітин;
- 3) для *серологічної (ретроспективної) діагностики* – встановлення зростання титру антитіл у парних сироватках крові тварин-реконвалесцентів.

Вибір серологічної реакції для ідентифікації вірусу або виявлення антитіл визначається в основному властивостями самого вірусу, а також можливостями лабораторії. Для постановки серологічних реакцій біологічна промисловість випускає *набори діагностикумів*, які складаються з антигенів та сироваток (специфічних, нормальних) і розраховані на проведення комплексних досліджень. *Специфічні антигени* отримують з ембріональних рідин (алантоїсної, амніотичної) заражених курячих ембріонів або з культуральних вірусомісних рідин. *Нормальні антигени* одержують від незаражених біологічних об'єктів або із суспензій тканин здорових тварин. *Специфічні сироватки* отримують шляхом імунізації тварин-донорів, а *нормальні сироватки* беруть від здорових тварин. На кожний набір діагностикумів затверджена настанова щодо його практичного використання.

При дослідженні сироваток крові треба врахувати наявність у них *вірусних інгібіторів* – білків, які, як і антитіла, здатні нейтралізувати інфекційну та гемаглютинувальну активність вірусів, імітуючи таким чином позитивний результат реакції, що може призвести до діагностичної помилки. Тому перед постановкою реакцій сироватки інактивують при 56–60°C упродовж 30 хв.

Реакція нейтралізації (РН)

РН ґрунтується на властивості антитіл блокувати інфекційну активність вірусу, тобто його здатність репродукуватися в чутливих біологічних системах. Нейтралізувальна дія антитіл полягає в їхній взаємодії з прикріпними білками вірусу, відповідальними за його адсорбцію на клітині. РН ставлять на лабораторних тваринах (найчастіше новонароджених білих мишенятах), курячих ембріонах або в культурах клітин та оцінюють результати за відсутністю інфекційного ефекту.

Виявлення антитіл у РН

Компоненти реакції:

1) досліджувані сироватки; 2) вірус; 3) тест-об'єкти (лабораторні тварини, курячі ембріони, пробірки або мікропланшети з культурою клітин); 4) 0,9%-й розчин NaCl, розчин Хенкса або середовище для культури клітин.

Постановка РН

1. Визначення робочої дози вірусу

Проводять титрування вірусу за методом Ріда і Менча, визначають 1 ЕД₅₀. Для основного дослідження готують робочу дозу вірусу з таким розрахунком, щоб у кожний тест-об'єкт потрапило при зараженні 100 або 1000 ЕД₅₀.

2. Основний дослід РН

а) Готують дворазові розведення досліджуваної сироватки від 1:4 до 1:256 в об'ємі 0,5 мл.

б) До кожного розведення сироватки додають по 0,5 мл вірусу в робочій дозі 100 або 1000 ЕД₅₀ на один тест-об'єкт.

в) Суміші сироватки з вірусом струшують і витримують 1–2 год за кімнатної температури або при 37°C чи 16–18 год при 4°C залежно від виду вірусу.

г) Кожною сумішшю сироватки з вірусом заражають по 4 тест-об'єкти в однаковому об'ємі (мишенятам інокулюють по 0,01 мл і/ц і 0,1–0,2 мл в/ч або п/ш; курячим ембріонам – по 0,2 мл; у пробірки з культурою клітин – по 0,2 мл суміші та 0,8 мл середовища; в лунки мікропланшетів із культурою клітин – по 0,1 мл суміші та 0,1 мл середовища).

д) За зараженими тест-об'єктами спостерігають 5–12 діб, враховують результати.

е) Розраховують за методом Ріда і Менча розведення сироватки, яке захищає 50% тест-об'єктів від інфекційної дії вірусу в робочій

дозі 100 або 1000 ЕД₅₀ на один тест-об'єкт. Це розведення сироватки є показником *титру вірусонейтралізувальних антитіл*.

є) Одночасно ставлять *контролі*:

– контроль вірусу на інфекційну активність (вірус у робочій дозі 100 або 1000 ЕД₅₀ на один тест-об'єкт розводять у 2 рази і заражають 4 тест-об'єкти);

– контроль робочої дози вірусу 100 або 1000 ЕД₅₀ на один тест-об'єкт (готують 10-разові розведення робочої дози вірусу включно до 0,1 ЕД₅₀ і заражають кожним розведенням по 4 тест-об'єкти);

– контроль сироватки на токсичність (сироваткою в розведенні 1:8 заражають 4 тест-об'єкти);

– контроль тест-об'єктів (4 тест-об'єкти залишають незараженими, в пробірках із культурою клітин змінюють середовище).

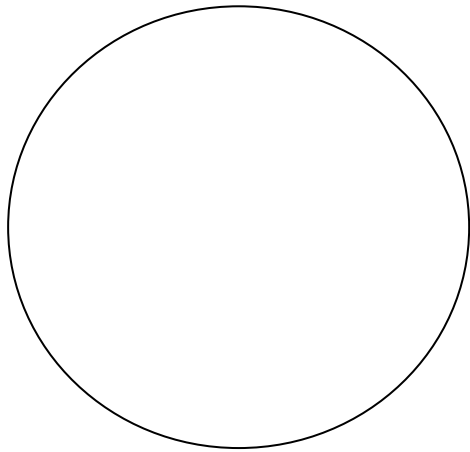
Дану методику використовують і для *ідентифікації вірусу*. Для цього до дворазових розведень специфічної та нормальної сироваток додають рівний об'єм досліджуваного вірусу в робочій дозі 100 або 1000 ЕД₅₀ на один тест-об'єкт і після контакту заражають по 4 тест-об'єкти. Вірус вважається ідентифікованим, якщо специфічна сироватка в розведеннях 1:4 – 1:8 нейтралізує інфекційну дію вірусу за умови прояву її в присутності нормальної сироватки.

Перевага РН в її універсальності: РН можна ставити з усіма вірусами і на всіх біологічних об'єктах, що використовуються для виділення збудників. Проте ця реакція дуже трудомістка, вимагає багато часу, зусиль і матеріальних затрат.

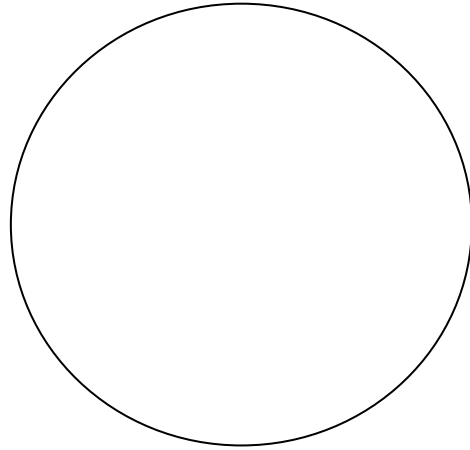
Самостійна робота. Оцінити результати РН на основі перегляду фіксованих препаратів із культурою клітин. Зробити рисунки.

Результат: _____

Результат РН у культурі клітин



Позитивна реакція



Негативна реакція

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Реакція затримки гемаглютинації (РЗГА)

РЗГА базується на здатності антитіл гальмувати гемаглютинувальну активність вірусів за рахунок блокування гемаглютиніну на поверхні віріона. РЗГА використовується для діагностики парагрипу-3 ВРХ, грипу ссавців і птахів, чуми м'ясоїдних, ньюкаслської хвороби та ін.

Виявлення антитіл у РЗГА

Компоненти реакції:

1) досліджувані сироватки; 2) специфічна і нормальна сироватки; 3) вірус; 4) 1%-ва суспензія еритроцитів; 5) 0,9%-й розчин NaCl.

Постановка РЗГА

1. Визначення робочої дози вірусу

Вірус титрують у РГА в об'ємі 0,02 мл, визначають 1 ГАО. Для основного дослідження беруть вірус у робочій дозі 4 ГАО. Наприклад, якщо 1 ГАО встановлена при розведенні вірусу 1:128, то для приготування робочої дози 4 ГАО вірус розводять 1:32, тобто до 1 мл вірусу додають 31 мл 0,9%-го розчину NaCl.

2. Контроль робочої дози вірусу 4 ГАО

Робочу дозу вірусу 4 ГАО титрують у РГА в об'ємі 0,02 мл (2 ГАО, 1 ГАО, 0,5 ГАО, 0,25 ГАО). У перших двох лунках має бути чітка гемаглютинація (на 3 і 2 плюси), а в інших – відсутня.

3. Основний дослід РЗГА

а) Готують дворазові розведення досліджуваної сироватки на 0,9%-му розчині NaCl від 1:10 до 1:1280 і вище в об'ємі 0,02 мл.

б) У всі лунки додають по 0,02 мл робочої дози вірусу 4 ГАО.

в) Планшети струшують і витримують від 30 хв до 18 год при відповідній температурі (4°C, 18–22°C або 37°C) залежно від виду вірусу. Найчастіше експозиція становить 30–60 хв за кімнатної температури.

г) У всі лунки додають по 0,02 мл 1%-ї суспензії еритроцитів.

д) Планшети струшують і витримують 60–90 хв за кімнатної температури.

е) За *титр антитіл* приймають найвище розведення сироватки, яке спричинює повну затримку гемаглютинації.

є) Одночасно ставлять *контролі*:

– контроль досліджуваної сироватки (0,04 мл сироватки в розведенні 1:10 + 0,02 мл 1%-ї суспензії еритроцитів);

– контроль еритроцитів (0,02 мл 1%-ї суспензії еритроцитів + 0,04 мл 0,9%-го розчину NaCl);

– контроль специфічності (постановка основного досліду РЗГА зі специфічною та нормальною сироватками).

Дану методику використовують і для *ідентифікації вірусу*. Для цього до дворазових розведень специфічної та нормальної сироваток додають рівний об'єм досліджуваного вірусу в робочій дозі 4 ГАО і після контакту – 1%-ву суспензію еритроцитів. Вірус вважається ідентифікованим, якщо специфічна сироватка гальмує гемаглютинувальну активність досліджуваного збудника до її титру за умови повної гемаглютинації в присутності нормальної сироватки.

Позитивним у РЗГА є простота і доступність методики, висока чутливість, швидкість отримання результатів. Недолік реакції – вплив на результат неспецифічних інгібіторів гемаглютинації, які містяться в нормальних сироватках крові тварин і людини.

Самостійна робота. Відпрацювати методику постановки РЗГА. Провести облік та інтерпретацію результатів реакції. Зробити рисунки.

Результат: _____

Результат РЗГА

Досліджувана сироватка



.....

Оцінка реакції в плюсах

Титр антитіл _____

Специфічна сироватка



.....

Оцінка реакції в плюсах

Титр антитіл _____

Нормальна сироватка



.....

Оцінка реакції в плюсах

Титр антитіл _____

Теоретичне обґрунтування теми

Реакція непрямой гемаглютинації (РНГА)

РНГА базується на здатності еритроцитів, які сенсibilізовані вірусними антигенами, аглютинуватися в присутності антитіл. Треба відрізнити РНГА від РГА: в РГА еритроцити склеюються в результаті їхньої безпосередньої взаємодії з вірусами, а в РНГА – комплексами антиген–антитіло. РНГА використовується для діагностики хвороби Ауескі, ящуру, інфекційного ринотрахеїту ВРХ, вірусної діареї ВРХ, аденовірусної інфекції ВРХ та ін.

Виявлення антитіл у РНГА

Компоненти реакції:

1) досліджувані сироватки; 2) специфічна і нормальна сироватки; 3) 1%-й антигенний еритроцитарний діагностикум (еритроцитарний антиген); 4) 0,9%-й розчин NaCl (з 1% НСК).

Приготування еритроцитарного антигену включає такі *етапи*:

1) *стабілізація еритроцитів* барана або людини 0 групи формаліном 2 год при 37°C, унаслідок чого вони можуть зберігатися при 4°C кілька років, не гемолізуючись;

2) *танізація еритроцитів* – обробка формалінованих еритроцитів розчином таніну (1:20 тис.) 10–15 хв при 37°C; танізовані еритроцити здатні адсорбувати білки, в тому числі вірусні антигени; їх можна зберігати при 4°C до 7 діб;

3) *сенсibilізація еритроцитів* – обробка танізованих еритроцитів вірусомісною культуральною рідиною впродовж 60 хв при 37°C; відмиті сенсibilізовані еритроцити розводять на ФБР (з 1% НСК) до 1%-ї концентрації.

Постановка РНГА

1. Готують дворазові розведення досліджуваної сироватки від 1:10 до 1:1280 на 0,9%-му розчині NaCl (з 1% НСК) в об'ємі 0,02 мл.

2. До кожного розведення сироватки додають по 0,02 мл 1%-го еритроцитарного антигену.

3. Планшети струшують і витримують 1,5–2 год за кімнатної температури.

4. Результати реакції оцінюють так само, як РГА. За *титр антитіл* приймають найвище розведення сироватки, яке спричинює агрегацію не менше ніж на 2 плюси.

5. Одночасно ставлять *контролі*:

– контроль еритроцитарного антигену (0,02 мл 1%-го еритроцитарного антигену + 0,02 мл 0,9%-го розчину NaCl з 1% НСК);

– контроль специфічності (постановка РНГА зі специфічною та нормальною сироватками).

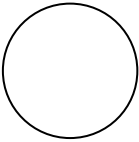
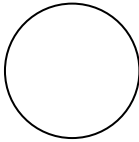
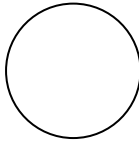
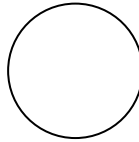
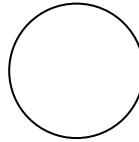
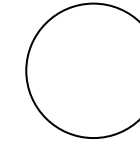
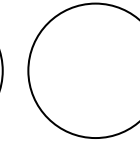
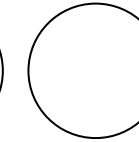
Цю методику використовують і для *ідентифікації вірусів* (збудників ящуру, хвороби Ауескі, класичної чуми свиней, вірусного гепатиту каченят, лейкозу птиці) за допомогою антитільних еритроцитарних діагностикумів, які представляють собою еритроцити, сенсibilізовані антитілами.

РНГА характеризується високою чутливістю, простою технікою постановки, швидкістю отримання результатів. Недолік реакції – труднощі в приготуванні стабільних еритроцитарних діагностикумів.

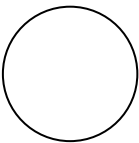
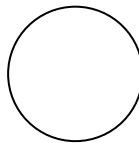
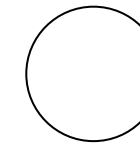
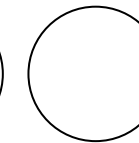
Самостійна робота. Відпрацювати методику постановки РНГА. Провести облік та інтерпретацію результатів реакції. Зробити рисунки.

Результат: _____

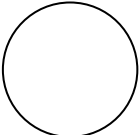
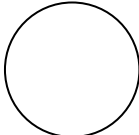
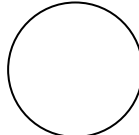
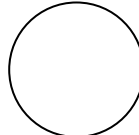
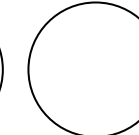
Результат РНГА
Досліджувана сироватка

							
1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Контроль еритроцит. антигену
.....
Оцінка реакції в плюсах Титр антитіл _____							

Специфічна сироватка

							
1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Контроль еритроцит. антигену
.....
Оцінка реакції в плюсах Титр антитіл _____							

Нормальна сироватка

								
1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Контроль еритроцит. антигену	
			Розведення сироватки					
.....	
Оцінка реакції в плюсах								
Титр антитіл _____								

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Реакція затримки гемадсорбції (РЗГАд)

РЗГАд базується на взаємодії антитіл із модифікованою плазмолемою клітин культури, яка заражена гемаглютинувальним вірусом, унаслідок чого клітини втрачають здатність адсорбувати еритроцити. РЗГАд використовується для ідентифікації збудників грипу ссавців і птиці, парагрипу-3 ВРХ, ньюкаслської хвороби та інших гемаглютинувальних вірусів. Особливо цінна ця реакція в тих випадках, коли цитопатичні зміни недостатньо виражені. Недоліком РЗГАд є вплив на вірогідність результатів неспецифічних інгібіторів гемаглютинації, що містяться в сироватках, які використовують для постановки реакції.

Ідентифікація вірусу в РЗГАд

Компоненти реакції:

1) досліджуваний вірус (пробірки або мікропланшети із зараженою культурою клітин); 2) специфічна сироватка; 3) 0,5%-ва суспензія еритроцитів; 4) розчин Хенкса.

Постановка РЗГАд

1. Із 4–8 пробірок (або лунок мікропланшетів) з інфікованою культурою клітин видаляють живильне середовище, культуру промивають розчином Хенкса.

2. У половину пробірок додають по 0,2 мл специфічної сироватки і 0,6 мл розчину Хенкса (в лунки мікропланшетів – по 0,02 мл специфічної сироватки і 0,18 мл розчину Хенкса), в інші (контрольні) пробірки – тільки розчин Хенкса по 0,8 мл (у контрольні лунки мікропланшетів – по 0,2 мл). Витримують 20–30 хв за кімнатної температури.

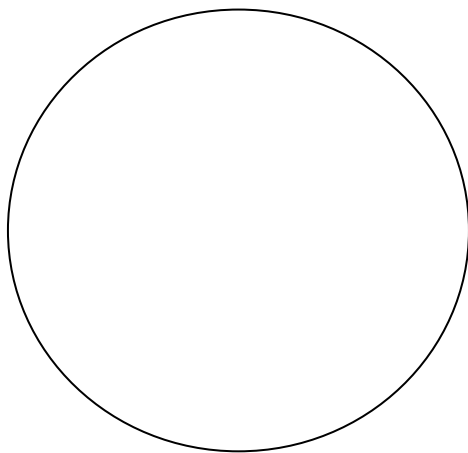
3. У всі пробірки вносять по 0,2 мл 0,5%-ї суспензії еритроцитів (у лунки мікропланшетів – по 0,05 мл), витримують 10–15 хв за кімнатної температури або 30–40 хв при 4°C, злегка струшують і розглядають під малим збільшенням мікроскопа.

4. Вірус вважається ідентифікованим, якщо в пробірках (або лунках мікропланшетів) із специфічною сироваткою гемадсорбція відсутня, а в контрольних – наявна.

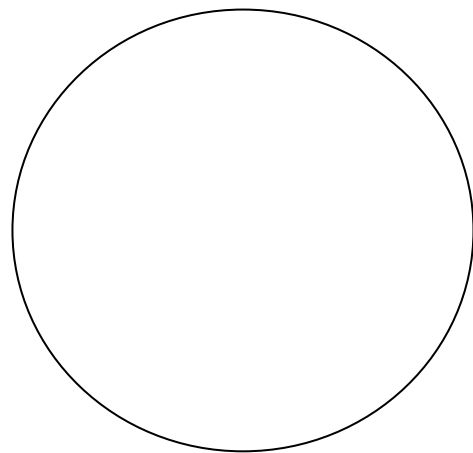
Самостійна робота. Оцінити результати РЗГАд на основі перегляду фіксованих препаратів із культурою клітин. Зробити рисунки.

Результат: _____

Результат РЗГАд



Позитивна реакція



Негативна реакція

Теоретичне обґрунтування теми

Імунохроматографічний аналіз (ІХА)

ІХА ґрунтується на принципі тонкошарової хроматографії з використанням *хроматографічних мембран (імуностріпів)* як твердого носія із нанесеними специфічними антитілами до досліджуваних вірусних антигенів. Одні антитіла мічені колоїдним золотом і є кон'югатом, інші (вторинні) – призначені для фіксації імунних комплексів.

Після внесення досліджуваної проби в зону «S» імуностріпу іммобілізований кон'югат зв'язується з вірусним антигеном. У результаті утворюється комплекси антиген–антитіло, які мігрують по капілярах імуностріпу і після взаємодії з вторинними антитілами фіксуються в зоні «Т» імуностріпу з появою горизонтальної зафарбованої смуги. Не зв'язаний з вірусним антигеном кон'югат мігрує далі по мембрані та взаємодіє з позитивним контролем, іммобілізованим у зоні «С» імуностріпу. Поява горизонтальної зафарбованої смуги в цій зоні свідчить про активність і специфічність усіх компонентів системи.

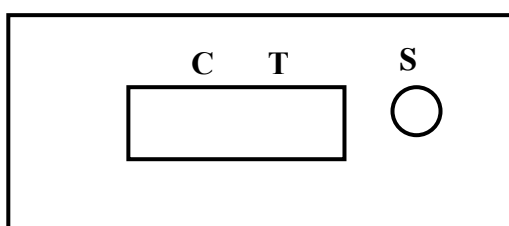
Перевагою ІХА є простота проведення, висока чутливість (93,1–100%) і специфічність (97,5–100%), швидкість отримання результату (5–20 хв), можливість застосування в польових і лабораторних умовах, незалежно від устаткування та спеціальної підготовки персоналу.

ІХА використовується для експрес- і ретроспективної діагностики вірусних інфекцій дрібних тварин (чума, аденовіроз і грип собак, парвовірусна і коронавірусна інфекції собак і котів, лейкемія та імунодефіцит котів).

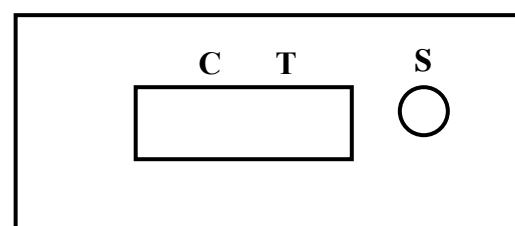
Самостійна робота. Відпрацювати методику постановки ІХА. Провести облік та інтерпретацію результатів реакції. Зробити рисунки.

Результат: _____

Результат ІХА



Позитивна реакція



Негативна реакція

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Реакція зв'язування комплементу (РЗК)

РЗК базується на взаємодії вірусних антигенів з антитілами в присутності комплементу, і при додаванні гемолітичної системи відбувається затримка гемолізу. Реакція використовується для діагностики багатьох вірусних хвороб (ящур, везикулярний стоматит, хвороба Ауескі, аденовірусна інфекція ВРХ та ін.).

Компоненти РЗК: 1) вірусні антигени; 2) сироватки; 3) комплемент; 4) гемолізін (або гемолітична сироватка); 5) 3%-ва суспензія еритроцитів барана.

У РЗК беруть участь *дві системи антиген–антитіло*: специфічна (вірусологічна) та гемолітична. До *специфічної системи* належать вірусні антигени й сироватки з гомологічними антитілами, а до *гемолітичної* – гемолізін та еритроцити барана. *Гемолізін* – це сироватка крові кроля, імунізованого еритроцитами барана; містить антитіла до еритроцитів барана. *Комплемент* – це складний комплекс білків, присутніх у нормальній сироватці крові людини і тварин. Як комплемент використовують сироватку крові мурчака, що випускають на біофабриках у ліофілізованому вигляді. Комплемент має властивість приєднуватися до будь-якого комплексу антиген–антитіло. Це призводить до його активації з утворенням біологічно активних речовин, які спричинюють лізис антигену. Зокрема, в присутності гемолітичної сироватки комплемент зумовлює лізис еритроцитів барана (гемоліз).

Суть РЗК. Змішують вірус, сироватку і комплемент. Якщо вірусний антиген та антитіла гомологічні, утворюються імунні комплекси, які адсорбують комплемент, і при додаванні гемолітичної системи спостерігається *затримка гемолізу*. У разі невідповідності антигену й антитіл комплемент залучається в реакцію з гемолітичною системою, внаслідок чого виникає *гемоліз*.

РЗК ставиться в декілька *етапів*: 1) титрування гемолізіну; 2) титрування комплементу; 3) основний дослід. Для отримання вірогідних результатів РЗК обов'язково необхідно визначити оптимальну концентрацію всіх відомих її компонентів. Так, при надлишку комплементу відбувається його зв'язування і з комплексом антиген–антитіло (якщо він утворився), і з гемолітичною системою, внаслідок чого може виникнути гемоліз і буде поставлений невірний діагноз. Недостача комплементу зумовить затримку гемолізу при

взаємодії його з гемолітичною системою і теж призведе до діагностичної помилки.

Постановка РЗК для виявлення антитіл

Компоненти реакції:

1) досліджувані сироватки; 2) специфічний і нормальний антигени;
3) специфічна і нормальна сироватки; 4) комплемент; 5) гемолізін;
6) 3%-ва суспензія еритроцитів барана; 7) 0,9%-й розчин NaCl.

1. Титрування гемолізину

а) Готують в об'ємі 0,02 мл розведення гемолізину 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:3000, 1:4000 і 1:5000 на 0,9%-му розчині NaCl.

б) До всіх розведень гемолізину додають по 0,02 мл комплементу 1:10 і 3%-ї суспензії еритроцитів барана, а також 0,04 мл 0,9%-го розчину NaCl (замість антигену і сироватки).

в) Витримують у термостаті або на водяній бані при 37°C 10 хв.

г) Результати реакції оцінюють у плюсах (після осідання еритроцитів):

++++ – 100%-ва затримка гемолізу (рідина безколірна, виражений осад еритроцитів);

+++ – 75%-ва затримка гемолізу (рідина злегка забарвлена, виражений осад еритроцитів);

++ – 50%-ва затримка гемолізу (рідина забарвлена, осад частини еритроцитів);

+ – 25%-ва затримка гемолізу (рідина інтенсивно забарвлена, незначний осад еритроцитів);

– – повний гемоліз (рідина інтенсивно забарвлена, осаду еритроцитів немає).

д) За *титр гемолізину* приймають найменшу його кількість, що спричинює повний лізис 3%-ї суспензії еритроцитів у присутності комплементу (1:10) при експозиції 10 хв при 37°C.

е) Для основного дослідження беруть гемолізін у потрібному титрі та готують гемолітичну систему, змішуючи рівні об'єми гемолізину і 3%-ї суспензії еритроцитів барана.

2. Титрування комплементу

а) Готують в об'ємі 0,02 мл розведення комплементу 1:10, 1:15, 1:20, 1:25, 1:30, 1:40, 1:60 і 1:80 на 0,9%-му розчині NaCl.

б) До всіх розведень комплементу додають по 0,04 мл гемолітичної системи та 0,9%-го розчину NaCl (замість антигену і сироватки).

в) Витримують у термостаті або водяній бані при 37°C 30 хв.

г) За *титр комплементу* приймають найменшу його кількість, у присутності якої гемоліз у потрібному титрі спричинює повний лізис 3%-ї суспензії еритроцитів при експозиції 30 хв при 37°C.

д) Для основного дослідження беруть комплемент у подвійному титрі й уточнюють його робочу дозу шляхом титрування в присутності антигенів і сироваток, які мають різний ступінь антикомплементації.

3. Основний дослід РЗК

а) Готують дворазові розведення досліджуваної сироватки від 1:4 до 1:256 на 0,9%-му розчині NaCl в об'ємі 0,02 мл.

б) До кожного розведення сироватки додають по 0,02 мл специфічного антигену в робочій дозі, яку визначають шляхом титрування в присутності специфічної сироватки.

в) До кожної суміші сироватки з антигеном додають по 0,02 мл комплементу в робочій дозі, витримують 18–20 год при 4°C (або 1 год при 37°C) і 20–30 хв за кімнатної температури.

г) До кожної суміші сироватки, антигену і комплементу додають по 0,04 мл гемолітичної системи, витримують у термостаті або на водяній бані при 37°C 45 хв.

д) Результати реакції оцінюють у плюсах зразу після прогрівання та остаточно – через 2 год експозиції за кімнатної температури.

е) При наявності в досліджуваній сироватці антитіл буде затримка гемолізу (на 2–4 плюси), а за їхньої відсутності спостерігається повний гемоліз. За *титр антитіл* приймають найвище розведення сироватки, яке спричинює затримку гемолізу не менше ніж на 2 плюси.

є) Одночасно ставлять *контролі*:

– контроль специфічності (постановка основного дослідження РЗК із специфічною та нормальною сироватками, досліджуваною сироваткою й нормальним антигеном);

– контроль сироваток (досліджуваної, специфічної та нормальної) на антикомплементацію (0,02 мл сироватки в розведенні 1:4 + 0,02 мл 0,9%-го розчину NaCl + 0,02 мл комплементу + 0,04 мл гемолітичної системи);

– контроль специфічного і нормального антигенів на антикомплементацію (0,02 мл антигену + 0,02 мл 0,9%-го розчину NaCl + 0,02 мл комплементу + 0,04 мл гемолітичної системи);

– контроль специфічного і нормального антигенів на гемотоксичність (0,02 мл антигену + 0,04 мл 0,9%-го розчину NaCl + 0,04 мл гемолітичної системи);

– контроль гемолітичної системи (з комплементом і без нього):

1) 0,04 мл гемолітичної системи + 0,02 мл комплементу + 0,04 мл 0,9%-го розчину NaCl;

2) 0,04 мл гемолітичної системи + 0,06 мл 0,9%-го розчину NaCl.

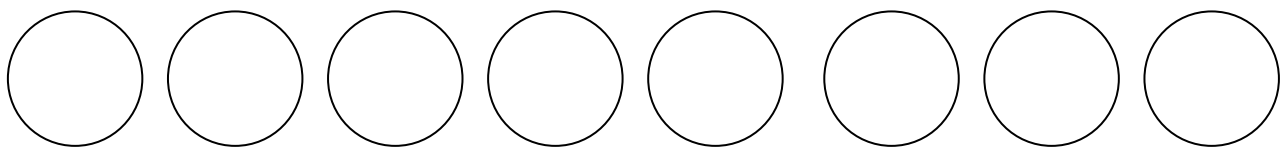
Вищенаведена методика РЗК можна застосовувати також для ідентифікації вірусу за допомогою специфічної сироватки. Незважаючи на трудомісткість, РЗК знайшла широке практичне застосування в лабораторній діагностиці багатьох вірусних хвороб тварин.

Самостійна робота. Відпрацювати методику постановки РЗК. Провести облік та інтерпретацію результатів реакції. Зробити рисунки.

Результат: _____

Результат РЗК

Досліджувана сироватка



1:10 1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 1:1280

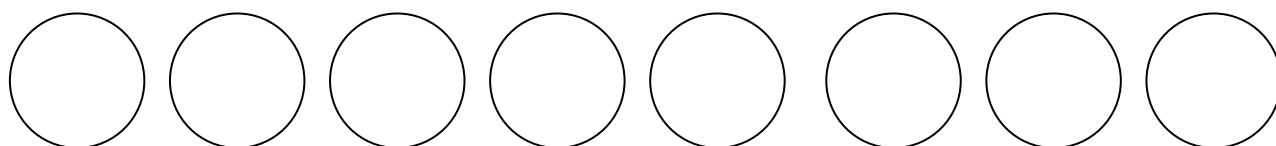
Розведення сироватки

.....

Оцінка реакції в плюсах

Титр антитіл _____

Специфічна сироватка



1:10 1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 1:1280

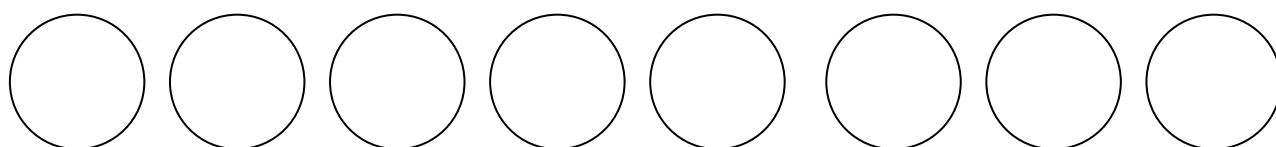
Розведення сироватки

.....

Оцінка реакції в плюсах

Титр антитіл _____

Нормальна сироватка



1:10 1:20 1:40 1:80 1:160 1:320 1:640 1:1280

Розведення сироватки

.....

Оцінка реакції в плюсах

Титр антитіл _____

Контроль гемолітичної системи



з КОМПЛЕМЕНТОМ

без КОМПЛЕМЕНТУ

Теоретичне обґрунтування теми

Реакція дифузійної преципітації (РДП)

РДП основана на здатності вірусних антигенів та антитіл дифундувати в агаровому гелі та при взаємодії утворювати лінії преципітації. Реакція використовується для діагностики сказу, хвороби Ауескі, лейкозу ВРХ, вірусної діареї ВРХ, чуми м'ясоїдних, хвороби Марека та ін.

Компоненти РДП:

1) досліджувані вірусомісні суспензії або сироватки; 2) специфічний і нормальний вірусні антигени; 3) специфічна і нормальна сироватки; 4) 1–2%-й агар (консервованій фенолом 0,1% або натрію мертиолатом 1:10 тис.); 5) 0,9%-й розчин NaCl.

Постановка РДП

1. На знежирені предметні скельця або в чашки Петрі наливають розплавлений 1–2%-й агар завтовшки 1–1,5 мм. Після застигання за допомогою металевих матриць вирізають лунки.

2. В одні лунки вносять по 1–2 краплі досліджувані вірусомісні суспензії (або досліджувані сироватки – цільні чи в дворазових розведеннях), в інші – специфічні сироватки (або специфічні вірусні антигени).

3. Предметні скельця і чашки Петрі поміщають у вологу камеру, витримують 24–48 год за кімнатної температури або в термостаті при 37°C.

4. Реакція вважається позитивною, якщо в агарі між лунками з досліджуваними вірусомісними суспензіями (досліджуваними сироватками) і специфічною сироваткою (специфічним вірусним антигеном) утворюються *білі лінії преципітації*. При ретроспективній діагностиці за *титр антитіл* приймають найвище розведення сироватки, яке спричинює утворення ліній преципітації.

5. Одночасно ставлять *контролі*:

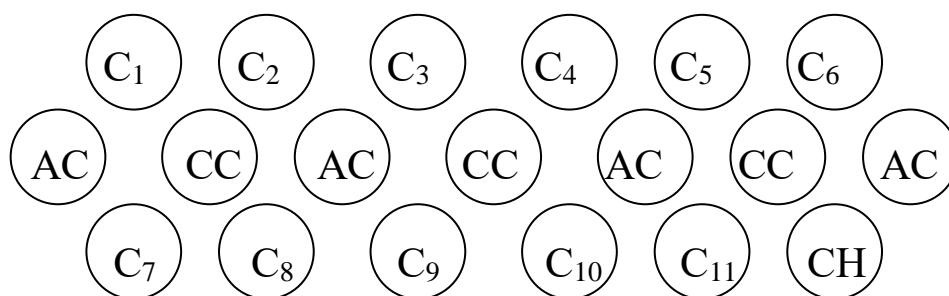
- специфічна сироватка + специфічний антиген;
- специфічна сироватка + нормальний антиген (при ідентифікації вірусу);
- нормальна сироватка + специфічний антиген (при виявленні антитіл).

Перевагою РДП є проста техніка постановки, швидкість отримання результатів. Недолік – недостатня чутливість: у реакції виявляють антигени або антитіла за умови їхньої високої концентрації.

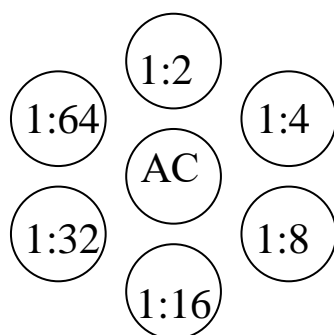
Самостійна робота. Відпрацювати методику постановки РДП. Провести облік та інтерпретацію результатів реакції. Зробити рисунки.

Результат: _____

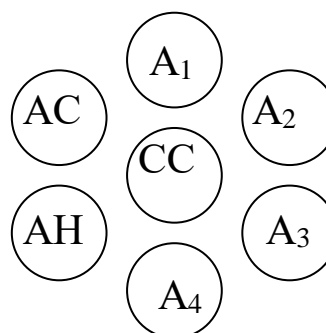
Результат РДП
Виявлення антитіл



Титрування антитіл



Ідентифікація вірусу



Титр антитіл _____

Умовні позначення: C₁ – C₁₁ – досліджувані сироватки; A₁ – A₄ – досліджувані антигени; CC – специфічна сироватка; CH – нормальна сироватка; AC – специфічний антиген; AN – нормальний антиген; 1:2–1:64 – розведення досліджуваної сироватки.

Дата: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Реакція імунофлуоресценції (РІФ)

РІФ ґрунтується на взаємодії вірусних антигенів із міченими флуорохромом антитілами, внаслідок чого виникає світіння за люмінесцентної мікроскопії. З флуорохромів, запропонованих для мічення антитіл, найчастіше використовують *флуоресцеїну ізотіоціанат (ФІТЦ)*, який зумовлює люмінесценцію зеленого кольору. РІФ застосовується для діагностики багатьох вірусних хвороб (скасу, хвороби Ауескі, парагрипу-3 ВРХ, вірусної діареї ВРХ та ін.).

РІФ ставиться двома методами: прямим і непрямим.

Прямий метод РІФ

Компоненти реакції:

1) досліджуваний вірус (мазки-відбитки або гістозрізи з патматеріалу хворих тварин, препарати із зараженої культури клітин); 2) флуоресціюючі специфічна і нормальна сироватки; 3) препарати з органів здорових тварин або незараженої культури клітин.

Постановка реакції

1. Препарати фіксують 10–15 хв у охолодженому ацетоні (–10–15°C), висушують на повітрі.

2. На препарати наносять флуоресціюючу специфічну сироватку, витримують 30 хв у вологій камері за кімнатної температури або в термостаті при 37°C (залежно від виду вірусу).

3. Препарати відмивають ФБР 3 рази по 10 хв, ополіскують дистильованою водою, висушують на повітрі й досліджують у люмінесцентному мікроскопі, застосовуючи нелюмінуючу імерсійну олію.

4. Результати реакції оцінюють у плюсах за інтенсивністю і специфічністю флуоресценції досліджуваного об'єкта при чіткій морфології клітин:

++++ – яскраве світіння смарагдово-зеленого кольору;

+++ – яскраве світіння зеленого кольору;

++ – слабе світіння жовто-зеленого кольору;

+ – дуже слабе світіння невизначеного кольору;

– – відсутність флуоресценції.

6. Реакція вважається позитивною, якщо в препараті в трьох полях зору виявляється не менше як по 3–5 уражених вірусом клітин, що флуоресціюють яскраво-зеленим кольором на 3–4 плюси (внаслідок утворення комплексів антиген–антитіло). Флуоресценція буває дифузною та гранулярною залежно від виду вірусу і стадії його нагромадження в клітині (рис. 21).

7. Одночасно ставлять *контролі*:

– незаражені клітини, оброблені флуоресціюючою специфічною сироваткою;

– заражені клітини, оброблені флуоресціюючою нормальною сироваткою;

– заражені клітини, оброблені спочатку неміченою специфічною сироваткою, а потім – флуоресціюючою специфічною сироваткою;

– заражені клітини, оброблені спочатку нормальною сироваткою, а потім – флуоресціюючою специфічною сироваткою.

Непрямий метод РІФ (РНІФ)

Компоненти реакції:

1) досліджуваний вірус (препарати з патматеріалу хворих тварин або зараженої культури клітин); 2) специфічна сироватка; 3) флуоресціююча антивидова сироватка; 4) препарати з органів здорових тварин або незараженої культури клітин.

Антивидову (антиглобулінову) сироватку отримують шляхом імунізації тварини певного виду глобулінами, виділеними із сироватки тварини іншого виду, яка є продуцентом противірусної сироватки. Наприклад, антивидову сироватку кроля отримують на вівцях або козах, імунізуючи їх кролячою сироваткою.

Постановка реакції

1. На фіксовані препарати наносять специфічну сироватку, витримують 30 хв у вологій камері при 18–22°C або 37°C, потім відмивають (так само, як при прямому методі РІФ).

2. На препарати наносять флуоресціюючу антивидову сироватку, витримують 30 хв у вологій камері при 18–22°C або 37°C, потім відмивають, висушують на повітрі й досліджують у люмінесцентному мікроскопі.

3. За наявності вірусного антигену виникає флуоресценція заражених клітин (унаслідок утворення складних комплексів антиген–антитіло–антивидове антитіло).

4. Одночасно ставлять *контролі*:

– незаражені клітини, оброблені флуоресціюючою антивидовою сироваткою;

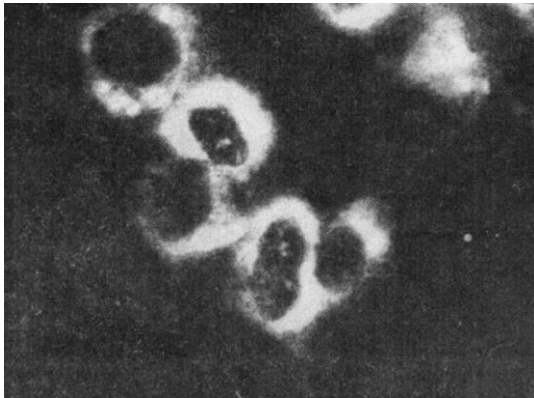
– заражені клітини, оброблені флуоресціюючою антивидовою сироваткою;

– заражені клітини, оброблені спочатку нормальною сироваткою, а потім – флуоресціюючою антивидовою сироваткою;

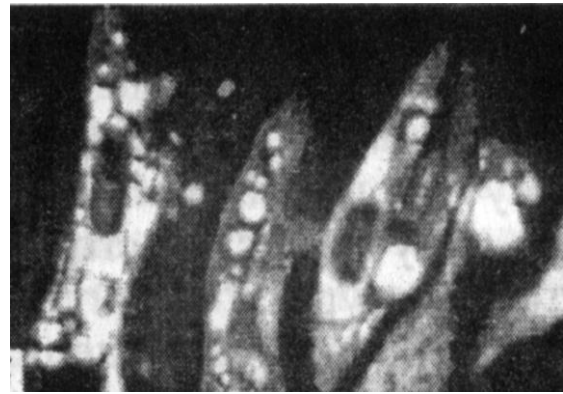
– заражені клітини, оброблені спочатку специфічною сироваткою (після попередньої адсорбції антитіл гомологічним антигеном), а потім – флуоресціюючою антивидовою сироваткою.

Непрямий метод РІФ має *переваги*. Він потребує лише однієї флуоресціюючої сироватки – антивидової, за допомогою якої можна виявити антигени різних вірусів (за умови, що специфічні сироватки до цих вірусів отримані шляхом імунізації тварин одного виду). Окрім того, РНІФ використовується не тільки для ідентифікації вірусу, але й для *виявлення антитіл*. Для цього на фіксовані препарати з культури клітин, зараженої відомим вірусом, наносять

спочатку дворазові розведення досліджуваної сироватки (від 1:10 до 1:1280), а після контакту – флуоресціюючу антивидову сироватку. Специфічні антитіла в досліджуваних сироватках виявляють за яскраво-зеленим світінням вірусного антигену в заражених клітинах. За *титр антитіл* приймають найвище розведення сироватки, при якому спостерігається чітка флуоресценція гомологічного антигену.



а



б

Рис. 21. РІФ: дифузне (а) і гранулярне (б) світіння вірусних антигенів

РІФ характеризується високою чутливістю, специфічністю і швидким отриманням результатів. Особливо цінна ця реакція для ідентифікації тих вірусів, які не мають цитопатогенних, гемаглютинувальних та гемадсорбівних властивостей. РІФ дає можливість вивчити процеси взаємодії вірусів із клітинами, дослідити динаміку накопичення вірусних антигенів у клітинах, антигенні зв'язки вірусів, а також патогенез вірусних інфекцій. Особливо важливе значення цього методу при дослідженні змішаних і хронічних інфекцій. Недолік РІФ – випадки неспецифічної флуоресценції, яку можуть спричинити нормальні антитіла специфічних сироваток, фіксація мічених антитіл на лейкоцитах тощо.

Самостійна робота. Відпрацювати методику постановки РІФ. Оцінити результати РІФ на основі перегляду фотографій.

Результат: _____

Теоретичне обґрунтування теми

Імуноферментний аналіз (ІФА)

ІФА ґрунтується на взаємодії вірусних антигенів із міченими ферментом антитілами, і при додаванні індикаторного субстрату утворюється кольоровий продукт ферментативної реакції. Цей метод характеризується високою специфічністю і чутливістю. ІФА використовується для діагностики багатьох вірусних хвороб (інфекційний ринотрахеїт ВРХ, чума ВРХ, ринопневмонія коней, хвороба Марека, ньюкаслська хвороба та ін.).

Існують *два варіанти* ІФА: 1) гістохімічний метод, або імунопероксидазна реакція; 2) методи твердофазного ІФА (ELISA – від англ. enzyme-linked immunosorbent assay – ферментний імуносорбентний аналіз).

Імунопероксидазна реакція

Цей метод за суттю аналогічний РІФ. Він базується на використанні антитіл, мічених ферментом пероксидазою хрому (*імунопероксидазний кон'югат*). Утворення комплексу антиген–антитіло виявляють за допомогою *бензидинового субстрату* (діамінобензидинтетрахлорид). Субстрат під дією ферменту розкладається з утворенням *кольорового продукту ферментативної реакції*, видимого у світловому мікроскопі (спочатку блакитного кольору, який швидко переходить у коричневий, рис. 22а).

Реакцію ставлять *прямим і непрямим методами*.

За *прямого імунопероксидазного методу* на фіксовані в ацетоні препарати наносять імунопероксидазний кон'югат (1–2 год у вологій камері при 37°C), промивають 0,9%-м розчином NaCl (15 хв) і дистильованою водою, наносять бензидиновий субстрат (5–10 хв у вологій камері при кімнатній температурі), знову промивають і розглядають у світловому мікроскопі під імерсійною олією. Реакція вважається позитивною, якщо в клітинах виявляють дифузне жовто-коричнє забарвлення або гранули коричнево-чорного кольору.

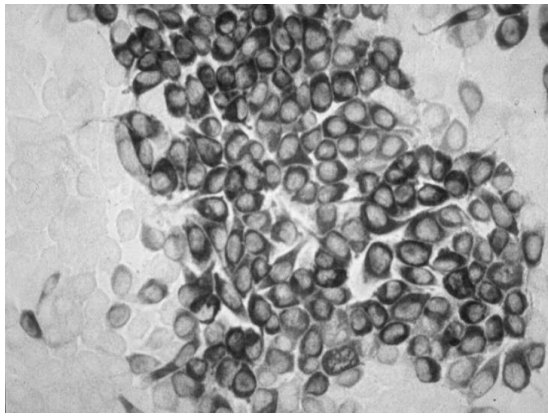
За *непрямого імунопероксидазного методу* препарати обробляють спочатку специфічною сироваткою (1–2 год у вологій камері при 37°C), потім антивидовим імунопероксидазним кон'югатом і нарешті – бензидиновим субстратом. При наявності вірусу в досліджуваному матеріалі утворюються складні комплекси: антиген–антитіло–антивидове антитіло (мічене ферментом), і в результаті бензидиновий субстрат розкладається з утворенням кольорового продукту ферментативної реакції.

Методи твердофазного ІФА

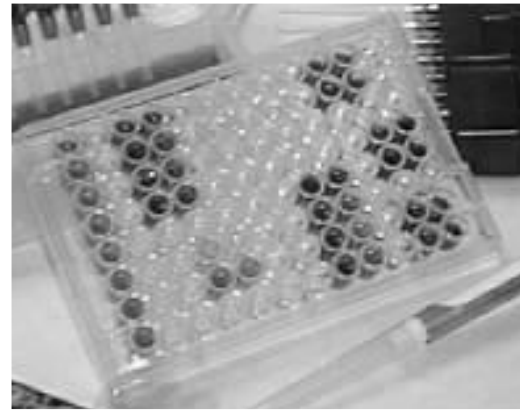
Ці методи базуються на застосуванні вірусних антигенів або антитіл, фіксованих на нерозчинних носіях із синтетичних полімерів із високою сорбційною здатністю. Як твердофазні носії в ІФА найчастіше використовують полістиролові планшети. Автоматизація процесу постановки та обліку результатів реакції дає змогу за короткий час дослідити велику кількість проб сироваток крові на наявність антитіл або вірусомісного матеріалу на наявність вірусних антигенів. У твердофазному ІФА використовують *пероксидазні та лужнофосфатазні кон'югати*.

Існує кілька варіантів постановки твердофазного ІФА. Для ідентифікації вірусів найчастіше використовують *«сендвіч»-метод (або метод подвійних антитіл)*. Для цього лунки полістиролових планшетів сенсibiliзують імуноглобулінами, виділеними зі специфічної до досліджуваного антигену сироватки. У лунки додають спочатку вірусомісний матеріал, а потім після відмивання – мічені ферментом антитіла (гомологічні антигену) і нарешті – субстрат (для пероксидази або лужної фосфатази). Якщо в досліджуваному матеріалі є відповідний антиген, він зв'язується з адсорбованими в лунках антитілами, до утворених імунних комплексів приєднуються мічені ферментом антитіла. Отже, утворюються складні комплекси: антитіло–антиген–мічене антитіло, які виявляють за допомогою субстрату. Під дією ферменту субстрат розкладається з утворенням кольорового продукту ферментативної реакції (рис. 22б). Результати реакції враховують візуально за інтенсивністю забарвлення або за допомогою спектрофотометрів за оптичним поглинанням. Інтенсивність забарвлення прямо пропорційна кількості антигену в досліджуваній пробі. За позитивний результат приймають підвищення оптичної густини досліджуваних проб над контрольними в 5–10 разів. Тривалість проведення дослідження – 2,5–3 год.

Для виявлення антитіл у сироватках крові використовують *непрямий метод твердофазного ІФА*. Для цього лунки полістиролових планшетів сенсibiliзують антигеном, до якого визначають антитіла. У лунки додають спочатку досліджувані сироватки, а потім після відмивання – антивидовий кон'югат і нарешті – субстрат. Якщо в досліджуваній сироватці є антитіла, утворюються складні комплекси: антиген–антитіло–антивидове антитіло (мічене ферментом), і в результаті субстрат розкладається з утворенням кольорового продукту ферментативної реакції.



а



б

Рис. 22. Імунопероксидазний (а) і твердофазний (б) методи ІФА

Самостійна робота. Оцінити результати ІФА на основі перегляду фотографій і планшетів.

Результат: _____

Контрольні запитання

1. Що таке серологічні реакції? **2.** З якою метою використовують серологічні реакції у вірусології? **3.** Які ви знаєте серологічні реакції? **4.** Які біофабричні набори діагностикумів застосовують для постановки серологічних реакцій? Принцип їхнього виготовлення. **5.** Яка мета прогрівання сироваток крові перед постановкою серологічних реакцій? **6.** Суть РН, методика постановки та інтерпретація результатів. **7.** Суть РЗГА, методика постановки та інтерпретація результатів. **8.** Суть РНГА, методика постановки та інтерпретація результатів. **9.** Суть РЗГАд, методика постановки та інтерпретація результатів. **10.** Суть РДП, методика постановки та інтерпретація результатів. **11.** Суть РЗК, методика постановки та інтерпретація результатів. **12.** Суть РІФ, методика постановки та інтерпретація результатів. **13.** Суть ІФА, методика постановки та інтерпретація результатів.

Тема 10
ТЕМАТИЧНА САМОСТІЙНА РОБОТА

**ВИДИ ВІРУСІВ, ЯКІ КУЛЬТИВУЮТЬСЯ В ОРГАНІЗМІ
ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН І В КУРЯЧИХ ЕМБРІОНАХ**

**Таблиця 1. Культивування вірусів
у організмі лабораторних тварин**

Вірус	Метод зараження	Ознаки розмноження вірусу
Білі миші		
Ліссавірус сказу (збудник сказу)	і/ц, п/ш	Скуйовдження шерсті, горбатість спини, порушення координації рухів, параліч кінцівок, загибель
Альфагерпесвірус свиней 1 (збудник хвороби Ауескі)	і/ц, п/ш	Паралічі, загибель
Вірус ящуру	п/ш, в/ч	Парези, паралічі, загибель, некроз скелетних м'язів і міокарда
Везикуловіруси Індіана, Алагоас, Кокал і Нью-Джерсі, (збудники везикулярного стоматиту)	і/ц, в/ч	Скуйовдження шерсті, тремтіння, атаксія, параліч кінцівок, загибель
Альфагерпесвіруси коней 1 і 4 (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	і/ц	Симптоми енцефаломієліту, загибель
	в/ч, і/н	Загибель, гепатит
Вірус грипу А (штами вірусу коней, свиней і птиці)	і/н	Симптоми ураження дихальних шляхів, загибель, вогнищева пневмонія
Вірус японського енцефаліту	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
Віруси енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного і західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель

Вірус	Метод зараження	Ознаки розмноження вірусу
Білі пацюки		
Альфагерпесвірус свиней 1 (збудник хвороби Ауескі)	п/ш, і/н	Паралічі, загибель
Вірус грипу А (штами вірусу свиней)	і/н	Симптоми ураження дихальних шляхів, загибель
Вірус японського енцефаліту	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
Віруси енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного і західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель
Мурчак		
Вірус ящуру	в/ш	Афти на лапках і слизовій оболонці ротової порожнини
Везикуловіруси Індіана, Алагоас, Кокал і Нью-Джерсі (збудники везикулярного стоматиту)	в/ш	Везикули на лапках та язиці
Альфагерпесвіруси коней 1 і 4 (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	в/ч	Аборт або загибель, некрози в печінці, крововиливи в легенях, гастроентерит
Вірус японського енцефаліту	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
Віруси енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного і західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель
Кролі		
Ліссавірус сказу (збудник сказу)	і/ц	Паралічі, загибель
Альфагерпесвірус свиней 1 (збудник хвороби Ауескі)	п/ш, в/м	Збудження, свербіння, розчухи, паралічі, загибель
Вірус ящуру	п/ш, в/ч	Парези, паралічі, загибель, некроз скелетних м'язів і міокарда

Вірус	Метод зараження	Ознаки розмноження вірусу
Везикуловіруси Індіана, Алагоас, Кокал і Нью-Джерсі (збудники везикулярного стоматиту)	у слизову оболонку язика	Везикули на слизовій оболонці ротової порожнини
Вірус віспи корів	в/ш, у скари- фіковану шкіру	Інфільтрати з некрозом і геморагіями, папули, пустули на шкірі
Вірус японського енцефаліту	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
Віруси енцефало- мієлітів коней (венесуельського, східного і західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель
Вірус віспи кролів	в/ш, у скари- фіковану шкіру	Набряк і некроз шкіри
Вірус міксоми (збудник міксоматозу кролів)	в/ш, у кон'юнк- тивальний мішок	Блефарокон'юнктивіт, риніт, пухлинні вузлики або драглисті набряки на шкірі
Вірус фіброми кролів	п/ш	Пухлини на шкірі з з некрозом та ерозіями
Каппапапіломавірус 2 (збудник папіломатозу кролів)	у скари- фіковану шкіру	Папіломи на шкірі
Х о м ' я к и		
Мастаденовіруси ВРХ А, В і С, атаденовірус ВРХ D	п/ш, в/ч, і/ц, у грудну порож- нину	Пухлини
Вірус грипу А (штами вірусу свиней)	і/н	Симптоми ураження дихальних шляхів, загибель

Вірус	Метод зараження	Ознаки розмноження вірусу
Альфагерпесвіруси коней 1 і 4 (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	і/ц	Симптоми енцефаломієліту, загибель
	і/н, п/ш, в/ч	Загибель, гепатит
Вірус японського енцефаліту	і/ц	Симптоми енцефаліту, загибель
Віруси енцефаломієлітів коней (венесуельського, східного, західного)	і/ц, в/м, в/ч, п/ш	Симптоми енцефаліту або енцефаломієліту, загибель
Вірус саркоми Рауса	п/ш	Пухлини

Т а б л и ц я 2. Культивування вірусів у курячих ембріонах

Вірус	Метод зараження	Ознаки розмноження вірусу
Вірус віспи корів	на ХАО, в алантоїсну порожнину	Загибель, геморагічні віспини на ХАО
Вірус віспи овець	на ХАО	Віспини на ХАО
Вірус віспи кіз	на ХАО	Віспини на ХАО
Вірус віспи кролів	на ХАО	Загибель, геморагічні віспини на ХАО, крововиливи на зародку
Вірус віспи курей	на ХАО	Загибель, віспини на ХАО
Респіровірус ВРХ 3 (збудник парагрипу-3 ВРХ)	в алантоїсну порожнину, в амніон, на ХАО	РГА
Альфагерпесвірус свиней 1 (збудник хвороби Ауескі)	на ХАО	Загибель, віспини на ХАО

Вірус	Метод зараження	Ознаки розмноження вірусу
Альфагерпесвіруси коней 1 і 4 (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	у жовтковий мішок, в алантоїсну порожнину, в амніон	Загибель, віспини на ХАО
Вірус грипу А штами вірусу коней	в алантоїсну порожнину, в амніон	РГА
Вірус грипу А штами вірусу свиней	в алантоїсну порожнину, в амніон	Крововиливи на зародку, РГА
Вірус грипу А штами вірусу птиці	в алантоїсну порожнину, в амніон	Загибель, крововиливи на зародку, РГА
Вірус міксоми (збудник міксоматозу кролів)	на ХАО	Віспини на ХАО
Альфагерпесвіруси куриних 2 і 3 (збудники хвороби Марека)	на ХАО, у жовтковий мішок	Загибель, вогнища клітинної проліферації на ХАО (бляшки), збільшення печінки і селезінки
Ортоавулавірус птиці 1 (збудник ньюкаслської хвороби)	в алантоїсну порожнину, в амніон, на ХАО	Загибель, крововиливи на зародку, РГА
Коронавірус птиці (збудник інфекційного бронхіту курей)	в алантоїсну порожнину, в амніон, на ХАО	Загибель, карликовість і муміфікація зародка, набряк ХАО та амніотичної оболонки, збільшення об'єму алантоїсної рідини, зменшення об'єму амніотичної рідини, зморщування жовткового мішка, РГА

Вірус	Метод зараження	Ознаки розмноження вірусу
Авігепатовірус А (збудник вірусного гепатиту каченят)	на ХАО, в алантоїсну порожнину	Загибель, набряки, гіперемія та крововиливи на зародку, набряк ХАО і печінки; печінка жовто-сірого або жовто-зеленого кольору з вогнищами некрозу; ембріональні рідини, вміст кишечника і жовткового мішка зеленого кольору
Вірус саркоми Рауса	на ХАО, в амніон, у кровоносні судини ХАО	Вогнища проліферації на ХАО (бляшки)

ПІДГОТОВКА ПОСУДУ ДЛЯ КУЛЬТУРИ КЛІТИН. ІНДИКАЦІЯ В КУЛЬТУРІ КЛІТИН НЕЦИТОПАТОГЕННИХ І ЛАТЕНТНИХ ВІРУСІВ

Підготовка посуду для культури клітин

Якість посуду має винятково важливе значення для культивування клітин *in vitro*. Посуд повинен бути знежиреним, стерильним та абсолютно чистим, бо клітини дуже чутливі до мінімальних домішок сторонніх речовин, зокрема солей важких металів. Посуд виготовляють із твердих сортів скла (боросилікатне або натрієве скло), яке стійке до механічних пошкоджень і не затримує сліди сторонніх речовин. Матраци виготовляють із нейтрального скла.

Обов'язковою умовою успішної роботи з культурою клітин є висока якість води.

Новий скляний посуд миють теплою водою з мийним засобом, промивають 8–10 разів водопровідною водою та занурюють на 3 год у хромову суміш (100 г калію дихромату на 1 л концентрованої H_2SO_4). Потім посуд промивають проточною водою впродовж 9–12 год, ополіскують у 5–6 змінах дистильованої води, сушать і монтують.

Шийки матраців, флаконів і колб закривають двома шарами фольги і обв'язують шпагатом. Пробірки по 10–20 штук обгортають пергаментним папером або фольгою. Піпетки затикають ватою, поміщають у спеціальні пенали для стерилізації або кожен обгортають смужкою пергаментного паперу.

Стерилізацію посуду проводять у сушильній шафі при 170–180°C упродовж 3–4 год або в автоклаві при 2 атм упродовж 1,5–2 год.

Контамінований посуд (пробірки та матраци із зараженою культурою клітин) занурюють у 2–3%-й розчин NaOH на 5–6 год, промивають 3–4 рази водопровідною водою, замочують на ніч у 0,3–0,5%-му розчині прального порошку. Вранці посуд миють за допомогою йоржика, потім промивають 8–10 разів водопровідною водою, витримують в 1–2 год у 0,5–1%-му розчині HCl, знову 4–5 разів споліскують водопровідною водою і в 5–6 змінах дистильованої води.

Гумові пробки, трубки і груші кип'ятять упродовж 1 год в 5%-му розчині натрію гідрокарбонату, промивають кілька разів гарячою водопровідною водою. Потім нові гумові вироби кип'ятять упродовж 1 год у 6 змінах дистильованої води. Пробки, які вже використовувалися, кип'ятять 1 год у дистильованій воді та споліскують у 3-х змінах дистильованої води. Далі пробки висушують, загортають у пергаментний папір і стерилізують в автоклаві.

Інструменти миють гарячою водою з милом, промивають водопровідною й дистильованою водою, стерилізують кип'ятінням упродовж 30 хв. Під час роботи інструменти повинні знаходитися в склянці з 96%-м етиловим спиртом, перед використанням їх пропалюють.

В останні десятиліття широко використовують одноразові модифікації пластикового посуду.

Індикація в культурі клітин нецитопатогенних і латентних вірусів

Існують нецитопатогенні віруси, які розмножуються в культурі клітин без прояву ЦПД. Для їхньої індикації використовують методи, які базуються на явищах інтерференції та екзальтації вірусів.

Інтерференція – це здатність деяких вірусів пригнічувати репродукцію інших. На основі інтерференції можна виявити в культурі клітин нецитопатогенні віруси шляхом спільного культивування їх із цитопатогенними агентами, репродукцію яких вони гальмують. Так, якщо культуру клітин заразити спочатку нецитопатогенним пестівірусом С (збудником класичної чуми свиней), а потім – вірусом ящуру, то ЦПД вірусу ящуру не проявляється внаслідок явища інтерференції. Або інший приклад: нецитопатогенні штами альфакоронавірусу 1 (збудника трансмісивного гастроентериту свиней) гальмують розвиток ЦПД пестівірусів А і В (збудників вірусної діареї ВРХ).

Феномен екзальтації полягає в прояві ЦПД у культурі клітин, зараженій двома вірусами: один із них нецитопатогенний, а другий – цитопатогенний, але в даній культурі не розмножується. Наприклад, екзальтація ортоавулавірусу птиці 1 (збудника ньюкаслської хвороби) пестівірусом С у культурі клітин сім'яників поросят (клітини, заражені нецитопатогенним пестівірусом С, під дією авулавірусу птиці 1 лізуються). Інший приклад: екзальтація ортоавулавірусу птиці 1 в культурі клітин сім'яників телят у присутності нецитопатогенних штамів пестівірусів А і В.

За латентних інфекцій нечасто вдається виділити вірус традиційним метордом зараження клітинних культур суспензією з патологічного матеріалу. В таких випадках застосовують **метод культивування уражених тканин**: із досліджуваного матеріалу готують первинні культури клітин, що призводить до демаскування латентного збудника.

Для виділення вірусів, які важко адаптуються до культур клітин, використовують **метод співкультивування**. Він полягає в одночасному культивуванні клітин трипсинізованої зараженої тканини і чутливих клітин моношарової культури (зокрема перещеплюваної). Цей метод застосовують при вивченні хронічних і повільних вірусних інфекцій.

ГЕМАГЛЮТИНУВАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ ВІРУСІВ. СЕРОЛОГІЧНІ РЕАКЦІЇ

Т а б л и ц я 5. Гемаглютинувальні властивості вірусів тварин

Вірус	Еритроцити	Темпе- ратура	pH
Вірус віспи корів	Курки	37°C	6,0–8,0
Вірус віспи кролів	Курки	37°C	6,0–8,0
Вірус віспи курей	Курки	37°C	7,2–7,4
Вірус грипу А штами вірусу свиней	Курки, качки, галки, тхора, мурчака, пацюка, собаки, їжака, людини (0 група крові)	18–22°C	7,2
Вірус грипу А штами вірусу коней	Курки, качки, гуски, голуба, мурчака, пацюка, миші, хом'яка, кроля, kota, собаки, корови, вівці, свині, коня, людини (0 група крові)	18–22°C	7,2
Вірус грипу А штами вірусу птиці	Курки, мурчака, кроля, коня, вівці, людини (0 група крові)	18–22°C	7,2
Ліссавірус сказу (збудник сказу)	Гуски, курки, мавпи, мурчака, пацюка, вівці, людини (0 група крові)	0–4 °C	6,2–6,4
Везикуловіруси Індіана, Алагоас, Кокал і Нью-Джерсі, (збудники везикулярного стоматиту)	Гуски	4°C	5,8
Вірус лейкозу ВРХ	Миші	4°C	6,0
Респіровірус ВРХ 3 (збудник парагрипу-3 ВРХ)	Мурчака, кроля, миші, корови, вівці, кози, свині, буйвола, мавпи, голуба, гуски, індика	4 °C, 18–22°C, 37 °C	5,7–7,2
Альфагерпесвірус ВРХ 1 (збудник інфекційного ринотрахеїту ВРХ)	Миші, пацюка, хом'яка, мурчака, людини (0 група крові)*	4 °C	7,2

Вірус	Еритроцити	Температура	pH
Мастаденовіруси ВРХ А, В і С, атаденовірус ВРХ D (збудники аденовірусної інфекції ВРХ)	Миші, пацюка, хом'яка, мурчака, корови, вівці, кози	4°C, 18–22°C, 37°C	7,2–7,4
Альфакооронавірус 1 (збудник трансмісивного гастроентериту свиней)	Курчати, мурчака, корови	4°C	7,2
Альфагерпесвіруси коней 1 і 4 (збудники вірусного аборту кобил і ринопневмонії коней)	Коня, мурчака	4 °C, 37 °C	7,2
Вірус інфекційної анемії коней	Мурчака	4°C, 18–22°C, 37°C	5,5–7,5
Вірус геморагічної хвороби кролів	Вівці, курки, людини (0 група крові)	18–22°C	7,2
Ортоавулавірус птиці 1 (збудник ньюкаслської хвороби)	Курки, голуба, індика, мурчака, миші, корови, вівці, кози, свині, коня, людини (0 група крові)	18–22 °C	7,2
Коронавірус птиці (збудник інфекційного бронхіту курей)	Курки **	18–22°C, 37°C	7,2

* – після концентрації вірусу ПЕГ-6000 або ультрацентрифуванням;

** – після обробки вірусу трипсином або фосфоліпазою С.

Реакція аглютинації латексу (РАЛ) за суттю аналогічна РНГА. У РАЛ використовують антигенні або антитільні латексні діагностикуми, що являють собою частки скляного чи полістиролового латексу, сенсibilізовані вірусними антигенами або антитілами. У присутності гомологічних імунних компонентів сенсibilізований латекс склеюється з утворенням аглютинату, видимого візуально або при використанні лупи. РАЛ розроблена для діагностики хвороби Ауескі, лейкозу ВРХ, ротавірусної інфекції ВРХ і свиней та ін.

Зустрічний імуоелектрофорез (ЗІЕФ) ґрунтується на поєднанні імунодифузії в гелі з електрофорезом: вірусні антигени та антитіла переміщуються в електричному полі назустріч один одному і при взаємодії утворюють лінії преципітації. На відміну від РДП, у ЗІЕФ дифузія імунореагентів відбувається не вільно у всіх радіальних напрямках, а назустріч один одному під впливом електричного поля. При цьому негативно заряджені в лужному середовищі вірусні антигени рухаються до аноду, а нейтральні антитіла – до катоду внаслідок електроендоосмосу. ЗІЕФ використовується для діагностики лейкозу ВРХ, класичної та африканської чуми свиней, трансмісивного гастроентериту свиней, алеутської хвороби норок та ін.

Реакція радіальної імунодифузії (РРІД) ґрунтується на внесенні в гелеве середовище відомого імунного компонента (вірусного антигену або специфічної сироватки), а в лунки – досліджуваного, і при утворенні комплексу антиген–антитіло формуються кільця преципітації. РРІД використовується для ретроспективної діагностики ящуру та ін.

Реакція радіального гемолізу (РРГ) ґрунтується на здатності еритроцитів, сенсibiliзованих вірусним антигеном, лізуватися під дією антитіл у присутності комплементу в гелевому середовищі. РРГ використовується для ретроспективної діагностики грипу ссавців і птиці, ньюкаслської хвороби та ін.

Радіоімуний аналіз (РІА) ґрунтується на використанні антитіл або вірусних антигенів, мічених ізотопом ^{125}I . У присутності гомологічних імунореагентів утворюються імунні комплекси з радіоактивною міткою, які виявляють за допомогою гамма-лічильника. РІА використовується для діагностики лейкозу ВРХ, лейкозу птиці та ін.

Реакція нейтралізації флуоресціюючих мікробляшок (РНФМ) ґрунтується на поєднанні РН із РІФ. Метод використовується для ретроспективної діагностики класичної чуми свиней. Сумішшю досліджуваної сироватки з вірусом заражають культуру клітин, яку обробляють міченими флуохромом антитілами; за наявності в сироватці антитіл флуоресценція відсутня.

Рекомендована література

Базова

1. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник. 2-ге вид., перероб. і доп. Київ: Нічлава, 2015. 262 с.
2. Калініна О.С., Панікар І.І., Скибіцький В.Г. Ветеринарна вірусологія: Підручник . Київ: Вища освіта, 2004. 432 с.
3. Панікар І.І., Скибіцький В.Г., Калініна О.С. Практикум з ветеринарної вірусології. Суми: Козацький вал, 1997. 236 с.
4. Скибіцький В.Г., Панікар І.І., Ткаченко О.А., Калініна О.С. та ін. Практикум з ветеринарної вірусології: Навчальний посібник. Київ: Вища освіта, 2005. 208 с.

Допоміжна

1. Белоусова Р.В., Преображенская Э.А., Белоусова Р.В. Ветеринарная вірусологія. Москва: КолосС, 2007. 424 с.
5. Троценко Н.И., Белоусова Р.В., Преображенская Э.А. Практикум по ветеринарной вирусологии: 2-е изд., перераб. и доп. Москва: Колос, 2006. – 248 с.

З М І С Т

Тема 1.	Організація та обладнання вірусологічної лабораторії. Техніка безпеки і правила роботи з вірусомісним матеріалом. Загальні принципи лабораторного дослідження за вірусних хвороб тварин	5
	Природа вірусів	5
	Структура і режим роботи вірусологічної лабораторії	6
	Загальні принципи лабораторного дослідження за вірусних хвороб тварин	8
Тема 2.	Відбір патологічного матеріалу від хворих і загиблих тварин для лабораторного дослідження	10
	Відбір клінічного і патологоанатомічного вірусомісного матеріалу	10
	Консервування і транспортування патматеріалу	11
	Підготовка вірусомісного матеріалу для дослідження	12
Тема 3.	Індикація вірусів у патологічному матеріалі за наявністю віріонів і тілець-включень	15
	Морфологія вірусів	15
	Виявлення віріонів вірусів методом світлової мікроскопії (вірусоскопія)	16
	Електронна мікроскопія	17
	Виявлення тілець-включень вірусів	18
Тема 4.	Індикація в досліджуваному матеріалі вірусних нуклеїнових кислот молекулярно-генетичними методами	20
	Метод ДНК-зондів	20
	Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)	22
Тема 5.	Культивування вірусів у організмі лабораторних тварин	23
	Біопроба на лабораторних тваринах	24
	Індикація вірусів у організмі лабораторних тварин ...	26
Тема 6.	Культивування вірусів у курячих ембріонах	28
	Біопроба на курячих ембріонах	28
	Індикація вірусів у курячих ембріонах	31

Тема 7.	Культивування вірусів у культурах клітин	34
	Класифікація тканинних культур і принцип їхнього отримання	35
	Розчини і живильні середовища для культури клітин	39
	Отримання первинно-трипсинізованої культури клітин і субкультури	40
	Індикація вірусів у культурі клітин	42
Тема 8.	Титрування вірусів	47
	Загальні принципи титрування вірусів	47
	Титрування вірусів за інфекційною активністю	48
	Титрування вірусів за гемаглютинувальною активністю	52
Тема 9.	Серологічні реакції	54
	Загальні принципи серологічних реакцій	55
	Реакція нейтралізації (РН)	56
	Реакція затримки гемаглютинації (РЗГА)	58
	Реакція непрямой гемаглютинації (РНГА)	60
	Реакція затримки гемадсорбції (РЗГАд)	63
	Імунохроматографічний аналіз (ІХА)	64
	Реакція зв'язування комплекменту (РЗК)	66
	Реакція дифузійної преципітації (РДП)	70
	Реакція імунофлуоресценції (РІФ)	72
	Імуноферментний аналіз (ІФА)	76
Тема 10.	Тематична самостійна робота	79
	Види вірусів, які культивуються в організмі лабораторних тварин і в курячих ембріонах	79
	Підготовка посуду для культури клітин. Індикація в культурі клітин нецитопатогенних і латентних вірусів	84
	Гемаглютинувальні властивості вірусів. Серологічні реакції	87
	Рекомендована література	90

Львівський національний університет ветеринарної медицини
та біотехнологій імені С.З. Гжицького
Кафедра мікробіології та вірусології

Навчально-методичне видання

Калініна Ольга Сергіївна

**Лабораторні заняття
і тематична самостійна робота
з навчальної дисципліни
«ВІРУСОЛОГІЯ»**

Частина 1. Загальна вірусологія

**Навчально-методичний посібник
для студентів III курсу ФВГЕП**